



**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA - UNB
CURSO AGRONOMIA**

ISADORA NOGUEIRA

**Levantamento e localização de alguns endossimbiontes de
*Bemisia tabaci***

BRASÍLIA, AGOSTO DE 2012

**Levantamento e localização de alguns endossimbiontes de
*Bemisia tabaci***

Isadora Nogueira

Trabalho de Conclusão do Curso,
apresentado para obtenção do grau de Eng.
Agrônomo no Curso de Agronomia da
Universidade de Brasília, UNB.

Orientadora: Rita de Cássia Pereira Carvalho

BRASÍLIA, AGOSTO DE 2012

**Levantamento e localização de alguns endossimbiontes de
*Bemisia tabaci***

Isadora Nogueira

Trabalho de Conclusão de Curso
aprovado pela Banca Examinadora para
obtenção do Grau de Engenheiro
Agrônomo, no Curso de Agronomia da
Universidade de Brasília, UNB, com
Linha de Pesquisa em Fitopatologia.

BANCA EXAMIDADORA:

Rosana Blawid

Cláudio Lúcio Costa

Rita de Cássia Pereira Carvalho

BRASÍLIA, AGOSTO DE 2012

Dedico

Aos meus amados pais, Cléa Birkhan Nogueira e Otacílio Camargo Nogueira por todo carinho e apoio;

Aos meus queridos irmãos, João Francisco Birkhan Camargo Nogueira e Pedro César Birkhan Camargo Nogueira pelo incentivo e apoio;

A minha avó, Irma Birkhan. Obrigada por todas as orações.

Agradecimentos

Este trabalho não teria sido o mesmo sem a presença de muitos amigos e exceletes profissionais com que tive a honra de conviver. Meu muitíssimo obrigada:

A Profa. Rita de Cássia Pereira Carvalho, minha orientadora e também grande amiga, a qual eu tive o privilégio de estagiar por dois anos, obrigada por toda ajuda, ensinamentos, paciência e compreensão.

A Dra. Rosana Blawid, pela imensurável ajuda, profissional e psicológica, e parceria nos trabalhos desenvolvidos.

Ao Dr Leonardo Boiteux, a Dr Maria Esther Boiteux e o Dr Renato Resende pelas contribuições no trabalho e por fornecer a estrutura e recursos necessários para o andamento do projeto.

A todos os meus companheiros de departamento e laboratório.

Aos funcionários da Estação Experimental Biológica da UnB.

As minhas grandes amigas Gabriela Santos de Santana e Ana Luisa Hamú, pelo apoio e compreensão.

A família Zanchett por todo apoio.

Aos meus pais e toda minha família que apesar de não fazerem idéia do que eu faço sempre me apoiaram e me aplaudiram com muito orgulho.

A todas as pessoas que direta ou indiretamente contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho.

Sumário

RESUMO.....	7
CAPÍTULO 1.....	9
Introdução.....	10
-Simbiontes e insetos.....	14
-Objetivos.....	18
CAPÍTULO 2.....	19
Introdução.....	20
MATERIAL E MÉTODOS.....	22
1-Levantamento de endossimbiontes.....	22
1.1-Locais de coleta.....	22
1.2-Extração de DNA genômico.....	26
1.3-Amplificação de DNA.....	28
1.3.1-PCR.....	28
1.3.2-RAPD.....	30
1.4- Localização de bactérias endossimbiontes (primário e secundários) no vetor <i>Bemisia tabaci</i> por hibridização <i>in situ</i> - confocal.....	30
1.4.1- Manutenção de criação de <i>Bemisia tabaci</i> avirúlfera.....	31
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	32
1-Extração de DNA.....	32
2- Levantamento de endossimbiontes.....	32
3- Localização de endossimbiontes.....	39
CONCLUSÃO.....	42
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	43

Resumo

Bemisia tabaci (ordem Hemiptera, família *Aleyrodidae*), popularmente conhecida como mosca-branca, é uma praga de importância econômica em diversos países, devido a sua alimentação direta e por atuar como vetor de diferentes gêneros virais, dentre eles, *Begomovirus*. No Brasil vários trabalhos apontam a predominância do biótipo B do inseto. Mosca-branca abriga em seu organismo diversos endossimbiontes bacterianos, tanto primários, quanto secundários, que podem interagir com suas hospedeiras em diferentes níveis de parasitismo a mutualismo, e estarem ligados à dieta dos insetos hospedeiros, associando-se ao fornecimento de aminoácidos essenciais que encontram-se em baixos níveis no floema. Endossimbiontes podem também estar relacionados à reprodução de suas hospedeiras; conferindo resistência a parasitoides e a estresse de temperatura; permitindo melhor adaptabilidade ao inseto e aumentando a eficiência de *Bemisia tabaci* como vetor de vírus. Vários endossimbiontes são relatados em populações de *Bemisia tabaci* ao redor do mundo incluindo “*Candidatus Portiera aleyrodidarum*” (Halomonadaceae), “*Candidatus Hamiltonella defensa*” (Enterobacteriaceae), *Wolbachia* (Rickettsiales - Anaplasmataceae), *Arsenophonus* (Enterobacteriaceae), *Cardinium* (Bacterioidetes), *Fritschea bemisiae* (Simkaniaceae) e *Rickettsia* (Rickettsiales – Rickettsiaceae) sendo conhecido que existem diferenças dependendo do tipo de biótipo em questão. No Brasil, até o presente momento, praticamente não existem estudos sobre *Bemisia tabaci* e seus endossimbiontes. A identificação inicial dos endossimbiontes em populações de *Bemisia tabaci* biótipo B é essencial para o conhecimento destes organismos. Estudos de localização destes endossimbiontes no corpo do vetor, bem como co-localização com *Begomovirus* e estudos de transmissão viral são importantes para elucidar o provável papel destes endossimbiontes na transmissão de *Begomovirus*. Assim, este trabalho é importante para fornecer subsídio a estudos futuros que abordem vários aspectos da interação vírus-vetor, dentre eles a eficiência de transmissão de *Begomovirus* spp pelo vetor *Bemisia tabaci*. Nesse contexto, o presente trabalho possui dois objetivos básicos: (1) Fazer um levantamento inicial e identificar endossimbiontes presentes em populações de *Bemisia tabaci* no DF e região do Entorno e (2) Estudar a localização de alguns endossimbiontes de *Bemisia tabaci* biótipo B. Assim, foram analisadas 31 amostras de plantas, provenientes do DF e Entorno, onde 91 extrações foram realizadas e o DNA total foi

extraído de amostras contendo 1, 2, 3, 4 ou 5 moscas. Primers foram utilizados em reações de PCR para identificar o biótipo do inseto, os endossimbiontes “*Candidatus Portiera aleyrodidarum*”, *Hamiltonella*, *Wolbachia* e também para identificação de *Begomovirus* spp. Os amplicóns gerados serão sequenciados. Das 31 amostras analisadas 30 e 27 apresentaram *Hamiltonella* e *Portiera* respectivamente. Os primers indicados na literatura para *Wolbachia* serão testados novamente tendo em vista a não amplificação por 3 vezes consecutivas. Além disto, algumas bactérias endossimbiontes de *Bemisia tabaci* e associadas ao biótipo B foram localizadas utilizando-se a microscopia de confocal. Indivíduos adultos, ovos e ninfas foram utilizados nos estudos de hibridização contendo sondas marcadas com Cy-3 e Cy-5. Esta foi a primeira vez no Brasil (e também América do Sul) que realizou-se estudos de localização de endossimbiontes em *Bemisia tabaci*.

CAPÍTULO 1

***Bemisia tabaci*, endossimbiontes e transmissão viral**

Revisão Bibliográfica

Introdução

Bemisia tabaci (ordem Hemiptera, subordem Sternorrhyncha, família Aleyrodidae), popularmente conhecida como mosca-branca, é uma praga de importância econômica em diversos países, devido a sua alimentação direta e por atuar como vetor de diferentes gêneros virais (*Ipomovirus*, *Carlavirus*, *Crinivirus* e *Begomovirus*) (Louro, 2004; Brown, 2007). Os estágios imaturos dessa espécie excretam uma substância açucarada que ao cair na folha favorece o desenvolvimento do fungo *Capnodium* sp., causando o sintoma da fumagina que reduz a capacidade fotossintética da planta e o valor comercial dos frutos. Os principais danos são causados pela transmissão de diversas viroses que causam amarelecimento, encarquilhamento das folhas e nanismo das plantas, conseqüentemente afetando a produção da planta, por outro lado a alimentação do inseto causa o amadurecimento irregular dos frutos e isoporização da polpa (Villas Bôas *et al.* 2007).

Em torno de 114 espécies de vírus são transmitidas por espécies da família Aleyrodidae, sendo que 90% pertencem ao gênero *Begomovirus*.

A relação estabelecida entre *B. tabaci* e *Begomovirus* é do tipo circulativa não propagativa (embora existam controvérsias), onde, o vírus após circular pelo corpo do inseto, atinge as glândulas salivares para ser, então, inoculado durante o processo de alimentação. O período mínimo de acesso de aquisição (PAA) e o período de acesso de inoculação (PAI) têm sido reportados para muitos vírus no Velho e Novo Mundo e de maneira geral varia, de 10 a 60 minutos e de 10 a 30 minutos, respectivamente (Idris & Brown, 1998; Santos *et al.*, 2003). O período de latência após a aquisição é de 17-20 horas e uma mosca adulta permanece virulífera de 7-20 dias.

A mosca-branca possui hábito alimentar polífago com pelo menos 600 espécies de plantas hospedeiras em 74 famílias botânicas, incluindo espécies de brássicas, euforbiáceas, cucurbitáceas, leguminosas, solanáceas, plantas ornamentais e daninhas (Brown *et al.*, 1995), sendo que plantas daninhas ocupam papel importante na manutenção de populações de *Bemisia*, bem como reservatório de espécies virais. Várias espécies de plantas daninhas, dentre as quais *Crotalaria incana*, *Datura stramonium*, *Stachytarphetta cayenensis*, *Galinsoga ciliata*, *Leonotis nepetaefolia*, *Acanthospermum australe*, *Acanthospermum hispidum*, *Physalis angulata*, *Richardia scabra*, *Gomphrena celosiodies*, *Lepidium virginicum*, *Solanum americanum*, *Sida*

urens, *Senna obtusifolia*, *Chenopodiumambrosioides* e *Euphorbia heterophylla* contribuem para manutenção de populações deste inseto (Villas Boas *et al.*, 2003).

Este aleirodídeo apresenta metamorfose incompleta, pois passa pela fase de ovo, quatro estágios de ninfa (sendo o último também chamado de “pupa” ou “pseudo-pupa”) e adulto. O aparelho bucal desse inseto é do tipo sugador (Villas Bôas *et al.*, 1997; de Barro *et al.*, 2005). Os adultos da mosca-branca se caracterizam por possuírem dois pares de asas membranosas, recobertos por uma substância pulverulenta de cor branca, corpo amarelo-pálido recoberto por cera extra-cuticular e tamanho variando de 1 a 2 mm de comprimento, sendo as fêmeas maiores que os machos. Todos os estádios habitam a face inferior das folhas e apenas o adulto é capaz de migrar até novas plantas (Villas Boas *et al.*, 1997).

Sob condições de campo em regiões de clima quente a mosca-branca é capaz de completar seu ciclo biológico no período de duas a três semanas (de Barro *et al.*, 2005). A reprodução pode ser sexuada, sendo a prole de machos e de fêmeas, ou partenogenética do tipo arrenótoca, originando apenas machos. A fêmea coloca de 100 a 300 ovos durante sua vida (Villas Bôas *et al.*, 1997). A duração de cada fase do ciclo de vida, bem como a duração do ciclo ovo-adulto da mosca-branca podem ser influenciadas pela planta hospedeira (Villas Bôas *et al.*, 2002), e também pela temperatura (Araújo *et al.*, 2002). Além disso, a longevidade do inseto adulto também vai depender da alimentação (planta hospedeira) e da temperatura, sendo que a longevidade do macho é mais curta que a da fêmea (Villas Bôas *et al.*, 1997).

No Brasil, a presença de *Bemisia tabaci* foi relatada ainda em 1928 sobre *Euphorbia pulcherrima* no estado da Bahia (Bondar, 1928; Lima *et al.*, 2000) e no começo dos anos 60 havia se tornado uma importante praga na agricultura (Lima *et al.*, 2002).

A partir de 1950, observou-se a existência de diferentes biótipos de *Bemisia tabaci*, ou seja, populações de insetos morfologicamente idênticos possuindo diferentes hospedeiras e capacidade de transmissão viral. (Ahmed *et al.*, 2009; Bird *et al.*, 1978). Atualmente, variações em biótipos têm sido descritas em termos de gama de hospedeiros, comportamento na dispersão, resistência a inseticidas e transmissão de begomovírus (Berry *et al.*, 2004). O complexo encontra-se formado por aproximadamente 41 biótipos (de Barro *et al.*, 2005) sendo que o mais adaptado e mais amplamente distribuído é o biótipo B [anteriormente descrito como *Bemisia argentifolli* Bellows & Perring] (Perring, 2001).

O biótipo B de *B. tabaci* foi descrito inicialmente nos EUA no começo de 1980 (Costa & Brown, 1990) e introduzido no Brasil no começo da década de 90, tendo sido reportado em 1991/1992 em São Paulo (Lourenção & Nagai, 1994). Villas Bôas *et al.* (1997) e Haji *et al.* (1997) reportaram para o ano de 1993, a presença deste biótipo associado a sintomas de begomovírus em culturas de tomate e repolho em áreas do Brasil Central. Nos últimos anos, o biótipo B vem se espalhando por vários estados do Brasil causando severas perdas (Villas Bôas, 2000; Rocha *et al.*, 2011).

De acordo com vários pesquisadores a introdução no Brasil do biótipo B de *Bemisia tabaci* no início da década de 1990 contribuiu significativamente para o aumento na incidência e severidade das ‘begomoviroses’, bem como, para o aumento na diversidade de espécies e número de recombinantes entre elas (França *et al.*, 1996; Ribeiro *et al.*, 2003 e Inoue-Nagata *et al.*, 2006). Um fator que pode ter contribuído também para o aumento da incidência e severidade de *Begomovirus* em tomate pode ter sido a expansão da soja (hospedeira do vetor) no Centro-Oeste. O biótipo B tem um círculo de plantas hospedeiras bem amplo, causa grandes danos em diversas culturas e é muito eficiente na transmissão de várias espécies de *Begomovirus* existentes no Brasil, fato importante, visto que, a capacidade de dispersão e a variabilidade genética de espécies de *Begomovirus* parece estar diretamente associada com a capacidade de transmissão das espécies virais pelo inseto vetor *B. tabaci*.

Outro biótipo que vem atraindo a atenção nos últimos anos é o biótipo Q, exótico para o Brasil. O biótipo Q é extremamente importante devido à semelhança com o biótipo B e por estes dois biótipos coexistirem em algumas áreas do mundo (Moya *et al.*, 2001). Originário da Espanha, o biótipo Q logo se espalhou pela região mediterrânea (Brown, 2000; Moya *et al.*, 2001; Marín, 2004), China (Chu *et al.*, 2001), Japão (Ueda & Brown, 2006), México, Estados Unidos e Guatemala (Brown, 2007) e Nova Zelândia (Scott *et al.*, 2007). O biótipo Q é também caracterizado por um comportamento polífago e por maior resistência a inseticidas, como neonicotinóides e piriproxifem (Horowitz *et al.*, 2005., Wilson *et al.*, 2007., Karunker *et al.*, 2008.).

Os biótipos B e Q diferem em diversas características, como fecundidade, desenvolvimento inferior e superior, e taxas de desenvolvimento. (Muniz, 2000; Muniz & Nombela, 2001). Recentemente, devido à introdução através do comércio internacional de plantas ornamentais, o biótipo Q tem sido relatado nos Estados Unidos (Dennehy *et al.*, 2005), México (Martinez-Carrillo & Brown, 2007), Guatemala (Brown, 2007), China (Zhang *et al.*, 2005), Coréia (Lee *et al.*, 2005), Taiwan (Hsieh *et*

al., 2007) e Japão (Ueda & Brown, 2006) e até o presente momento não existe relato deste biótipo no Brasil.

Acredita-se que os biótipos B e Q da *B. tabaci* passaram por divergência alopática (geográfica), seguido por contato secundário (Moya *et al.*, 2001;. De Barro *et al.*, 2005), entretanto o efeito da divergência geográfica anterior no atual grau de fluxo gênico entre os dois biótipos não é clara. Em Israel, por exemplo, o monitoramento indicou que populações B e Q são frequentemente encontrados lado a lado (por vezes na mesma planta) em vários locais (Horowitz *et al.*, 2003). Pascual (2006) relatou o acasalamento em laboratório entre os biótipos B e Q, os dois biótipos são capazes de produzir fêmeas viáveis F1 (Round *et al.*, 2000; Ma *et al.*, 2004), porém as fêmeas geradas por esse cruzamento são estéreis, impossibilitando a geração de F2 (Ma *et al.*, 2004). Segundo Elbaz (2009) provavelmente, os biótipos B e Q são reprodutivamente isolados mesmo realizando o acasalamento entre biótipos.

Devido às limitações na identificação morfológica dos biótipos de *Bemisia tabaci* várias técnicas moleculares têm sido empregadas, dentre elas RAPD-PCR (de Barro & Driver 1997, Lima *et al.*, 2002) tem sido considerada uma técnica eficiente, principalmente, quando usada em conjunto com enzimas de restrição, sendo capaz de produzir padrões que permitem separar claramente os biótipos B, Q, M, S e T. Além disto, primers mitocondriais podem ser utilizados para separação de alguns biótipos.

De modo geral, o relacionamento entre espécies de *Begomovirus* e *Bemisia tabaci* tem sido amplamente estudado, entretanto muitas destas relações apresentam-se complexas. De acordo com revisão publicada por Hogenhout *et al.* (2008) pode haver ou não: replicação do vírus no inseto vetor, transmissão para a progênie e efeitos na fecundidade e longevidade do vetor. De acordo com esta revisão *Tomato yellow leaf curl virus* aparentemente replica-se no vetor e reduz a sua longevidade. O contrário ocorre para *Tomato mottle virus* (ToMoV) (Sinisterra *et al.*, 2005; Rubinstein *et al.*, 1997).

Estudos têm demonstrado ainda a importância de homólogos de proteínas chaperonas (Groel), produzidas por bactérias endossimbiontes de *Bemisia tabaci* na transmissão de *Begomovirus*.

Os primeiros estudos de endossimbiontes interferindo na transmissão de vírus de plantas foram realizados com o luteovírus *Potato leafroll virus* (PLRV) (gênero *Polerovirus*, família *Luteoviridae*). Foi demonstrado que a transmissão depende de um homólogo da Groel (63-KDa) produzido pelo endossimbionte (*Buchnera* sp.) de *Myzus*

persicae. Homólogos da Groel, sintetizados por esta bactéria, além de terem sido encontrados em grande quantidade na hemolinfa do inseto, foram essenciais para persistência de luteovírus no corpo de *M. persicae*. Outros luteovírus e o TYLCV mostraram ainda alta especificidade por homólogos da Groel. Para TYLCV, após tratamentos com antissoro específico para Groel foi observada diminuição dos níveis destes homólogos no corpo do vetor, bem como perda da integridade capsidial e inibição da transmissão destes vírus (Morin *et al.*, 1999).

Praticamente todas as espécies de mosca-branca abrigam bactérias como simbioses primários e variados simbioses secundários os quais influenciam em vários aspectos da biologia do inseto.

Simbioses e insetos

Associação de bactérias simbioses são extremamente comuns entre invertebrados, sendo imensa a capacidade desses simbioses em alterar a biologia de seus hospedeiros. Os simbioses podem influenciar desde aspectos reprodutivos a nutrição de seus hospedeiros e até mesmo a locomoção, além de alguns casos, beneficiarem a competição interespecífica (Brownlie *et al.*, 2007). Nesta associação, a bactéria estabelece um tipo de infecção que persiste no hospedeiro, e muitos invertebrados carregam bactérias simbioses durante todo o seu ciclo de vida, transmitindo-as vertical e/ou horizontalmente (Bright & Bulgheresi, 2010).

As relações de simbiose podem ser de mutualismo, comensalismo, competição e parasitismo, sendo que cada interação pode ser benéfica ou prejudicial para o hospedeiro ou para o simbiote em diferentes fases de sua vida ou frente às mudanças nas condições ambientais (Klepzing *et al.*, 2009). Estudos sobre simbiose tornaram-se tema importante na biologia porque a simbiose atinge várias áreas como os mecanismos de evolução, co-adaptação e especiação (Stouthamer *et al.*, 1999; Currie, 2001) relação planta-herbívoro e interação tritróficas, comunicação animal e organização social (Richard *et al.*, 2007), dinâmica de populações (Hofstetter *et al.*, 2006), invasão biológica (Mota *et al.*, 2006) e manejo de pragas (Hosokawa *et al.*, 2010).

Em insetos, os simbioses podem ser vírus, fungos ou bactérias, localizando-se externa (ectossimbiote) ou internamente (endossimbioses) ao corpo do hospedeiro. Os endossimbioses podem ser extra ou intracelulares, sendo os últimos denominados endocitobioses (Moran, 2008).

Bemisia tabaci pode abrigar endossimbiontes primários e secundários e a especificidade de endossimbiontes pode diferir de acordo com o biótipo. Praticamente todas as espécies de mosca-branca abrigam bactérias como simbiontes primários e variados simbiontes secundários os quais influenciam em vários aspectos da biologia do inseto (Baumann *et al.*, 2000).

Endossimbiontes primários, ou obrigatórios, são morfologicamente semelhantes entre si, encontram-se localizados nos bacteriócitos e apresentam uma relação muito estreita com o inseto; endossimbiontes secundárias são morfologicamente diferentes e não se restringem a bacteriócitos, estando presente em quase todos os tipos de células do inseto hospedeiro e não apresentam relações tão estreitas como os primários (Baumann *et al.*, 2000; Buchner, 1965).

Diferentes endossimbiontes têm sido descritos em associação com diferentes biótipos e populações de *B. tabaci* e podem interferir na transmissão de viroses de plantas (Gottlieb *et al.*, 2006; Gottlieb *et al.*, 2010).

Vários relatos feitos até então mostraram que praticamente todas as espécies de mosca-branca abrigam o endossimbionte primário “*Candidatus* Portiera aleyrodidarum”, responsável por suplementar à dieta do floema com alguns nutrientes. (Thao & Baumann, 2004). Vários outros endossimbiontes são reportados em populações de *Bemisia tabaci* ao redor do mundo incluindo *Candidatus* Hamiltonella, *Wolbachia*, *Arsenophonus*, *Cardinium*, *Fritschea bemisiae* e *Rickettsia* sendo conhecido que existem diferenças dependendo do tipo de biótipo em questão (Gottlieb *et al.*, 2010).

Recentemente Gottlieb *et al.* (2010) compararam os endossimbiontes primário (“*Candidatus* Portiera aleyrodidarum”) e secundários *Hamiltonella*, *Arsenophonus*, *Fritchea*, *Wolbachia*, e *Cardinium* spp dos biótipos B e Q de *Bemisia tabaci*, além correlacionarem a presença do endossimbionte *Hamiltonella* com uma maior eficiência na transmissão viral

Endossimbiontes apresentam uma variedade de efeitos nas suas hospedeiras, como aumento da resistência ao parasitismo de vespas, influência no tipo de reprodução do inseto, transmissão de vírus e melhor adaptabilidade, além de apresentarem diferentes padrões de localização no corpo dos insetos (Oliver *et al.*, 2003).

Wolbachia, *Rickettsia*, *Arsenophonus* e *Cardinium* estão relacionadas à reprodução de suas hospedeiras através de vários mecanismos (Werren *et al.*, 1986; Gherna *et al.*, 1991; Zchori-Fein & Perlman, 2004; Dale & Moran, 2006).

Hamiltonella confere resistência a parasitóides do afídeo *Acyrtosiphon pisum* (Oliver *et al.*, 2003; Ferrari *et al.*, 2004; Bensadia *et al.*, 2005) e aumenta a eficiência de *Bemisia tabaci* como vetora de vírus (Gottlieb *et al.*, 2010).

Rickettsia em *B. tabaci* confere resistência a estresse de temperatura (Brumin *et al.*, 2011) e proporciona maior “fitness” a mosca-branca (Himler *et al.*, 2011).

Com relação à localização de simbioses pesquisas recentes de levantamento de endossimbiontes secundários nos aleirodídeos *Bemisia tabaci*, *Trialeurodes vaporariorum* e *Siphoninus phillyreae* em diferentes locais mostraram diferenças quanto aos endossimbiontes *Rickettsia*, *Wolbachia*, *Cardinium*, *Hamiltonella* e *Arsenophonus*, sendo que a detecção múltipla de endossimbiontes foi comum nas três espécies de insetos avaliadas. Estudos de hibridização *in situ* mostraram padrões de localização de *Hamiltonella* em *S. phillyreae* e morfologia de bacteriócitos diferente do que já observado para outras espécies de *Bemisia* (Skalljacet *et al.*, 2012).

Apesar de endossimbiontes de moscas-brancas terem sido intensamente estudados após o seu primeiro relato por Buchner em 1965, a relação entre *B. tabaci* e seus endossimbiontes é mal compreendida em parte devido à dificuldade técnica envolvida na cultura da maioria dos endossimbiontes fora de seus hospedeiros de insetos (Wilkinson, 1998).

O papel de endossimbiontes em seus hospedeiros insetos pode ser esclarecido após a inativação *in vivo* por antibióticos. Se um antibiótico substancialmente inibe um endossimbionte, poderia ser usado para determinar o efeito do endossimbionte em que *B. tabaci*.

Antibióticos como tetraciclina, ampicilina e rifampicina podem ser utilizados e sua ação dependerá da espécie de endossimbionte, antibiótico, biótipo de *Bemisia tabaci* e interação entre estes fatores. Tetraciclina quimicamente é derivada da naftaceno-carboxamida policíclica, núcleo tetracíclico. Ampicilina é um polímero de aminopenicilina, betalactâmico com um grupo fenil (grupo das penicilinas) e a rifampicina pertence ao grupo das rifamicinas.

Segundo Muhammad *et al.*, (2010) o endossimbionte primário “*Candidatus Portiera aleyrodidarum*” permanece após tratamento com estes 3 antibióticos, mas os mesmos agem de formas distintas em diferentes biótipos de *Bemisia* que apresentaram por exemplo os endossimbiontes secundários *Arsenophonus* e *Wolbachia*.

Até o momento não existe nenhum estudo de identificação, diversidade e localização de endossimbiontes de *Bemisia tabaci* no Brasil, nem correlação entre

distintas populações de *Bemisia* e seus endossimbiontes na eficiência de transmissão de espécies de *Begomovirus*.

A caracterização da comunidade bacteriana em diferentes populações de *B. tabaci* é crucial para a compreensão de vários aspectos da biologia do inseto, tais como o surgimento de biótipos mais agressivos e a variação na capacidade de transmissão de vírus de plantas (Morin *et al.*, 1999). Além disso, a identificação da predominância de determinados endossimbiontes associados com diferentes culturas e regiões geográficas é essencial para o conhecimento da diversidade dos mesmos e estudos futuros sobre a possível influência na transmissão de viroses. Tem sido sugerido que alguns endossimbiontes bacterianos de *Bemisia tabaci* podem desempenhar um importante papel na transmissão viral, o que pode auxiliar no entendimento da interação vírus-vetor, bem como, auxiliar no desenvolvimento de estratégias de controle (Baumann, 2005; Gottlieb *et al.*, 2006; Gottlieb *et al.*, 2010). Sabe-se que podem existir diferenças quanto à transmissão viral dentro de populações de *Bemisia tabaci* biótipos B provenientes de locais diferentes e que apresentam distintos endossimbiontes no inseto.

A co-localização e a sub-localização de endossimbiontes vem sendo estudadas com o auxílio do microscópio confocal de fluorescência por varredura laser (confocal) (Gottlieb *et al.*, 2006).

O confocal utiliza a fluorescência para a aquisição das imagens. A fluorescência é um tipo de luminescência (emissão de luz) em que um corpo absorve luz e após um curto intervalo de tempo re-emite essa luz. Dependendo da fonte de energia, a luminescência pode ser do tipo eletroluminescência, radioluminescência, quimioluminescência ou fotoluminescência, onde a última ocorre quando a fonte de energia são fótons. Esse é o princípio da microscopia de fluorescência, na qual compostos químicos chamados fluoróforos são usados para produzir a fluorescência do material em estudo. A técnica de microscopia de fluorescência consiste justamente em captar os fótons emitidos e com ele gerar uma imagem (UNICAMP 2012).

O confocal utiliza uma fonte de laser para promover a excitação dos fluoróforos. Através de um conjunto de lentes o microscópio é capaz de focar um cone de luz laser em uma profundidade predeterminada da amostra a ser estudada. Ao retornar pelo mesmo caminho óptico, a luz devida à fluorescência é separada utilizando-se um conjunto de espelhos chamados divisor de luz. Em seguida a luz separada passa por um pequeno orifício, chamado pinhole, capaz de separar apenas a luz proveniente do ponto focado, eliminando a luz emitida por pontos fora de foco. Com isso só a luz dos pontos

em foco é registrada, com a ajuda de tubos fotomultiplicadores. Estes sinais gerados pelas fotomultiplicadoras são processados por um computador e assim imagens bidimensionais extremamente precisas podem ser construídas. O inconveniente desta técnica é a degradação dos fluoróforos, o que leva à utilização do confocal para o estudo de fenômenos mais rápidos, no caso de espécimes vivos, ou para estudar detalhes internos das células em espécimes vivos ou fixados(UNICAMP 2012).

Objetivos

Os principais objetivos deste projeto foram:

- A) Identificar endossimbiontes em populações de *B. tabaci* de vários locais (Distrito Federal e Entorno) e plantas hospedeiras,
- B) Localizar alguns endossimbiontes de *Bemisia tabaci* biótipo B.

CAPÍTULO 2

Levantamento e localização de alguns endossimbiontes de *Bemisia tabaci*

Introdução

Bemisia tabaci, popularmente conhecida como mosca-branca (**Figura 1**) está amplamente distribuída em regiões tropicais e subtropicais e é considerada uma das mais destrutivas pragas para a agricultura (Brown, 1994 e Polston & Anderson 1999).



Figura 1- Adulto de *Bemisia tabaci*

Estes insetos causam grandes danos diretos ao se alimentarem da seiva do floema (o que pode resultar em mais de 50% de perdas de produção). Além disso, excretam uma substância açucarada que permite o crescimento de fungos capnodiáceos e podem causar a isoporização dos frutos. Como danos indiretos funcionam como vetores de várias espécies virais, incluindo espécies de *Begomovirus* (Louro, 2004; Brown, 2007).

Espécies de *Begomovirus* causam grandes perdas no Brasil e no mundo, em diversas plantas, incluindo o tomateiro. As espécies que infectam tomateiro no Brasil são denominadas de bipartidas, por apresentarem dois componentes genômicos A e B, enquanto as monopartidas apresentam apenas um componente genômico.

Bemisia tabaci apresenta hábito alimentar polífago com pelo menos 600 espécies de plantas hospedeiras em 74 famílias botânicas (Brown *et al.*, 1995), incluindo plantas daninhas, que, ocupam papel de reservatório de espécies virais.

Bemisia tabaci foi originalmente descrita em 1889 na Grécia como *Aleyrodestabaci* com base em exemplares coletados em plantas de fumo e disseminou-se por todos os continentes, não sendo constatada sua presença apenas na Antártica (Morales, 2001; Perring, 2001).

Acredita-se que o gênero *Bemisia* tenha como provável centro de origem o Oriente, entretanto, existem dúvidas (Brown *et al.*, 1995). A primeira ocorrência de *B. tabaci* no Novo Mundo foi feita em 1897 em cultura de batata doce (*Ipomoea batatas*) nos Estados Unidos.

No Brasil, a presença de *Bemisia tabaci* foi relatada ainda em 1928 sobre *Euphorbia pulcherrima* Willd. no estado da Bahia (Bondar, 1928) e no começo dos anos 60 havia se tornado uma importante praga na agricultura (Lima *et al.*, 2002).

A partir da década de 50, foi proposta a existência de raças ou biótipos de *B. tabaci* devido à observação de que populações morfologicamente idênticas podiam

apresentar características distintas quanto à transmissão de vírus e colonização de plantas (Brown *et al.*, 1995).

A partir do final da década de 1990 foram observadas elevadas populações da mosca-branca *Bemisia tabaci* biótipo B em plantações de hortaliças e ornamentais na região de Campinas-SP e vários trabalhos tem sido publicados mostrando que este é o biótipo que predomina no Brasil (Villas Bôas, 2000; Rocha *et al.*, 2011).

Sabe-se que a relação estabelecida entre vírus e vetor é do tipo circulativa não propagativa, de maneira que o vírus após circular pelo corpo do inseto atinge as glândulas salivares para ser, então, inoculado durante o processo de alimentação.

As fêmeas de *B. tabaci* são capazes de transmitir *Tomato yellow leaf curl virus* - TYLCV (begomovírus monopartido) mais eficientemente que os machos (Cohen & Nitzany, 1966 e Caciagli *et al.*, 1995) e tanto larvas como adultos podem adquirir o vírus. Estudos têm mostrado ainda a transmissão entre indivíduos (transmissão horizontal) e para progênie (transmissão vertical) de algumas espécies de *Begomovirus* por *Bemisia tabaci* biótipo B.

Estudos têm demonstrado ainda a importância de homólogos de proteínas chaperonas (Groel), produzidas por bactérias endossimbiontes de inseto na transmissão de vírus membros de *Begomovirus* e *Polerovirus* (*Luteoviridae*) (Morin *et al.*, 1999).

Bemisia tabaci pode abrigar endossimbiontes primários e secundários e a especificidade de endossimbiontes pode diferir de acordo com o biótipo e vários estudos têm mostrado que diferentes endossimbiontes podem estar associados com diferentes biótipos e populações de *B. tabaci*, podendo interferir na transmissão de vírus de plantas.

De acordo com vários relatos feitos até então praticamente todas as espécies de mosca-branca abrigam o endossimbionte primário “*Candidatus Portiera aleyrodidarum*”, responsável por suplementar à dieta do floema com alguns nutrientes. Vários outros endossimbiontes são reportados em populações de *Bemisiatabaci* ao redor do mundo incluindo “*Candidatus Hamiltonella defensa*”, *Wolbachia*, *Arsenophonus*, *Cardinium*, *Fritschea bemisiae* e *Rickettsia* sendo conhecido que existem diferenças dependendo do tipo de biótipo em questão.

Endossimbiontes apresentam uma variedade de efeitos nas suas hospedeiras, como aumento da resistência ao parasitismo de vespas, influência no tipo de reprodução do inseto, transmissão de vírus e melhor adaptabilidade, além de apresentarem diferentes padrões de localização no corpo dos insetos.

No Brasil existe uma lacuna na área de estudos sobre *Bemisia tabaci* e seus endossimbiontes. Assim, a identificação inicial dos endossimbiontes em populações de *Bemisia tabaci* biótipo B (região do Entorno do Distrito Federal-DF) e estudos de localização destes endossimbiontes no corpo dos vetores é crucial para o conhecimento destes organismos. Esta será a primeira vez no Brasil (e também América do Sul) que realiza-se estudos de localização de endossimbiontes em *Bemisia tabaci*.

Material e métodos

1- Levantamento de endossimbiontes

1.1- Locais de coleta

Amostras de *Bemisia tabaci* foram coletadas em diversas plantas hospedeiras do vetor em diferentes localidades do Distrito Federal e Entorno (**Tabela 1**). As amostras foram armazenadas em etanol 70% para posterior extração de DNA genômico.

Tabela 1- Lista das hospedeiras (nome comum e científico), locais das coletas e coletor.

Amostras	Cultura	Nome Científico	Local¹	Coletor
1	Soja	<i>Glycine max</i>	PAD/DF Pta 345	Inoue-Nagata
2	Tomate	<i>Solanum lycopersicum</i>	PAD/DF Pta 328	Inoue-Nagata
3	Feijão	<i>Phaseolus vulgaris</i>	PAD/DF Pta 328	Inoue-Nagata
4	Soja	<i>Glycine max</i>	PAD/DF Pta 351	Inoue-Nagata
5	Couve	<i>Brassica oleracea</i>	EEB-UnB	Rocha
6	Bela-emília	<i>Emilia sonchifolia</i>	EEB-UnB	Rocha
7	Chuchu	<i>Sechium edule</i>	EEB-UnB	Rocha
8	Jiló	<i>Solanum gilo</i>	EEB-UnB	Rocha
10	Serralha verdadeira	<i>Sonchus oleraceus</i>	EEB-UnB	Rocha
11	Soja	<i>Glycine max</i>	EEB-UnB	Rocha
12	Melancia	<i>Citrullus vulgaris Schrad</i>	EEB-UnB	Rocha
13	Mostarda	<i>Sinapsis Alba</i>	EEB-UnB	Rocha
14	Soja	<i>Glycine max</i>	PAD/DF	Ivan
15	Batata	<i>Solanum tuberosum</i>	PAD/DF	Ivan
16	Bela-emília	<i>Emilia sonchifolia</i>	Asa Norte	Costa
17	Videira	<i>Vitis SP</i>	Pipiripau	Ivan
18	Tomate	<i>Solanum lycopersicum</i>	Brazilândia	Souza
19	Couve-flor	<i>Brassica oleracea</i>	Taquara	Ivan
20	Mentrasito	<i>Ageratum conyzoides</i>	CNPH	Pereira- Carvalho
21	Couve diferente	<i>Brassica oleracea</i>	EEB-Fructicultura	Pereira- Carvalho
22	Tomate	<i>Solanum lycopersicum</i>	IB-Unb	Nogueira
23	Corda -de-viola	<i>Ipomeia grandifolia</i>	EEB-Fructicultura	Pereira- Carvalho
24	Couve	<i>Brassica oleracea</i>	EEB-Fructicultura	Pereira- Carvalho
25	Chichá	<i>Sterculia strita</i>	FAL	Pereira- Carvalho
26	Crambe	<i>Crambe abyssinica</i>	EEB-Fructicultura	Pereira- Carvalho

27	Alface	<i>Lactuca sativa</i>	CENARGEN	Rosa Pereira- Carvalho
28	Bela-emília	<i>Emilia sonchifolia</i>	CENARGEN	Pereira- Carvalho
29	Erva-de-touro	<i>Tridax procumbens</i>	CENARGEN	Pereira- Carvalho
30	Sida	<i>Sida rhombifolia</i>	CENARGEN	Pereira- Carvalho
31	Fevillea	<i>Fevillea cordifolia</i>	EEB-UnB	Pereira- Carvalho
32	Espirradeira	<i>Nerium oleander</i>	Sobradinho	Érica

¹PAD/DF: Programa de assentamento dirigido do Distrito Federal; EEB: Estação Experimental de Biologia; UNB: Universidade de Brasília; CNPH: Centro Nacional de Pesquisa e Hortaliça; IB: Instituto de Ciências Biológicas; FAL: Fazenda Água Limpa e CENARGEN: Centro Nacional de Recursos Genéticos

1.2-Extração de DNA genômico

O DNA genômico das populações de mosca-branca foi obtido com base no protocolo seguido por Aljanabi *et al.* (1997) e Santos *et al.* (2003) com algumas adaptações. Após inúmeras tentativas de ajuste de protocolo, o DNA de apenas uma mosca-branca foi obtido com sucesso ao modificar o volume de Proteinase K (50 μ L /mL), de 1 μ L para 3,5 μ L. Outro ajuste foi feito na retirada do sobrenadante, onde o mesmo só foi retirado após a centrifugação com Clorofane.

Para realização destes testes procedeu-se a coleta de moscas-brancas avirulíferas provenientes da criação avirulífera mantida em repolho na Estação Experimental de Brasília.

A extração de DNA foi realizada utilizando 1, 2, 3, 4, ou 5 indivíduos coletados de cada amostra. Os espécimes foram removidos do etanol 70% e colocados no interior de tubos de 1,5 mL. O(s) inseto(s) foi (foram) macerado(s) com pistilo plástico devidamente autoclavado. A seguir 3,5 μ L de Proteinase K (50 μ L /ml) foram adicionados e o material foi levado ao banho-maria a 65°C por 30' e em seguida deixados a temperatura ambiente por 3'. Acrescentou-se 3,5 μ L de Acetato de Potássio 8M. As amostras foram levadas ao -20°C por 30' e posteriormente centrifugadas. Foram adicionados 200 μ L de Clorofane (Clorofórmio: Fenol na proporção de 1:1) e centrifugou-se o material por mais 13'. O sobrenadante foi retirado cuidadosamente e 500 μ L de Etanol Absoluto foram adicionados. As amostras foram então levadas ao -80°C por 15', para a precipitação do DNA, e em seguida centrifugadas por 15'. O Etanol foi descartado e o DNA lavado com 50 μ L de Álcool 70% e os tubos colocados para secar a temperatura ambiente. O DNA foi ressuspenso com 20 μ L de água milliq por espécime e armazenado no -20°C.

A concentração do DNA extraído foi medida em nanodrop (**Tabela 2**). Um microlitro de DNA de cada amostra foi colocado sobre o leitor do aparelho e em seguida os dados obtidos foram salvos.

.Tabela 2 – DNA (ng/uL)

Cultura	Nome científico	Amostra	ng/uL	Cultura	Nome científico	Amostra	ng/uL
Couve	<i>Brassica oleracea</i>	9-5.1	73,71	Couve-flor	<i>Brassica oleracea</i>	34-19.3	23,11
Couve	<i>Brassica oleracea</i>	9-5.3	79,02	Mentrasto	<i>Ageratum conyzoides</i>	35-20.1	5,78
Bela-emília	<i>Emilia sonchifolia</i>	11-6.1	264,83	Mentrasto	<i>Ageratum conyzoides</i>	36-20.3	17,87
Bela-emília	<i>Emilia sonchifolia</i>	12-6.4	43,67	Couve diferente	<i>Brassica oleracea</i>	37-21.1	4,84
Chuchu	<i>Sechium edule</i>	13-7.1	13,58	Couve diferente	<i>Brassica oleracea</i>	38-21.3	3,12
Chuchu	<i>Sechium edule</i>	14-7.3	34,95	Tomate	<i>Solanum lycopersicum</i>	39-22.1	10,15
Jiló	<i>Solanum gilo</i>	15-8.1	23,39	Tomate	<i>Solanum lycopersicum</i>	40-22.3	13,81
Jiló	<i>Solanum gilo</i>	16-8.3	29,11	Corde -de-viola	<i>Ipomea grandifolia</i>	41-23.1	204,19
Serralha verdadeira	<i>Sonchus oleraceus</i>	17-10.1	92,51	Corde -de-viola	<i>Ipomea grandifolia</i>	42-23.3	68,91
Serralha verdadeira	<i>Sonchus oleraceus</i>	18-10.3	44,22	Couve	<i>Brassica oleracea</i>	43-24.1	19,31
Soja	<i>Glycine Max</i>	19-11.1	34,58	Couve	<i>Brassica oleracea</i>	44-24.3	31,29
Soja	<i>Glycine Max</i>	20-11.3	24,18	Chichá	<i>Sterculia strita</i>	45-25.1	5,34
Melancia	<i>Citrullus vulgaris</i>	21-12.1	63,72	Chichá	<i>Sterculia strita</i>	46-25.3	10,13
Melancia	<i>Citrullus vulgaris</i>	22-12.3	197,05	Crambe	<i>Crambe abyssinica</i>	47-26.1	43,49
Mostarda	<i>Sinapsis Alba</i>	23-13.1	54,45	Crambe	<i>Crambe abyssinica</i>	48-26.2	19,87
Mostarda	<i>Sinapsis Alba</i>	24-13.3	56,65	Alface	<i>Lactuca sativa</i>	49-27.1	26,46
Soja	<i>Glycine Max</i>	25-14	8,92	Alface	<i>Lactuca sativa</i>	50-27.3	86,27
Batata	<i>Solanum tuberosum</i>	26-15	6,34	Bela-emília	<i>Emilia sonchifolia</i>	51-28.1	83,84
Bela-emília	<i>Emilia sonchifolia</i>	27-16.1	5,62	Bela-emília	<i>Emilia sonchifolia</i>	52-28.3	84,54
Bela-emília	<i>Emilia sonchifolia</i>	28-16.2	22,62	Erva-de-touro	<i>Tridax procumbens</i>	53-29	63,14
Videira	<i>Vitis SP</i>	29-17.1	1,9	Sida	<i>Sida rhombifolia</i>	54-30.1	67,22
Videira	<i>Vitis SP</i>	30-17.3	6,2	Sida	<i>Sida rhombifolia</i>	55-30.3	748,95
Tomate	<i>Solanum lycopersicum</i>	31-18.1	6,33	Fevillea	<i>Fevillea cordifolia</i>	56-31.1	13,5
Tomate	<i>Solanum lycopersicum</i>	32-18.2	7,03	Espirradeira	<i>Nerium oleander</i>	57-31.3	81,74
Couve-flor	<i>Brassica oleracea</i>	33-19.1	10,57	Espirradeira	<i>Nerium oleander</i>	58-32.1	7,4
				Espirradeira	<i>Nerium oleander</i>	59-32.3	21,54

1.3- Amplificação de DNA

1.3.1 PCR

As ampliações para biótipo, endossimbiontes “*Candidatus* Portiera aleyrodidarum”, *Wolbachia*, *Hamiltonella* e begomovírus foram feitas mediante ao uso de primers específicos (**Tabela 3**). Os amplicóns foram obtidos através de reações de PCR com volume final de 12,5 µL contendo Tris-HCL 10 mM (pH 8,3), KCL 50mM, MgCL₂ 2,4 mM, 250 µM de cada um dos desoxirribonucleotídeos (dATP, dTTP, dGTP, dCTP), 0,8 µM de cada ‘primer’, uma unidade da enzima Taq polimerase. Utilizou-se 1 uL de DNA (as concentrações foram variáveis e encontram-se listadas na **Tabela 2**). As ampliações foram efetuadas em termociclador rPTC-100tm Programmable Thermal Contriller e BIO RAD C1000TM Thermal Cycle programado e as condições de cada reação encontram-se descritas na **Tabela 3**.

Tabela 3- Primers utilizados para detecção de endossimbiontes de *Bemisia tabaci* e vírus.

Endossimbiontes	Primers ⁴	Sequência 5'-3'	Tamanho	Ciclos
" <i>Candidatus Portiera aleyrodidarum</i> " ¹	F28 R 1098	TGCAAGTCGAGCGGC AAAGTTCCCGCCTTATGCGT	1000-1100	95°C (5') seguido de 30 ciclos: 95°C (1'), 54°C (1') e 72°C (1') e uma extensão final de 72°C por 7'.
<i>Wolbachia</i> ¹	F wsp81 R wsp691	TGGTCCAATAAGTGATGAAGAA AC AAAAATTAACGCTACTCCA	590-625	95°C por (5') seguido de 35 ciclos: 95° C (1'), 50° C(30'') e 72° C (1') e uma extensão final de 72 ° C por 7'.
<i>Hamiltonella</i> ¹	F ham R ham	TGAGTAAAGTCTGGGAATCTGG AGTTCAAGACCGCAACCTC	700	94° C por (2') seguido de 35 ciclos de 94° C (30''), 60° C (30'') e 72° C (1') e uma extensão final de 72° C por 7'.
<i>Begomovirus</i> ²	FPAL1v1978 RPARc715	GCATCTGCAGGCCCAACTYGTCT TTYCCNGT GATTTCTGCAGTTDATRTTYTCR TCCATCCA	1100	94° C por 4' seguido de 35 ciclos de 94° C (30''), 53° C (30'') e 72° C (3') e uma extensão final de 72° C por 7'.
COI ³	MTD-10 MTD-12	TTG ATT TTT TGG TCA TCC AGA AGT TCC AAT GCA CTA ATC TGC CAT ATT A	~800	94° C por 4' seguido de 35 ciclos de 94° C (30''), 53° C (30'') e 72° C (3') e uma extensão final de 72° C por 7'.

¹Zchori-fein *et al.*, 2004; ²Rojas *et al.*, 1993 e ³Frohlich *et al.*, 1999 e ⁴F: Forward e R: Reverse.

Os produtos de amplificação foram visualizados em transiluminador após eletroforese em gel de agarose a 1%, corrido em tampão TBE (Tris-Borato 45mM e 1mM EDTA) 0,5X e corados em solução de Brometo de etídeo 1 ug/mL. Amplicóns do tamanho esperado para cada primer foram purificados com o kit Purelink. Os produtos da purificação também foram visualizados em transiluminador após eletroforese em gel de agarose a 1%, corrido em tampão TBE 0,5X e corados em solução de Brometo de etídeo. Após a quantificação no nanodropos produtos das purificações foram enviados para sequenciamento na Embrapa CNPH.

As seqüências serão comparadas e analisadas em software DNA STAR.

1.4 - Localização de bactérias endossimbiontes (primário e secundário) no vetor *Bemisia tabaci* por hibridização *in situ* – Confocal

Neste estudo, utilizou-se a microscopia de confocal visando detectar “*Ca. Portiera aleyrodidarum*” (endossimbionte primário) e *Wolbachia* (endossimbionte secundário) em ovos, ninfas e indivíduos adultos de *Bemisia tabaci* (biótipo B) avirulíferas mantidas em repolho.

1.4.1 Manutenção da criação de *Bemisia tabaci* avirulífera

Uma criação *Bemisia tabaci* foi mantida na Estação Experimental de Biologia da Universidade de Brasília para fornecer os insetos para o experimento. Os aleirodídeos foram mantidos em plantas de repolho (*Brassica oleraceae* var *capitata*), variedade coração de Boi. As plantas de repolho foram mantidas em gaiolas e livres em uma casa de vegetação com condições de temperatura controlada para 28°C (+ ou – 2°C). As plantas de repolho foram repostas semanalmente (**Figura 2**).

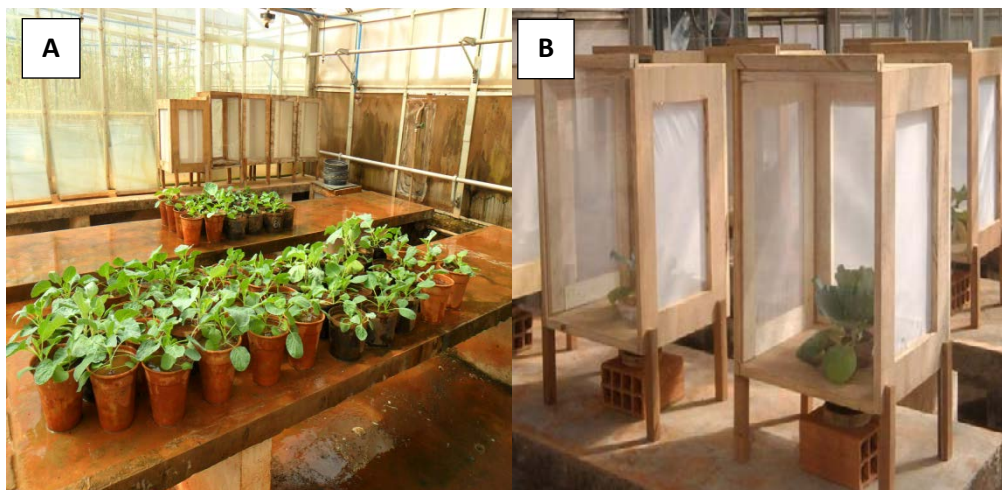


Figura- 2:2A: Criação de *Bemisia tabaci* avirulifera em repolho. **2B:** Criação de *Bemisia tabaci* avirulifera em gaiolas.

Indivíduos adultos e ninfas foram coletados e armazenados em solução fixadora de Carnoy (clorofórmio: etanol :ácido acético, 6:3:1), descorados e posteriormente submetidos à hibridização *in situ* fluorescente (FISH).

A hibridização *in situ* foi conduzida de acordo com Gottlieb *et al.* (2006). Resumidamente ninfas e indivíduos adultos de mosca branca foram incubados em solução fixadora (Carnoy), lavadas em solução de hidróxido de peróxido por no mínimo 2 horas e lavadas em etanol 100%. Em seguida, foram incubadas em solução de hibridização contendo as sondas marcadas, Cy-3 e Cy-5 produzidas para endossimbiontes Gottlieb *et al.* (2006).

Resultados e Discussão

1- Extração de DNA

O protocolo de extração de DNA de uma mosca-branca foi realizado de acordo com Aljanabi *et al.* (1997) e Santos *et al.* (2003) com algumas adaptações. Para realização destes testes procedeu-se a coleta de moscas-brancas avirulíferas provenientes da criação avirulífera mantida em repolho na Estação Experimental de Brasília.

Após inúmeras tentativas de ajuste de protocolo, o DNA de apenas uma mosca-branca foi obtido com sucesso. Além das dificuldades pertinentes ao protocolo de extração, uma das dificuldades encontradas inicialmente foi devido a visualização do

DNA em gel de agarose devido a baixa concentração de DNA para as primeiras amostras. Nesta primeira etapa procedia-se a PCR com o DNA extraído para confirmar a extração de DNA. A **Figura 3** ilustra uma PCR realizada com DNA proveniente da extração de 1 e 10 moscas avirulíferas confirmando assim a eficiência dos ajustes realizados nos protocolos.

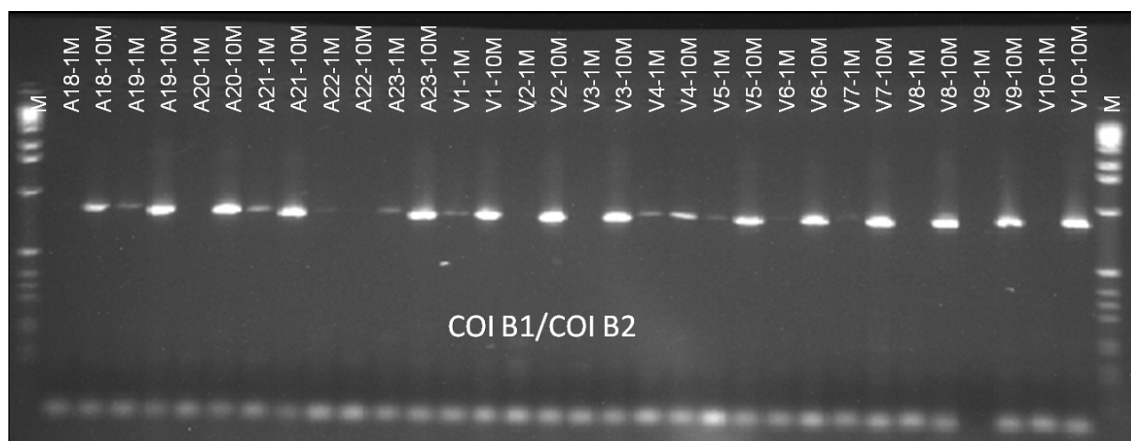


Figura 3-PCR realizada com DNA proveniente da extração de 1 e 10 moscas avirulíferas.

2-Levantamento de endossimbiontes

Das 91 extrações de DNA realizadas utilizando o material das 31 amostras coletadas foram selecionadas 59 extrações, priorizando as que continham menor número de espécimes para realizar PCR com primers específicos para endossimbiontes.

Os produtos obtidos nas reações de PCR foram analisados em eletroforese em gel de agarose (1,2%) onde foi possível observar a presença de *Hamiltonella* em 30 das 31 amostras, total de 96,7% positivas (**Figura 4**) e também a presença de “*Candidatus Portiera aleyrodidarum*” em 27 das 31 amostras analisadas, totalizando 87% positivas (**Figura 5**).

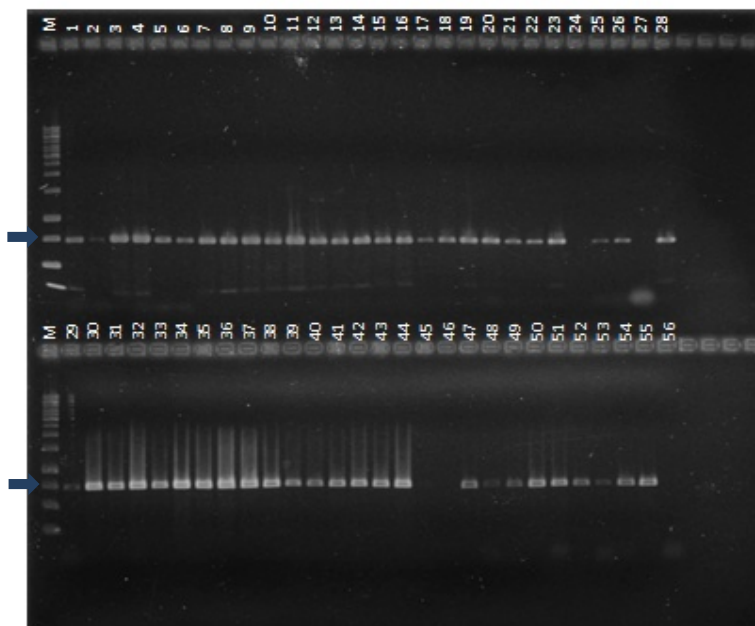


Figura 4- Amplicóns obtidos usando os primers **HAM-R/HAM-F** para **Hamiltonella**. M: Marcador 1kb Ladder. Amostras: 1: Soja 1.1; 2: Soja 1.3; 3: Tomate 2.2; 4: Tomate 2.3; 5: Feijão 3.1; 6: Feijão 3.3; 7: Soja 4.1; 8: Soja 4.3; 9: Couve 5.1; 10: Couve 5.3; 11: Bela-emília 6.1; 12: Bela-emília 6.4; 13: Chuchu 7.1; 14: Chuchu 7.3; 15: Giló 8.1; 16: Giló 8.3; 17: Serralha verdadeira 10.1; 18: Serralha verdadeira 10.3; 19: Soja 11.1; 20: Soja 11.3; 21: Melancia 12.3; 22: Mostarda 13.3; 23: Batata 15; 24: Bela-emília 16.3; 25: Videira 17.1; 26: Videira 17.3; 27: Tomate 18.1; 28: Tomate 18.3; 29: Couve-flor 19.1; 30: Couve-flor 19.3; 31: Mentrasto 20.1; 32: Mentrasto 20.3; 33: Couve 21.1; 34: Couve 21.3; 35: Tomate 22.1; 36: Tomate 22.3; 37: Corda-de-viola 23.1; 38: Corda-de-viola 23.3; 39: Couve 24.1; 40: Couve 24.3; 41: Chichá 25.1; 42: Chichá 25.3; 43: Crambre 26.1; 44: Crambre 26.3; 45: Alface 27.1; 46: Alface 27.3; 47: Bela-emília 28.1; 48: Bela-emília 28.3; 49: Sida 30.1; 50: Sida 30.3; 51: Feuillea 31.1; 52: Espirradeira 32.1; 53: Espirradeira 32.2; 54 e 55: Controles positivos e 56 controle negativo. A seta indica a altura esperada para amplificação (~700 pb).

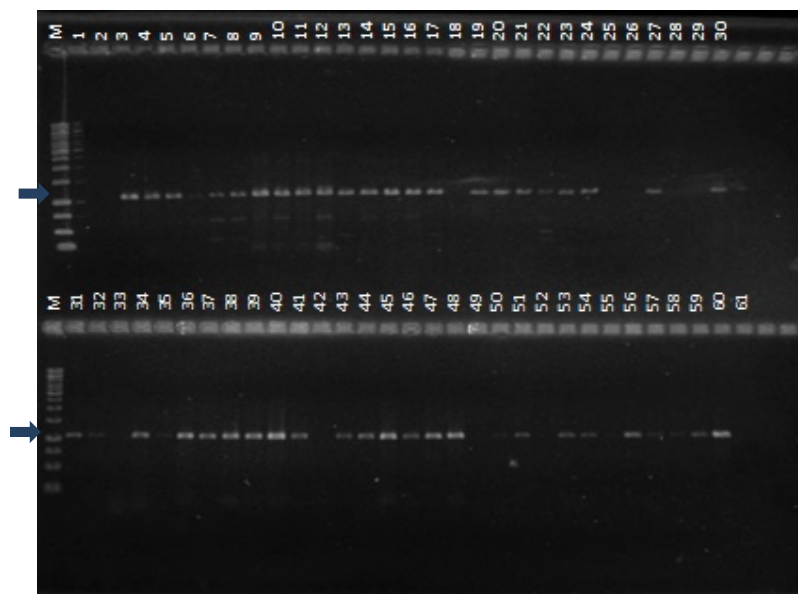


Figura 5- Amplicóns obtidos usando os primers **28f/1098r** para detecção do endossimbionte “*Candidatus Portiera aleyrodidarum*”. M: Marcador 1kb Ladder. Amostras: 1: Soja 1.1; 2: Soja 1.3; 3: Tomate 2.2; 4: Tomate 2.3; 5: Feijão 3.1; 6: Feijão 3.3; 7: Soja 4.1; 8: Soja 4.3; 9: Couve 5.1; 10: Couve 5.3; 11: Bela-emília 6.1; 12: Bela-emília 6.4; 13: Chuchu 7.1; 14: Chuchu 7.3; 15: Giló 8.1; 16: Giló 8.3; 17: Serralha verdadeira 10.1; 18: Serralha verdadeira 10.3; 19: Soja 11.1; 20: Soja 11.3; 21: Melancia 12.1; 22: Melancia 12.3; 23: Mostarda 13.1; 24: Mostarda 13.3; 25: Soja 14; 26: Batata 15; 27: Bela-emília 16.1; 28: Bela-emília 16.3; 29: Videira 17.1; 30: Videira 17.2; 31: Tomate 18.1; 32: Tomate 18.3; 33: Couve-flor 19.1; 34: Couve-flor 19.3; 35: Mentrasto 20.1; 36: Mentrasto 20.3; 37: Couve 21.1; 38: Couve 21.3; 39: Tomate 22.1; 40: Tomate 22.3; 41: Corda -de-viola 23.1; 42: Corda -de-viola 23.3; 43: Couve 24.1; 44: Couve 24.3; 45: Chichá 25.1; 46: Chichá 25.3; 47: Crambe 26.1; 48: Crambe 26.3; 49: Alface 27.1; 50: Alface 27.3; 51: Bela-emília 28.1; 52: Bela-emília 28.3; 53: Erva-de-touro 29.1; 54: Sida 30.1; 55: Sida 30.3; 56: Feuillea 31.1; 57: Feuillea 31.3; 58: Espirradeira 32.1; 59: Espirradeira 32.2; 60: Controle positivo e 61 controle negativo. A seta indica a altura esperada para amplificação (~1100 pb).

Estes resultados comprovam a existência, quase que generalizada, dos endossimbiontes *Hamiltonella* e “*Candidatus Portiera aleyrodidarum*” nestas populações brasileiras de *Bemisia tabaci*. *Hamiltonella* mostrou-se ausente apenas na cultura de alface (*Lactuca sativa*) enquanto *Portiera*, além da alface se fez ausente também nos insetos provenientes das culturas de soja (*Glycine max*) e batata (*Solanum tuberosum*).

Vários autores têm realizado trabalhos de detecção e prevalência de endossimbiontes em *Bemisia tabaci* (Costa *et al.*, 1993; Chiel *et al.*, 2007 e Muhammad *et al.*, 2010).

No trabalho de Muhammad *et al.* (2010) detectou-se a prevalência dos endossimbiontes *Portiera*, *Arsenophonus* e *Wolbachia* nos três biótipos estudados (biótipos B, Q e Cv-biótipo da China.

Wolbachia está presente em várias populações de *Bemisia tabaci*. Ahmed *et al.* (2009) relataram a infecção por *Wolbachia* em populações de *Bemisia tabaci* biótipo Q proveniente de populações do Mediterrâneo e China. Além disto, Skalljac *et al.* (2012) detectaram (além de outros endossimbiontes) também *Wolbachia* em populações de *Bemisia tabaci*.

Os primers (wsp81 e wsp691) para *Wolbachia* também foram testados (resultados não mostrados) neste estudo, porém possivelmente as condições devam ser ajustadas e novamente repetidas, tendo em vista que reações anteriores (Vieira *et al.*, 2011) funcionaram conforme indicado na literatura.

Estes endossimbiontes, embora não tenham sido amplificados com o par de primers citado anteriormente, foram vistos em microscopia. Os resultados obtidos em confocal (apresentados a seguir) ilustram bem a presença deste endossimbionte em amostras coletadas em repolho na Estação Experimental de Biologia da Universidade de Brasília.

Primers (PAL1v1978/PARc715) para detecção de *Begomovirus*, também foram utilizados. A amplificação ocorreu em apenas em uma amostra de tomate coletado no IB (Figura 6).

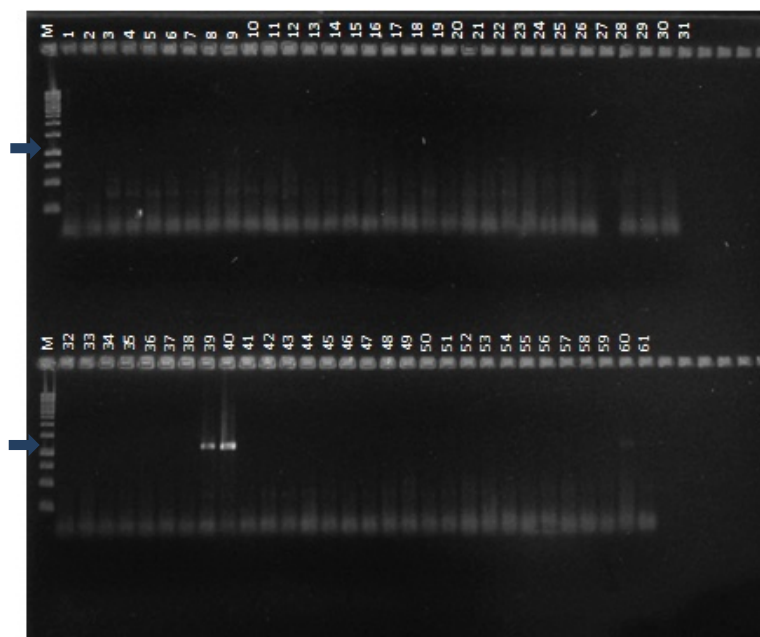


Figura 6- Amplicóns obtidos usando os primers **PAL1v1978/PARc715** para detecção de *Begomovirus*. M: Marcador 1kb Ladder; Amostras: 1: Soja 1.1; 2: Soja 1.3; 3: Tomate 2.2; 4: Tomate

2.3; 5: Feijão 3.1; 6: Feijão 3.3; 7: Soja 4.1; 8: Soja 4.3; 9: Couve 5.1; 10: Couve 5.3; 11: Bela-emília 6.1; 12: Bela-emília 6.4; 13: Chuchu 7.1; 14: Chuchu 7.3; 15: Giló 8.1; 16: Giló 8.3; 17: Serralha verdadeira 10.1; 18: Serralha verdadeira 10.3; 19: Soja 11.1; 20: Soja 11.3; 21: Melancia 12.1; 22: Melancia 12.3; 23: Mostarda 13.1; 24: Mostarda 13.3; 25: Soja 14; 26: Batata 15; 27: Bela-emília 16.1; 28: Bela-emília 16.3; 29: Videira 17.1; 30: Videira 17.2; 31: Tomate 18.1; 32: Tomate 18.3; 33: Couve-flor 19.1; 34: Couve-flor 19.3; 35: Mentrasto 20.1; 36: Mentrasto 20.3; 37: Couve 21.1; 38: Couve 21.3; 39: Tomate 22.1; 40: Tomate 22.3; 41: Corda-de-viola 23.1; 42: Corda-de-viola 23.3; 43: Couve 24.1; 44: Couve 24.3; 45: Chichá 25.1; 46: Chichá 25.3; 47: Crambe 26.1; 48: Crambe 26.3; 49: Alface 27.1; 50: Alface 27.3; 51: Bela-emília 28.1; 52: Bela-emília 28.3; 53: Erva-de-touro 29.1; 54: Sida 30.1; 55: Sida 30.3; 56: Fevillea 31.1; 57: Fevillea 31.3; 58: Espirradeira 32.1; 59: Espirradeira 32.2; 60: Controle positivo e 61 controle negativo. A seta indica a altura esperada para amplificação (~1100pb).

Os primers usados para biótipo estão sendo amplamente usados na literatura para identificação de biótipos (Frohlich *et al.*, 1999; Bosco *et al.*, 2006; Rocha *et al.*, 2011) foram testados por duas vezes consecutivas. Após a terceira tentativa amplicóns foram obtidos (**Figura 7**) e enviados para sequenciamento. Até o momento não temos as sequências destes amplicóns.

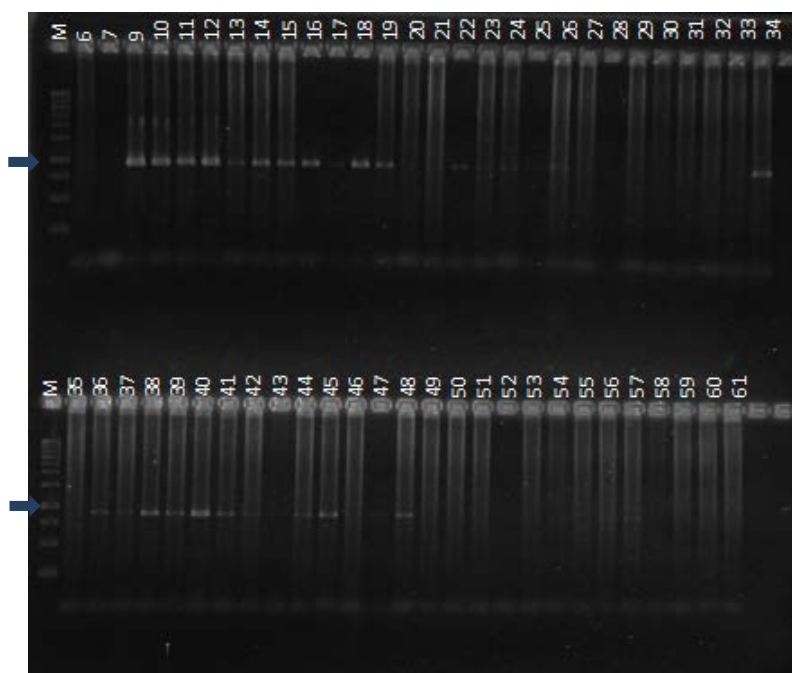


Figura 7- Amplicóns obtidos usando os primers COI (Mitochondrial Cytochrome Oxidase I) para detecção de **Biótipo**. M: Marcador 1kb Ladder; Amostras: 6: Feijão 3.3; 7: Soja 4.1; 9: Couve 5.1; 10: Couve 5.3; 11: Bela-emília 6.1; 12: Bela-emília 6.4; 13: Chuchu 7.1; 14: Chuchu 7.3; 15: Giló 8.1; 16: Giló 8.3; 17: Serralha verdadeira 10.1; 18: Serralha verdadeira 10.3; 19: Soja 11.1; 20: Soja 11.3; 21: Melancia 12.1; 22: Melancia 12.3; 23: Mostarda 13.1; 24: Mostarda 13.3; 25: Soja 14; 26: Batata 15; 27: Bela-emília 16.1; 28: Bela-emília 16.3; 29: Videira 17.1; 30: Videira 17.2; 31: Tomate 18.1; 32: Tomate 18.3; 33: Couve-flor 19.1; 34: Couve-flor 19.3; 35: Mentrasto 20.1; 36: Mentrasto 20.3; 37: Couve 21.1;

38: Couve 21.3; 39: Tomate 22.1; 40: Tomate 22.3; 41: Corda -de-viola 23.1; 42: Corda -de-viola 23.3; 43: Couve 24.1; 44: Couve 24.3; 45: Chichá 25.1; 46: Chichá 25.3; 47: Crambre 26.1; 48: Cambre 26.3; 49: Alface 27.1; 50: Alface 27.3; 51: Bela-emília 28.1; 52: Bela-emília 28.3; 53: Erva-de-touro 29.1; 54: Sida 30.1; 55: Sida 30.3; 56: Feuillea 31.1; 57: Feuillea 31.3; 58: Espirradeira 32.1; 59: Espirradeira 32.2; 60: Controle positivo e 61 controle negativo. A seta indica a altura esperada para amplificação (~ 800pb).

3- Localização de endossimbiontes

Moscas-brancas são insetos aleirodídeos que se alimentam no floema de plantas e causam danos diretos pela alimentação e isoporização de frutos e danos indiretos pela transmissão de vírus. Praticamente todos aleirodídeos abrigam endossimbiontes primários e secundários (em diferentes combinações).

Neste trabalho foram conduzidos ensaios de localização de endossimbiontes primário e secundário (“*Candidatus Portiera aleyrodidarum*” e *Wolbachia*) de *Bemisia tabaci* (biótipo B) provenientes de uma criação mantida em repolho na Estação Experimental de Biologia através de hibridização fluorescente *in situ*.

A localização de *Wolbachia* foi realizada com o uso da sonda Cy-5 e a detecção foi feita nos ovos, ninfas e adulto (conforme **Figura 11**).

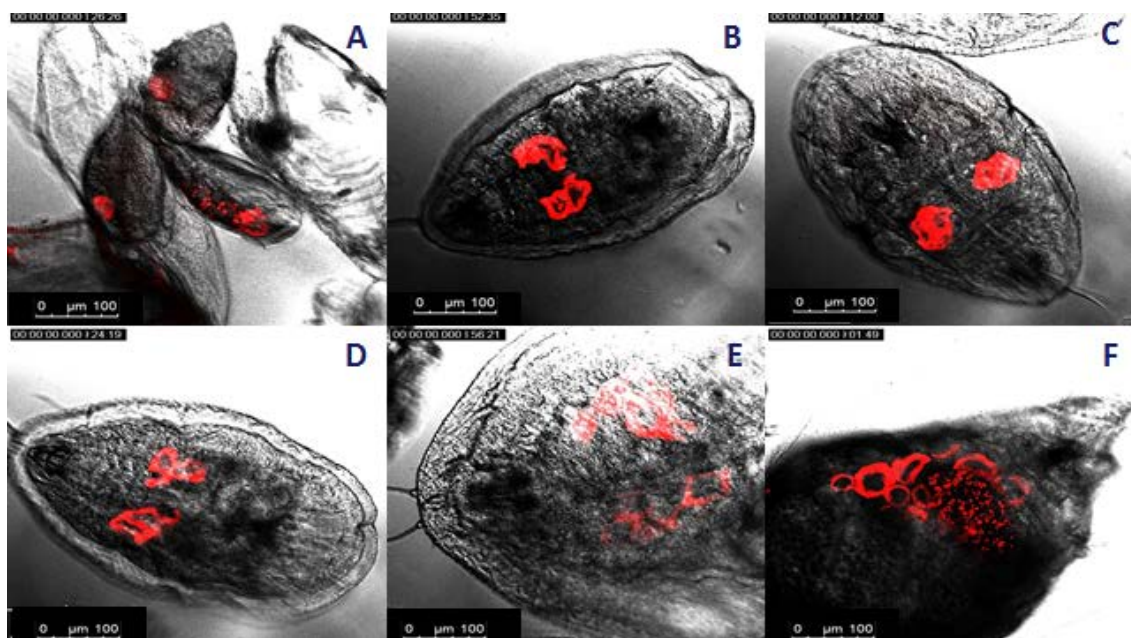


Figura 11 A-F - Localização de *Wolbachia* em *Bemisia tabaci* biótipo B proveniente de repolho. **A:** Ovos de *B. tabaci*. **B,C,D e E:** Ninfas de *B. tabaci* e **F:** Adulto de *B. tabaci*.

A localização de “*Candidatus Portiera aleyrodidarum*” foi realizada com o uso da sonda Cy-3 e a detecção foi feita nos ovos e ninfas (**Figura 12**).

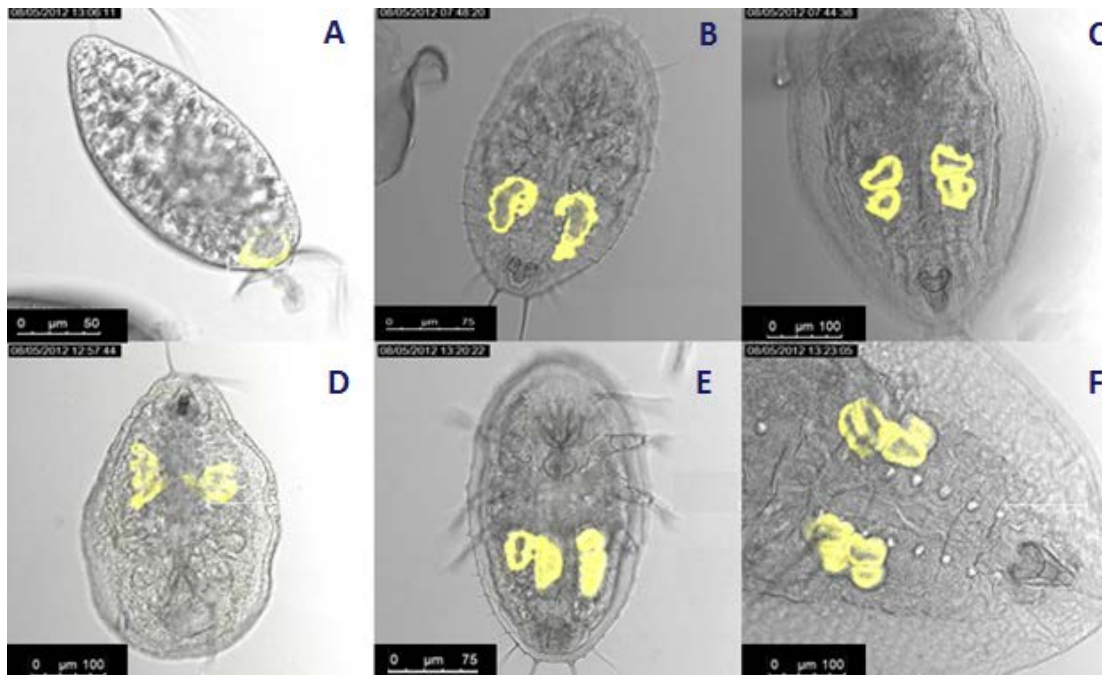


Figura 12 A-F- Localização de “*Candidatus Portiera aleyrodidarum*” em *Bemisia tabaci* biótipo B proveniente de repolho. **A:** Ovos de *B. tabaci*. **B,C,D, E e F:** Ninfas de *B. tabaci*.

Os resultados ilustrados na **Figura 13** mostraram uma maior quantidade de endossimbiontes em fêmeas que machos, enquanto os resultados ilustrados na **Figura 14** mostram a co-localização do endossimbionte primário e secundário em criação de mosca-branca mantidas em repolho e a sub-localização de *Wolbachia* em *B. tabaci* virulífera (*Tomato chlorotic mottle virus* - ToCMoV) mantidas em tomate.

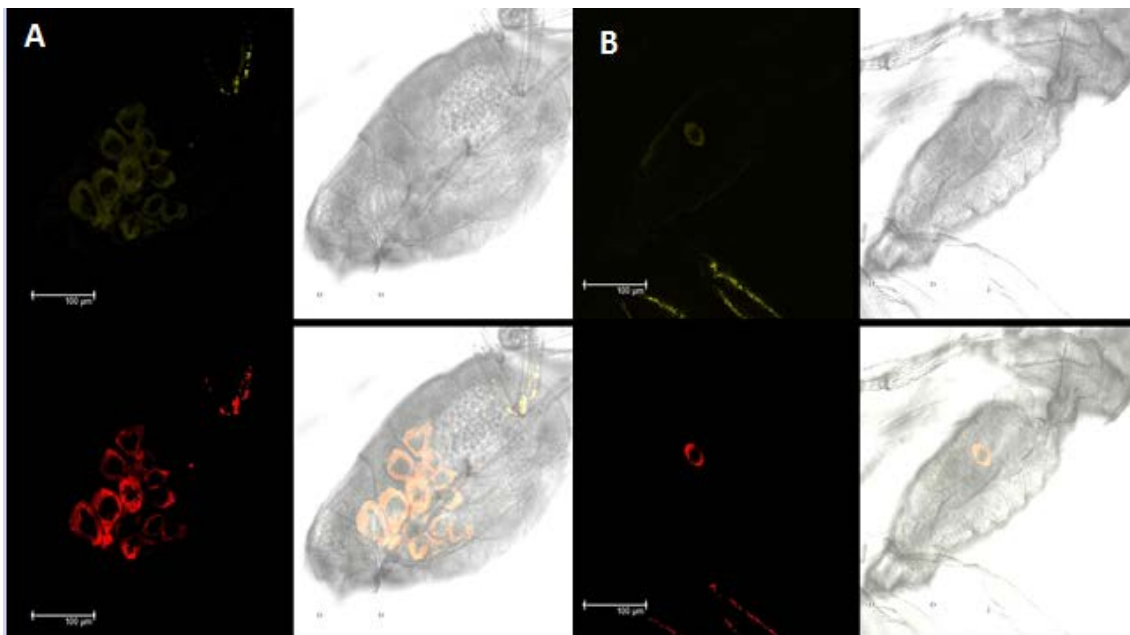


Figura 13 A e B- Co-localização de “*Candidatus Portiera aleyrodidarum*” e *Wolbachia* em adultos de *B. tabaci* biótipo B proveniente de repolho. **A:** Fêmeas de *B. tabaci* e **B:** Machos de *B. tabaci*.

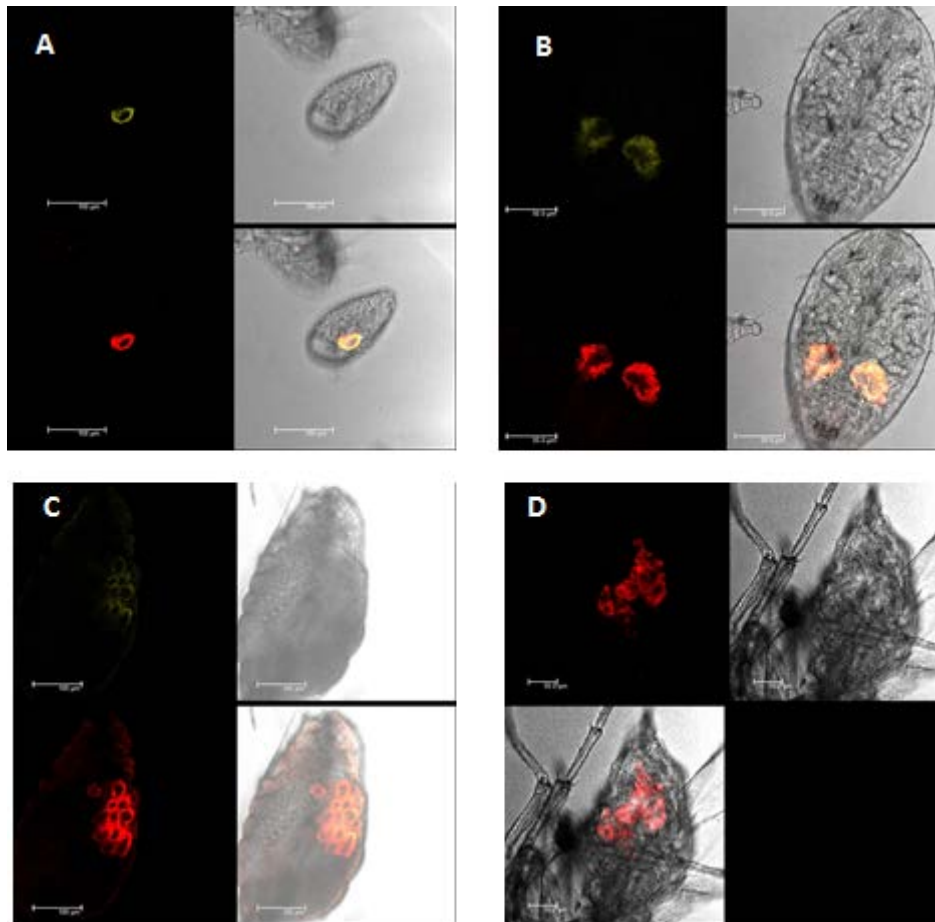


Figura 14 A-D- Co-localização de “*Candidatus Portiera aleyrodidarum*” e *Wolbachia* em ovo (A), ninfa (B) e adultos (C) de *B. tabaci* biótipo B.mantidas em repolho e Sub-localização de *Wolbachia* em adultos de *B. tabacivirulífera* (*Tomatochlorotic mottle virus* ToCMoV) mantidas em tomate (D).

Conclusão

O início da caracterização da comunidade bacteriana em populações brasileiras de *B. tabaci*, assim como sua sub-localização e posterior co-localização com o vírus no corpo do inseto, é crucial para a compreensão dos vários aspectos em estudos futuros da interação vírus-vetor.

Referências Bibliográficas

Ahmed MZ, Jin GH, Shen Y, Ren SX, Du YZ, Qiu BL (2009) Population and host plant differentiation of the sweetpotato whitefly, *Bemisia tabaci* (Homoptera: Aleyrodidae), in East.Aleyrodidae). Pest Management Science 63, 761–768.

Aljanabi SM, Martinez I (1997) Universal e rápida sal de extração de DNA genómico de alta qualidade para técnicas baseadas em PCR.NucleicAcidsRes . 25 (22):4692-3.

Araújo WL, Marcon J, Maccheroni Junior W, Elsas JD van, Vuurde JW van, Azevedo JL (2002). Diversity of endophytic bacterial populations and their interaction with *Xylella fastidiosa* in citrus plants. Applied and Environmental Microbiology, v.68, p.4906-4914.

Baumann P, Moran NA, Baumann L (2000) Bacteriocyte-associated endosymbionts of insects.In: Dworkin M (ed) The prokaryotes. Springer, New York.

Baumann P (2005) Biology of bacteriocyte-associated endosymbionts of plant sap-sucking insects.Annual Review ofMicrobiology 59, 155–189.

Bensadia F, Boudreault S, Guay JF, Michaud D, Cloutier C (2005) Aphid clonal resistance to a parasitoid fails under heat stress. Journal of Insect Physiology 52:146-157.

Berry SD, Fondong VN, Rey C, Rogan D, Fauquet CM, Brown JK (2004) Molecular evidence for five distinct *Bemisia tabaci* (Homoptera: Aleyrodidae) geographic haplotypes associated with cassava. Plants in Sub-Saharan Africa 97:852-859.

Bird J, Maramorosch K (1978) Viruses and virus diseases associated with whiteflies. Adv Virus Res 71:233–260.

Bondar G (1928) Moléstias dos feijões na Bahia - Prodecatoma spermophaga Costa Lima, praga do feijão holandês. Correio Agrícola 6 (6/7): 122-123.

Bosco D, Loria A, Sartor C, Cenis JL (2006) PCR-RFLP Identification of *Bemisia tabaci* biotypes in the Mediterranean Basin. Phytoparasitica 34: 243-251.

Briddon RW, Bedford ID, Tsai JH & Markham PG (1996).Analysis of the nucleotide sequence of the treehopper-transmitted geminivirus, tomato pseudo-curly top virus, suggests a recombinant origin. Virology 219, 3387±394.

Bright M, Bulgheresi SA (2010) Complex journey: transmission of microbial symbionts. *Nature Reviews Microbiology*. London, v. 8, n. 3, p. 218-230.

Brown J (2007) The *Bemisia tabaci* complex: genetic and phenotypic variability drives Begomovirus spread and virus diversification. *APSnet Feature Story* January 2007 (on line). Disponível em <<http://www.apsnet.org/online/feature/btabaci>>

Brown JK (2000) Molecular markers for the identification and global tracking of whitefly vector-begomovirus complexes. *Virus Research* 71:233-260.

Brown JK, Frohlich DR, Rosell RC (1995) The sweetpotato or silverleaf whiteflies: Biotypes of *Bemisia tabaci* or a species complex. *Annual Review of Entomology* 40:511-534.

Brownlie J C, Acamski M, Slatko B, Migraw EA(2007) Diversifying selection and host adaptation in two endosymbiont genomes. *BMC Evolutionary Biology*, London, V. 7, p.12, Apt 2007.

Brumin M, Kontsedalov S& Ghanim M (2011) Rickettsia influences thermotolerance in the whitefly *Bemisia tabaci* B biotype. *Insect Science* 18:57-66.

Buchner P (1965) *Endosymbiosis of Animals with Plant Microorganisms*. New York, USA, John Wiley and Sons.

Caciagli, P., Bosco, D., and Al-Bitar, L. (1995) Relationships of the Sardinian isolate of tomato yellow leaf curl geminivirus with its whitefly vector *Bemisia tabaci* Gen. *European Journal of Plant Pathology*. 101, 163-170.

Chiel E, Gottlieb Y, Zchori-Fein E, Mozes-Daube N, Katzir N, Inbar M, Ghanim M (2007) Biotype dependent secondary symbiont communities in sympatric populations of *Bemisia tabaci*. *Bulletin of Entomological Research* 97:407-413.

Chu C, Freeman TP, Buckner JS, Henneberry TJ, Nelson DR, Natwick EE (2001) Susceptibility of upland cotton cultivars to *Bemisia tabaci* Biotype B (Homoptera : Aleyrodidae) in relation to leaf age and trichome density. *Annals of the Entomological Society of America* 94:743-749.

Cohen, S. & Nitzany, F. E. (1966). Transmission and host range of tomato yellow leaf curl virus. *Phytopathology* 56, 1127–1131.

Costa HS & Brown JK (1991) Variation in biological characteristics and esterase patterns among populations of *Bemisia tabaci*, and the association of one population with silverleaf symptom induction. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 61, 211–219.

Costa HS, Brown JK, Sivasupramaniam S & Bird J (1993) Regional distribution, insecticide resistance, and reciprocal crosses between the A and B biotype of *Bemisia tabaci*. *Insect Science and its Application* 14, 255–266.

Currie C R (2001) A community of ants, fungi, and bacteria: a multilateral approach to study symbiosis. *Annual Review of Microbiology*, Palo Alto, v. 55, p. 357-380.

Dale C, Moran, NA (2006) Molecular interaction between bacterial symbionts and their hosts. *Cell* 126: 453-465.

de Barro J P (2005) Genetic structure of the whitefly *Bemisia tabaci* in the Asia-Pacific region revealed using microsatellite markers. *Molecular Ecology*, v. 14, n. 12, p. 3695-3718.

Dennehy TJ, DeGain BA, Harpold VS, Brown JK, Morin S, Fabrick JA & Nichols RL (2005) New challenges to management of whitefly resistance to insecticides in Arizona. *The University of Arizona Cooperative Extension Vegetable Report* 32, 32pp.

Elba M, Lahav N, Morin S (2009) Evidence for pre-zygotic reproductive barrier between the B and Q biotypes of *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae). *Bulletin of Entomological Research*, Page 1 of 10.

Ferrari J, Darby AC, Daniell TJ, Godfray HCJ, Douglas AE. (2004) Linking the bacterial community in pea aphids with host-plant use and natural enemy resistance. *Ecological Entomology* 29, 60–65.

França FH, Villas Boas GL, Castelo Branco M (1996) Ocorrência de *Bemisia argentifolii* Bellows & Perring (Homoptera: Aleyrodidae) no Distrito Federal. *Anais da Sociedade Entomológica do Brasil* 25:369-372.

Frohlich DR, Torres-Jerez II, Bedford ID, Markham PG, Brown JK (1999) A phylogeographical analysis of the *Bemisia tabaci* species complex based on mitochondrial DNA markers. *Mol. Ecol.* 8, 1683–1691.

Ghanim M, Brumin M, Popovski S (2009) A simple, rapid and inexpensive method for localization of Tomato yellow leaf curl virus and Potato leafroll virus in plant and insect vectors. *Journal Virology Methods* (2):311-4.

Gherna RL, Werren JH, Weisburg W, Cote R, Woese CR, Mandelc, L, Brenner DJ. (1991) *Arsenophonus nasoniae* gen. nov., sp. nov., the causative agent of the son-killer trait in the parasitic wasp *Nasonia vitripennis*. *International Journal of Systematic Bacteriology* 41:563-565.

Gottlieb Y, Ghanim M, Chiel E, Gerling D, Portnoy V, Steinberg S, Tzuri G, Horowitz, AR, Belausov E, Mozes-Daube N, Kontsedalov S, Gershon M, Gal S, Katzir N, Zchori-Fein E (2006) Identification and localization of a *Rickettsia* sp. in *Bemisia tabaci* (Homoptera:Aleyrodidae). *Applied and Environmental Microbiology* 72:3646-3652.

Gottlieb Y, Zchori-Fein E, Mozes-Daube N, Kontsedalov S, Skaljac M, Brumin M, Sobol I, Czosnek H, Vavre F, Fleury F & Ghanim M (2010) The transmission efficiency of *Tomato Yellow Leaf Curl Virus* by the whitefly *Bemisia tabaci* is correlated with the presence of a specific symbiotic bacterium species. *Journal of Virology* 84, 9310–9317.

Haji HNP, Lima MF, Alencar JÁ (1997). Histórico sobre mosca branca no Brasil. In.: Taller Latinoamerica Y Del Caribe Sobre Mosca Branca Y Geminivirus, 6., Santo Domingo, República Dominicana, 1997. Memória Santo Domingo: MIP. Programa Nacional de Manejo Integrado de Plagas, 1997. p.5-8.

Himler AG, Adachi-Hagimori T, Bergen JE, Kozuch A, Kelly SE, Tabashnik BE, Chiel E, Duckworth, VE, Dennehy TJ, Zchori-Fein E, Hunter MS (2011) Rapid spread of a bacterial symbiont in an invasive whitefly is driven by fitness benefits and female bias. *Science* 332:254-256.

Hofstetter RW, Klepzig KD, Moser JC, Ayres MP (2006) Seasonal dynamics of mites and fung and their interaction with Southern pine beetle. *Environmental Entomology*. Collige Park, v. 35, n. 1, p. 22- 39.

Hogenhout Saskia A, Ammar El-Desouky, Whitfield Anna E, Redinbaugh Margaret G (2008) Insect Vector Interactions with Persistently Transmitted Viruses. *Annual Review of Phytopathology* 46:327-359.

Horowitz AR, Gorman K, Ross G & Denholm I (2003) Inheritance of pyriproxyfen resistance in the whitefly, *Bemisia tabaci* (Q biotype). *Archives of Insect Biochemistry and Physiology* 54, 177–186.

Horowitz AR, Kontsedalov S, Khasdan V & Ishaaya I (2005) Biotypes B and Q of *Bemisia tabaci* and their relevance to neonicotinoid and pyriproxyfen resistance. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology* 58, 216–225.

Hosokawa T, Koga R, Kikuchi Y, Meng, X Y, Fukatsu, T. (2010) *Wolbachia* a bacteriocyte-associated nutritional mutualist. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United State of America*. Washington, v. 107, n. 2, p. 769-774.

Hsieh CH, Wang CH, Ko CC (2007) Evidence from molecular markers and population genetic analyses suggests recent invasions of the western north pacific.

Idris AM. & Brown JK. (1998). Sinaloa tomato leaf curl geminivirus: Biological and molecular evidence for a new subgroup III virus.

Inoue-Nagata AK, Martin DP, Boiteux LS, Giordano L de B, Agassie ICB, Ávila AC de (2006) New species emergence via recombination among isolates of the Brazilian tomato infecting Begomovirus complex. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 41:1329-1332.

Karunker I, Benting J, Lueke B, Ponge T, Nauen R, Roditakis E, Vontas J, Gorman K, Denholm I, Morin S (2008) Over-expression of cytochrome P450 CYP6CM1 is associated with high resistance to imidacloprid in the B and Q biotypes of *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae). *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 38, 634–644.

Klepzig K D, Adams A S, Handelsman J, Raffa K F (2009) Symbioses: A key driver of insect physiological processes, ecological interactions, evolutionary diversification, and impacts on humans. *Environmental entomology*, College Park, v. 38, n. 1, p. 67-77.

Lee MH, Kang SK, Lee SY, Lee HS, Choi JY, Lee GS, Kim WY, Lee SW, Kim SG, Uhm KB (2005) Occurrence of the B- and Q- biotypes of *Bemisia tabaci* in Korea. *Korean Journal of Applied Entomology* 44, 169–175.

Lima LHC, Campos L, Moretzsohn MC, Návia D, Oliveira MRV (2002) Genetic diversity of *Bemisia tabaci* (Genn.) populations in Brazil revealed by RAPD markers. *Genetics and Molecular Biology* 25:217-223.

Lima LHC, Návia D, Inglis PW, Oliveira MRV (2000) Survey of *Bemisia tabaci* (Gennadius) (Hemiptera, Aleyrodidae) biotypes in Brazil using RAPD markers. *Genetics and Molecular Biology* 23:1-5.

Lourenção AL, Nagai H. Surtos populacionais de *Bemisia tabaci* no estado de São Paulo. *Bragantia*, Campinas, v. 53, p. 53-59, 1994.

Louro D (2004) A emergência de vírus transmitidos por moscas brancas, uma ameaça para a horticultura. *Actas do 4º Congresso da Sociedade Portuguesa de Fitopatologia*. Faro, Portugal, 4-6 de Fev. 2004: 55.

Ma D, Hadjistylli M, Gorman K, Denholm I, Devine G (2004) Pre- and post-zygotic breeding incompatibilities between B and Q biotypes of *Bemisia tabaci*. pp. 13–

14 in Proceeding of the 2nd European Whitefly Symposium.5–9 October 2004, Cavtat, Croatia. *Management Science* 58, 868–875.

Marín FM (2004) *Busqueda de estrategias de control frente a los Begomovirus que afectan a tomate y judía en España*. Tesis Doctoral. Algarrobo-Costa España.

Martinez-Carrillo JL, Brown JK (2007) First report of the Q biotype of *Bemisia tabaci* in southern Sonora, Mexico. *Phytoparasitica* 35, 282–284.

Morales FJ, Anderson PK (2001) The emergence and dissemination of whitefly-transmitted geminiviruses in Latin America. *Archives of Virology* 146:415-441.

Moran N A, Mecutcheon J P, Nakabachi A (2008) Genomics and evolution of heritable bacterial symbionts. *Annual Review of Genetics*, Palo Alto, v. 42, p. 165-190.

Morin S M, Ghanim M, Zeidan H, Czosnek M, Verbeek a J F J, M van den Heuvel. (1999) A GroEL homologue from endosymbiotic bacteria of the whitefly *Bemisia tabaci* is implicated in the circulative transmission of tomato yellow leaf curl virus. *Virology* 256:75–84.

Mota M, Takemoto S, Takeuchi Y, Futai K (2006) Comparative studies between Portuguese and Japanese isolates of the penwood nematode, *Bursaphelenchus xylophilus*. *The Journal of Nematology*. College Park, v. 38, n. 4, p. 429-433.

Moya A, Guirão P, Cifuentes D, Beitia F, Cenis JL (2001) Genetic diversity of Iberian populations of *Bemisia tabaci* (Hemiptera, Aleyrodidae) based on random amplified polymorphic DNA-polymerase chain reaction. *Molecular Ecology* 10:891-897.

Muhammad ZA, Ren S, Xue X, Li X, Jin G, Qiu B (2010) Prevalence of Endosymbionts in *Bemisia tabaci* populations and their in vivo sensibility to antibiotics. *Current Microbiology* 4:322-328.

Muniz M (2000) Host suitability of two biotypes of *Bemisia tabaci* on some common weeds. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 95, 63–70.

Muniz M, Nombela G (2001) Differential variation in development of the B- and Q-biotypes of *Bemisia tabaci* (Homoptera: Aleyrodidae) on sweet pepper at constant temperatures. *Environmental Entomology* 30(4):720-727.

Oliver KM, Russel JA, Moran NA Hunter MS (2003) Facultative bacterial symbionts in aphids confer resistance to parasite wasps. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America* 100:1803-1807.

Pascual S (2006) Mechanisms in competition, under laboratory conditions, between Spanish biotypes B and Q of *Bemisia tabaci* (Gennadius). Spanish Journal of Agricultural Research 4, 351–354.

Perring TM (2001) The *Bemisia tabaci* species complex. Crop Protection 20:725-737.

Polston JE, Anderson PK (1999) Surgimiento y distribución de geminivirus transmitidos por moscas blancas en tomate en el Hemisferio Occidental. Manejo Integrado de Plagas 53:24-42. region by biotypes B and Q of *Bemisia tabaci* (Gennadius). Environmental Entomology 36, 952–961.

Ribeiro SG, Ambrozevícius LP, Ávila AC, Bezerra IC, Calegário RF, Fernandes JJ, Lima MF, Mello RN, Rocha HC, Zerbini FM (2003) Distribution and genetic diversity of tomato-infecting begomovirus in Brazil. Archives of Virology 148:281-295.

Richard F J, Poulsen M, Hefetz A, Errard C, Nash D, Boomsma J (2007) The origin of the chemical profiles of fungal symbionts and their significance for nestmate recognition in *Acromyrmex* leaf-cutting ants. Behavioral Ecology and Sociobiology. New York, v.61, n. 11, p. 1637-1649.

Rocha KCG, Marubayashi JM, Navas-Castillo J, Yuki VA, Wilcken CF, Pavan MG, Krause- Sakate R (2011) Only the B biotype of *Bemisia tabaci* is present on vegetables in São Paulo State, Brazil. Sci. Agric. (Piracicaba, Braz.), v.68, n.1, p.120-123.

Rojas M R et al., (1993) Use of degenerate primers in the polymerase chain reaction to detect whitefly-transmitted geminiviruses. Plant Disease, v. 77, n. 4, p. 340-347.

Santos C D G, Ávila A C, Resende RO (2003) Estudo da interação de um begomovirus isolado de tomateiro com a mosca branca vetora. Fitopatologia Brasileira 28:664-673.

Scott IAW, Workman PJ, Drayton GM, Burnip GM (2007) First record of *Bemisia tabaci* biotype Q in New Zealand. New Zealand Plant Protection 60:264-270.

Sinisterra XH, McKenzie C, Hunter, W. b., PoWeLL, c. A., AnD SHatterS, r. G. 2005. Differential transcriptional activity of plant-pathogenic begomoviruses in their whitefly vector (*Bemisia tabaci*, Gennadius: Hemiptera Aleyrodidae). Journal General Virology. 86: 1525.

Skaljic M, Zanic K, Hrcic S, Radonjic S, Perovic TeGhanim M (2012) Diversity and localization of bacterial symbionts in three whitefly species (Hemiptera:

Aleyrodidae) from the east coast of the Adriatic Sea. Bulletin of Entomological Research, Page 1 of 12. Cambridge University Press.

Stouthamer R, Breeuwer JAJ, Hurst GDD (1999) *Wolbachia pipientis*: microbial manipulator of arthropod reproduction. Annual Review of Microbiology, 53, 71–102.

Thao, M.L. & Baumann, P. (2004) Evolutionary relationships of primary prokaryotic endosymbionts of whiteflies and their hosts. Applied and Environmental Microbiology 70, 3401–3406.

Timmermans MCP, Prem das O, Messing J (1994) Geminiviruses and their uses as extrachromosomal replicons. Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology 45:79-112.

Ueda S, Brown JK (2006) First report of the Q biotype of *Bemisia tabaci* in Japan by mitochondrial cytochrome oxidase I sequence analysis. Phytoparasitica 34:405-411.

UNICAMP (2012) Microscópio Confocal. Disponível em: http://www.ifi.unicamp.br/vie/F530_F590_F690_F895/F530_F590_F690_F895_sem2_2004/003069Hugo_M_Franchini_F530_RF.pdf. Acesso em 17 de Agosto de 2012

Vieira BG, Lorena M, Resende RO, Fonseca MEN, Boiteux, LS, Pereira-Carvalho, RC. Detecção de *Candidatus* Portiera Aleyrodidarum e *Wolbachia* em populações de *Bemisia tabaci* colonizando tomateiro. In: XLIV Congresso Brasileiro de Fitopatologia, 2011, Bento Gonçalves. Tropical Plant Pathology. Brasília -DF: Sociedade Brasileira de Fitopatologia, 2011. v. 36. p. S3

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

Villas Bôas GL (2000) Caracterização molecular da mosca-branca *Bemisia argentifolii* Bellows & Perring, (Homoptera: Aleyrodidae) e determinação do potencial biótico às plantas hospedeiras: abobrinha, feijão, mandioca, milho, poinsétia, repolho e tomate. Tese de Doutorado, Universidade Federal de São Carlos.

Villas Bôas GL, Nagata AKI, Lima RS, Pereira W, Giordano LB (2003) Avaliação de plantas daninhas como possíveis hospedeiras da mosca-branca. In: 43º Congresso Brasileiro de Olericultura, 2003, Recife. p.344.

Villas Bôas GL, Melo PE de, Castelo Branco M, Giordano LB, Melo WF (2007) Desenvolvimento de modelo de produção integrada de tomate indústria-PITI In: Zambolin L, Lopes CA, Picango MC. Costa H (Ed.). Manejo integrado de doenças e pragas, hortaliças. Viçosa, MG: Universidade Federal de Viçosa.

Villas Bôas GL, França FH, Macedo N (2002). Potencial biótico da mosca-branca *Bemisia argentifolii* a diferentes plantas hospedeiras. Horticultura Brasileira, Brasília, v. 20, p. 71-79.

Werren JH, Skinner SW, Huger AM. (1986) Male-killing bacteria in a parasitic wasp. Science 231, 990–992.

Wilkinson TL (1998) The elimination of intracellular microorganisms from insects: an analysis of antibiotic-treatment in the pea aphid (*Acyrtosiphon pisum*). Comp Biochem Physiol A 119:871–881.

Wilson M, Moshitzky P, Laor E, Ghanim M., Horowitz AR, Morin S (2007) Reversal of resistance to pyriproxyfen in the Q biotype of *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae)

Zchori-Fein E, Perlman JP (2004) Distribution of the bacterial symbiont *Cardinium* in arthropods. Molecular Ecology 13, 2009–2016.

Zhang LP, Zhang YJ, Zhang WJ, Wu QJ, Xu BY, Chu D (2005) Analysis of genetic diversity among different geographical populations and determination of biotypes of *Bemisia tabaci* in China. Journal of Applied Entomology 129, 121–128.