

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”  
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS  
CAMPUS DE BOTUCATU**

Suzana Regina Silveira Costa

**Caracterização molecular de populações do inseto praga psílido de concha (*Glycaspis  
brimblecombei*) por meio de marcadores do tipo ITS 1 (*Internal Transcribed Spacer 1*)**

Botucatu/2011

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”**  
**INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS**  
**CAMPUS DE BOTUCATU**

Suzana Regina Silveira Costa

**Caracterização molecular de populações do inseto praga psílideo de concha (*Glycaspis  
brimblecombei*) por meio de marcadores do tipo ITS 1 (*Internal Transcribed Spacer 1*)**

Orientador: Prof. Dr. Celso Luis Marino

Dissertação de Mestrado apresentada  
no Programa de Pós-graduação em  
Ciências Biológicas – área de  
concentração Genética para obtenção  
do título de Mestre.

Botucatu/2011

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.  
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP  
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: *ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE*

Costa, Suzana Regina Silveira.

Caracterização molecular de populações do inseto praga psílídeo de concha (*Glycaspis brimblecombei*) por meio de marcadores do tipo ITS 1 (Internal Transcribed Spacer 1) / Suzana Regina Silveira Costa. – Botucatu : [s.n.], 2011

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, Botucatu, 2011

Orientador: Celso Luís Marino

Capes: 20202008

1. Inseto - População. 2. Eucalipto - Doenças e pragas - Controle Biológico.  
3. Pragas agrícolas - Controle biológico.

Palavras-chave: *Eucalyptus* sp; *Glycaspis brimblecombei*; Inseto praga; ITS 1.

Dedico este trabalho a Deus em primeiro lugar, por ter me proporcionado a oportunidade de realizar um sonho e me dar força nos momentos de insegurança e incerteza, pessoais e profissionais, ao longo desta caminhada de dois anos e também a minha família, instituição sagrada, que sempre esteve ao meu lado e que me ajudou a concretizar este sonho.

## **Agradecimentos**

A Deus que me concedeu a oportunidade de fazer parte desta instituição, me concedendo saúde e auxílio em todos os momentos e que agora abençoa esta dissertação fruto de dois árduos anos de trabalho.

Aos meus avós maternos, Ruy e Izabel (memoriam), que sempre foram fonte de inspiração e que desde a infância me estimularam a estudar e batalhar pelos meus sonhos, obrigada pelo amor incondicional.

A meus pais, Eduvaldo e Ana Maria, em especial minha mãe, mulher batalhadora e guerreira, sempre amorosa, obrigada pela força em todos os sentidos e momentos, obrigada por ser um exemplo em minha vida, sinto orgulho de ser sua filha.

Aos meus irmãos, Junior e André Luiz, obrigada pelo carinho. Ao Junior devo agradecer pelos conselhos acadêmicos e também por ter sido meu herói intelectual, aqui quero incluir minha cunhada Dionísia, obrigada pelo apoio e conselhos.

A meu noivo, Anelusco, pela paciência nos momentos de ansiedade e nervosismo e pelo apoio emocional nessa reta final, te amo!

As minhas amigas de ontem, hoje e sempre, Renata P. Pincelli (renat's), Paula Sorrila (paulete), Karin Risso, Mariana Inri de Carvalho (Bauru) e Andressa Rhein (SP), agradeço a Deus todos os dias por ter me concedido a dádiva de tê-las como um referencial pessoal e emocional.

Ao meu orientador Celso, por ter aberto as portas do seu laboratório para mim e ter acreditado no meu potencial, mesmo quando nem eu mesma acreditava (rs...), obrigada pelos conselhos, eles foram e ainda serão valiosos em muitos aspectos da minha vida.

A CAPES agência financiadora por ter me concedido a bolsa de estudos durante o desenvolvimento deste trabalho.

A Virginia, por ter me acolhido e me orientado no início dos meus trabalhos no laboratório, obrigada pela oportunidade e também pela amizade, que Deus a abençoe muito.

Ao Professor Wilcken, por me fornecer os psilideos e tirar muitas dúvidas auxiliando o bom andamento do trabalho, obrigada pela paciência e também pela disponibilidade.

Ao Ronaldo (psicólogo) que me ajudou muito a aprender a controlar minha ansiedade além dos muitos conselhos que vou levar para o resto da vida.

Aos amigos do laboratório CAGEN: Tânia, Helena, Cíntia, Léo, Julio, Vanusa, Karine (toladinha), Cecília e as recém chegadas Lídia e Paola, obrigada pela convivência harmoniosa, pelos ensinamentos, ajudas, conversas, risadas, etc.

Aos amigos do laboratório Biogem: Carol, Ju, Alessandra (morena), Alessandra (loira), Japa, Fábio e Bonsai, obrigada pela ótima convivência e pelas coisas que aprendi com muitos de vocês.

Aos meus amigos Andressa Brida e Elton, vocês fizeram a diferença na minha passagem por Botucatu.

A minha querida Helena, obrigada pelos momentos maravilhosos que passamos juntas, obrigada pelos ensinamentos de bancada e também pela ajuda com os *softwares*, pelos conselhos e por sempre ter sido leal e verdadeira comigo, tenho certeza que a distância não vai apagar a força que nossa amizade ganhou nos últimos tempos.

A Tânia pelos ensinamentos teóricos e práticos em genética, pela força em muitos momentos de dúvida.

Aos amigos da graduação na USC-Bauru, muitos ainda de convivência próxima, outros nem tanto, porém todos vocês de alguma forma marcaram minha vida e ainda se fazem presentes nas lembranças.

A dona Maria e a Letícia que me acolheram em sua casa e nesses anos de convivência foram minha família em Botucatu.

Ao Danilo (Jacu) do Departamento de Morfologia pelo auxílio em algumas análises.

Aos funcionários do Departamento de Genética, Zé, Betina, Aline (jaú), Val entre outros que convivi nesses quatro anos, obrigada pela paciência e também pela ajuda em muitos momentos.

Aos professores vinculados a Pós-graduação em Genética – UNESP- Botucatu, pela atenção e gentileza nos momentos em que foram solicitados.

Ao pessoal da Pós-graduação, Lú e Herivaldo, que sempre estiveram disponíveis para tirar as dúvidas e prontos para ajudar a solucionar os eventuais enganos cometidos por mim.

A todos os professores que passaram em minha vida, graças ao ensinamento proporcionado por vocês hoje consigo vencer mais uma etapa em minha vida acadêmica.

“Agora, eis o momento, da melhora que buscas.  
De nada te lastimes. Ontem não mais existe.  
De tudo o que se foi, só a lição perdura.  
Renova-te e caminha, sob o eterno presente.  
Olha o tronco podado lançando ramos novos.  
Não pare, segue e serve. Deus cuidará de ti.”

(Emmanuel)

## RESUMO

O gênero *Eucalyptus* é originário da Austrália e está estabelecido no Brasil há mais de um século. Atualmente, o Brasil tem a segunda maior área plantada, formando monoculturas, que favorecem o estabelecimento de insetos praga. No ano de 2003 foi verificada pela primeira vez no país a ocorrência de *Glycaspis brimblecombei*, espécie descrita por Moore (Hemiptera, Psyllidae). Tal espécie também é conhecida por psilídeo de concha, em plantios de *Eucalyptus* sp. no estado de São Paulo. Devido sua alta capacidade adaptativa, atualmente se encontra amplamente distribuído por todo território nacional. Os danos causados por sua infestação são inúmeros, resultando em perdas consideráveis para o setor florestal e consequentemente para a economia brasileira. As populações do psilídeo de concha apresentam baixa variação morfológica, dificultando sua identificação; assim, análises moleculares, tais quais o uso de marcadores, podem auxiliar a responder essas questões. Um marcador amplamente utilizado, por sua alta variabilidade, é o espaçador interno transcrito do DNA ribossomal (ITS). Deste modo, o marcador ITS foi utilizado neste trabalho para averiguar a dinâmica populacional do psilídeo de concha de quatro regiões do estado de São Paulo. A sequência do ITS1 apresentou um intervalo de 291 pb em 88,73% das amostras. Os sítios polimórficos foram identificados no intervalo de 80 a 200 pb, sendo que na população de Pedra Bela foi observada a maior distribuição destes. Além disso, observou-se a ocorrência de seis haplótipos distribuídos nas quatro populações. O haplótipo 1 esteve presente em todas as populações, enquanto que o haplótipo 6 foi somente identificado na população de Criação de Laboratório. A diversidade nucleotídica (Pi) das populações foi de 0,00445, sendo que a de Criação de Laboratório apresentou o maior valor de Pi entre as quatro populações; já, em Botucatu não foi observada diversidade. Oligonucleotídeos específicos que flanqueiem as regiões polimórficas das sequências dos haplótipos mais frequentes foram desenvolvidos para utilizá-los como marcador na genotipagem dos indivíduos.

**Palavras chave:** *Eucalyptu* sp, *Glycaspis brimblecombei*, inseto praga, ITS 1.



## ABSTRACT

Eucalyptus genus is derived from Australia and is settled in Brazil for more than a century now. Currently, Brazil has the second largest planted area, forming monocultures that smooth infestation with pest-insects. In 2003, the occurrence of *Glycaspis brimblecombei*, species described by Moore (Hemiptera, Psyllidae), was detected in Brazil for the first time. The said species is also known as red gum lerp, in Eucalyptus sp plantations in the State of São Paulo. Because of their high capacity of adaptation, nowadays they are found widely distributed all over the domestic territory. Damages caused by their infestation are numerous, resulting in considerable losses for the forestry sector and, consequently, for the Brazilian economy. Red gum lerp populations present a low rate of morphological variation, which makes their identification more difficult. Accordingly, molecular tests, such as the use of markers, may help answering such questions. A widely used marker, due to its high variability, is the internal transcribed spacer of ribosomal DNA (ITS). Thus, the ITS marker was used in this paper to investigate the population dynamics of red gum lerps from four regions in the State of São Paulo. ITS1 sequence showed a range of 291 bp in 88.73% of the samples. Polymorphic sites were identified in the range of 80-200 bp, with the population from Pedra Bela showing the highest distribution. Moreover, the occurrence of six haplotypes distributed in the four populations was found. Haplotype 1 was present in all populations, while haplotype 6 was identified in lab-developed population only. The nucleotide diversity ( $P_i$ ) of populations was 0.00445, while the lab-developed population showed the highest  $P_i$  value as between the four populations. In Botucatu, no diversity was found. Specific oligonucleotides flanking the polymorphic regions of the sequences of the most common haplotypes have been developed to be used as markers in genotyping of individuals.

**Key words:** *Eucalyptus sp*, *Glycaspis brimblecombei*, psyllid, pest insect, ITS1

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figura 1</b> – Diferentes fases do desenvolvimento de <i>Glycaspis brimblecombei</i> .....	14
<b>Figura 2</b> – Danos observados em árvores de <i>Eucalyptus sp</i> provocados pela presença de <i>Glycaspis brimblecombei</i> .....	17
<b>Figura 3</b> – Organização dos genes do DNA ribossômico (rDNA).....	19
<b>Figura 4</b> – Gel de agarose a 1% com os <i>primers</i> ITS 1 com amostras da população do município de Quadra-SP.....	30
<b>Figura 5</b> – Gel de agarose a 1% com os <i>primers</i> ITS 1 com amostras da população do município de Botucatu-SP.....	30
<b>Figura 6</b> – Gel de agarose a 1% com os <i>primers</i> ITS 1 com amostras da população do município de Pedra Bela-SP.....	30
<b>Figura 7</b> – Gel de agarose a 1% com os <i>primers</i> ITS 1 com amostras da população de Criação de Laboratório.....	30
<b>Figura 8</b> – Dados obtidos a partir da análise comparativa no banco de dados NCBI.....	31
<b>Figura 9</b> – Esquema da sequência consenso do indivíduo 3 da população de Botucatu com anotações dos genes ribossomais 18S e 5.8S e o ITS 1.....	32
<b>Figura 10</b> – Gráfico da distribuição dos sítios polimórficos nas sequências de todas as populações estudadas.....	32
<b>Figura 11</b> – Gráfico da distribuição dos sítios polimórficos nas sequências em cada populações estudadas.....	33
<b>Figura 12</b> – Gráfico com a frequência dos haplótipos em cada população estudada.....	34
<b>Figura 13</b> – Esquema representando as sequências dos haplótipos 1 e 2 com os sítios polimórficos e as anotações dos <i>primers</i> desenvolvidos.....	36
<b>Figura 14</b> - Gel de agarose a 1% com os <i>primers</i> Psi-F e Psi-R com amostras dos haplótipos 1 e 2.....	36

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> – Amostragem das populações de <i>Glycaspis brimblecombei</i> utilizadas neste trabalho.....	22
<b>Tabela 2</b> – Valores de concentração (ng/ul) e absorbância do DNA extraído.....	28
<b>Tabela 3</b> – Posições dos sítios polimórficos e total de indivíduos com estes polimorfismos para as quatro populações estudadas, distribuídos em seis haplótipos.....	33
<b>Tabela 4</b> – Sequência dos iniciadores desenvolvidos a partir da sequência do haplótipo 1.....	35

## SUMÁRIO

RESUMO

ABSTRACT

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

LISTA DE TABELAS

INTRODUÇÃO.....	11
1. Revisão Bibliográfica.....	13
1.1. <i>Glycaspis brimblecombei</i> .....	13
1.2. Danos e distribuição geográfica.....	15
1.3. Marcador <i>Internal Transcribed Spacer 1 (ITS1)</i> .....	17
2. Objetivo.....	21
2.1. Objetivos Específicos.....	21
3. Material e métodos.....	22
3.1. Amostragem.....	22
3.2. Métodos.....	22
3.2.1. Extração de DNA de psílideo de concha.....	22
3.2.2. Reidratação.....	23
3.2.3. Quantificação do DNA obtido.....	24
3.3. Condições de Amplificação do DNA por reação de Reação em cadeia da polimerase (PCR).....	24
3.4. Purificação dos produtos de PCR.....	25
3.5. Reação de seqüenciamento.....	25
3.6. Análises das Sequências.....	25
3.7. Desenvolvimento dos oligonucleotídeos.....	26
4. Resultados e Discussão.....	27
5. Conclusão.....	37
6. Referências Bibliográficas.....	39

## INTRODUÇÃO

O eucalipto é originário da Austrália e foi introduzido no Brasil em 1856, encontrando no país as condições edafoclimáticas favoráveis para o seu desenvolvimento. Dessa maneira, tornou-se um dos gêneros mais importantes para a economia brasileira. A Bracelpa (Associação brasileira de celulose e papel) divulgou em julho de 2011 alguns dados do setor demonstrando que em 2010 as indústrias de papel e celulose foram responsáveis por cerca de US\$ 6,8 bilhões em exportação resultando em um saldo comercial de US\$ 4,9 bilhões.

Ao longo dos últimos anos, o setor florestal vem recebendo investimentos para pesquisa, levando o Brasil à condição de um dos maiores produtores de celulose de fibra curta do mundo.

Mesmo com o crescente incentivo aos programas de melhoramento genético, existem inúmeras perguntas para serem respondidas; exemplo disso é a questão relacionada com as doenças e pragas que comprometem o sistema produtivo do Eucalipto.

Recentemente, uma praga exótica, pertencente à família Psyllidae, foi identificada nas culturas de Eucalipto, trata-se do *Glycaspis brimblecombei*, cujo nome popular é psilídeo de concha.

Este inseto é originário da Austrália e foi detectado no Brasil pela primeira vez por Wilcken et al. (2003). O psilídeo de concha se assemelha a pequenas cigarrinhas e apresenta hábito sugador (Gallo et al, 2002), sendo uma praga amplamente distribuída nas plantações de eucalipto.

Os danos frequentemente observados na presença dos psilídeos de concha levam a alterações fisiológicas na árvore, além de possibilitar o estabelecimento de doenças secundárias. Sua ação pode levar a redução de 25% a 30% na produtividade do eucalipto (Cunha, 2004).

Mesmo com a sua ampla distribuição e ação ainda há dificuldades para caracterizar as diferenças nas populações do psilídeo de concha, devido a sua baixa variação morfológica. O uso de ferramentas moleculares é uma estratégia muito utilizada nos estudos populacionais, para indicar o nível de diversidade. Dentre estas ferramentas estão os marcadores moleculares, que auxiliam a responder diferentes questões, dentre elas as relacionadas à dinâmica populacional.

O DNA ribossomal (rDNA) vem sendo utilizado como uma sequência base para a confecção dos marcadores moleculares. Em eucariotos esta região

genômica é organizada em unidades repetitivas (RU), que apresentam sequências altamente conservadas (genes: 18S, 5.8S e 28S) e regiões intercalares que, em geral, variam dentro e entre populações (Hoy, 1994). Essas regiões conservadas flanqueiam as regiões variáveis que são chamadas de espaçadores internos transcritos (ITS 1 e ITS 2). As regiões espaçadoras podem ser utilizadas como marcadores em genética populacional para análises filogenéticas ou mesmo para identificação de espécies (Hillis e Dixon, 1991).

Diante desse contexto, as análises da divergência molecular utilizando marcadores moleculares ITS em diferentes populações de psílideo de concha auxiliariam na compreensão da dinâmica populacional dos insetos, além de permitir o desenvolvimento de programas de controle mais eficientes.

## 1. Revisão Bibliográfica

### 1.1. *Glycaspis brimblecombei*.

O *Glycaspis brimblecombei*, é um inseto exótico, originário da Austrália (Diodato e Venturini, 2007), chamado popularmente de psilídeo de concha. É uma espécie pertencente à ordem Hemiptera, subordem Sternorrhyncha e família Psyllidae (Gallo et al, 2002). Este inseto foi descrito pela primeira vez em 1964 por Moore, a partir de espécies coletadas na região de Queensland na Austrália (Diodato e Venturini 2007).

Os insetos pertencentes a esta família são diminutos, com comprimento do corpo entre 2,5 e 3,1 mm, semelhantes a minúsculas cigarrinhas (Gallo et al, 2002). Estudos morfológicos demonstram que as fêmeas são ligeiramente maiores que os machos (Cibrián-Tovar e Iñiguez-Herrera, 2001). Apresentam pernas posteriores saltatórias, antenas bem desenvolvidas que são relativamente largas e hábito sugador, alimentando-se da seiva das plantas (Ramirez, 2003).

Os adultos apresentam, em geral, coloração verde, sendo que as fêmeas podem variar do verde ao vermelho e a parte terminal de seu abdômen é arredondada com uma protuberância por onde são colocados os ovos.

Os machos, por sua vez, apresentam coloração variada entre cinza-alaranjada a amarelo-esverdeada; seu abdômen possui projeções na parte superior que são utilizadas para imobilizar a fêmea durante a cópula (Cibrián-Tovar et al., s.d.).

A ovoposição é realizada em folhas abertas e os ovos são dispostos em linha (figura 1A), agrupados ou individualizados, podendo existir até 300 ovos por folha, presos por um pedúnculo na superfície foliar (Cibrián-Tovar et al, s.d.). Os ovos são de cor amarelo-alaranjados, brilhantes e de formato oval (Ramirez, 2003).

Segundo estudos realizados por Phillips (1992), o período embrionário leva de 10 a 20 dias e culmina com a eclosão das ninfas (figura 1C). Porém, Firmino-Winckler et al (2009) observaram que à 26°C cada fêmea de psilídeo de concha pode ovipositar de 6 a 45 ovos por folha de *Eucalyptus sp.* e estes levam de sete a nove dias para eclodir, o que demonstra a adaptabilidade deste inseto em nosso país. Após a eclosão, as ninfas caminham sobre a folha e fixam-se preferencialmente próximo às nervuras foliares, introduzindo, então, seus longos estiletes na folha até atingir os vasos com seiva.

As ninfas desenvolvem-se sob uma concha construída a partir de secreções açucaradas (*honeydew*) (figura 1B), resultante da alimentação do inseto (Breda et al.,2010), esta proteção possui coloração branca e formato cônico abrigando-as até a fase adulta (figura 1D) (Sánchez, 2003).



**Figura 1-** Diferentes fases do desenvolvimento de *Glycaspis brimblecombei* (A): Ovos de *Glycaspis brimblecombei* ; (B): Conchas *honeydew* sobre a folha de eucalipto; (C): Ninfas de *Glycaspis brimblecombei* sobre a folha de eucalipto; (D): Adulto de *Glycaspis brimblecombei* (Wilcken, 2009).

Segundo Firmino-Winckler (2009), em estudo controlado realizado em laboratório, observou-se que a temperatura de 26 °C foi a mais adequada para o desenvolvimento das ninfas de psílideo de concha, apresentando 74% de viabilidade ninfal média. O mesmo estudo demonstrou ainda que nas temperaturas de 18° e 22 °C, a viabilidade média foi de 40,5%, sendo que, por fim, a de 30 °C, temperatura menos adequada, apresentou 22% de viabilidade.

Em uma segunda análise, sob as mesmas condições do trabalho anterior, o mesmo autor observou que a longevidade dos adultos varia de dois a sete dias a 26 °C, com ciclo de vida completo variável entre 15 e 34 dias (Firmino-Winckler, 2009)

Outros estudos biológicos realizados apontam que esta espécie possui cinco instares ninfais e seu ciclo biológico varia conforme as condições ambientais podendo ser de



26 a 57 dias com temperaturas médias de 16,5 °C e 22 °C (Dreistadt e Dahlsten, 2001; Sánchez et al., 2002; Cibrián-Tovar et al. (s.d)).

Por outro lado, dados obtidos em populações naturais por Sánchez et al. (2002) relataram que os adultos vivem de 10 a 25 dias, constatando, ademais, que o ciclo de vida sofreu grande variação durante o ano sendo curto no verão e outono e longo no inverno.

Os autores Cibrián-Tovar e Iñiguez-Herrera (2001) descreveram que há duas a quatro gerações do psilídeo de concha por ano em seu habitat de origem (Austrália). Já, no México, há um número maior de gerações, especialmente nos meses quentes e secos de primavera e verão, pois a ocorrência de chuvas faz com que as populações de psilídeo de concha diminuam, devido à queda das conchas e ao desenvolvimento de fungos sobre as folhas, o que acarreta na morte das ninfas (Ramirez, 2002).

No Brasil, em estudos realizados com populações de psilídeo de concha por Firmino (2004), foi observada uma variação no período entre a eclosão da ninfa e a fase adulta, de 16 a 45 dias, a 18 °C. Entretanto, em temperaturas mais elevadas, o ciclo passou a ter em média 21 dias. Essas variações demonstram a adaptabilidade desse inseto a diversas condições climáticas, o que explica a sua incidência em diversos estados brasileiros, pois em muitos deles as condições ambientais são favoráveis a seu desenvolvimento.

## **1.2. Danos e distribuição geográfica.**

Atualmente, o psilídeo de concha encontra-se distribuído em diversos países do mundo. Para os pesquisadores até o presente momento, é incerto como se deu a sua dispersão, pois o seu centro de origem é a Austrália.

Na América do Norte, o primeiro relato do psilídeo de concha ocorreu no estado da Califórnia, Estados Unidos, em 1998, infestando árvores de *Eucalyptus camaldulensis* (Brennan et al, 1999; Dahlsten e Rowney, 2000). Desde então, o inseto disseminou-se por diferentes estados americanos, aparentemente de maneira natural (Garrison, 1998). Na Flórida, foram encontrados na primavera de 2001, em parques turísticos na área de Orlando (Halbert et. al,2009). No México, sua primeira detecção foi em 1999, pontualmente, mas, no início de 2001, muitos estados mexicanos reportaram a sua presença em diferentes espécies de eucalipto (Ramirez, 2003).

Na América do Sul, a maioria das plantações de eucalipto são clonais e estão distribuídas principalmente no Chile, Argentina e Brasil, destinando-se principalmente a produção de celulose. Esta estratégia de plantações clonais é utilizada por várias empresas do

setor florestal, o que propicia o estabelecimento de um grande número de pragas, devido a tal fato, hoje, temos relatos de que pelo menos oito insetos australianos se alimentam das árvores, incluindo quatro espécies de psilídeo (*B. occidentalis*, *C. eucalypti*, *C. spatulata*, e *Glycaspis brimblecombei*), que infestam e destroem grandes áreas plantadas (Paine et al, 2011).

A espécie *Glycaspis brimblecombei* foi encontrada no Chile pela primeira vez em 2002 (Dahlsten, 2003), em 2003 no Brasil e em 2004 na Argentina (Bouvet et al, 2005).

No Brasil, o relato inicial do psilídeo de concha foi no estado de São Paulo, em mais de 30 municípios (Wilcken et al, 2003). Atualmente, concentram-se principalmente nos estados de Minas Gerais, Goiás, Paraná, Mato Grosso do Sul, São Paulo (Wilcken et al, 2003), Santa Catarina (Lutinski et al, 2006), Espírito Santo (Resende e Santana, 2008), Rio Grande do Sul (Oliveira et al, 2006) e Bahia (Masson et al, 2009)., sendo certo que sua ocorrência está associada a locais de grande luminosidade (Oliveira, et al, 2006).

A espécie *G. brimblecombei* é a mais prejudicial dentre outras da mesma família, que infestam eucalipto, estabelecidas na América do Norte. Tal inseto possui uma gama de hospedeiros relativamente ampla no gênero *Eucalyptus sp.* (Brennan e Gill, 1999). As espécies *E. camaldulensis* e *E. tereticornis* são tidas como altamente suscetíveis à infestação por psilídeos de concha (Wilcken et al., 2003), mas também são encontrados em: *E. blakelyi*, *E. brassiana*, *E. bridgesiana*, *E. camphora*, *E. dealbata*, *E. diversicolor*, *E. globulus*, *E. mannifera*, *E. mannifera maculosa*, *E. nitens* e *E. sideroxylon* (Brennan et al., 2001; Hollis, 2004).

O psilídeo de concha, por apresentar hábito alimentar fitófago, causa inúmeros danos as árvores infestadas, principalmente quando observado em grande número. Além disso, a presença deste inseto favorece o ataque de pragas secundárias e a ocorrência de doenças. Os danos frequentemente observados pela presença do psilídeo de concha são: enrolamento e deformação do limbo foliar, formação de galhas; superbrotamento, indução ao aparecimento de fumagina (fungo saprófita de coloração negra que se desenvolve sobre as excreções açucaradas que o inseto elimina), transmissão de agentes fitopatogênicos (bactérias, vírus e micoplasmas), descoloração das folhas, redução da área fotossintética das plantas, redução no crescimento das árvores e secamento dos ponteiros, podendo levar as árvores à morte (Costa Lima, 1942; Hodkinson, 1974; Dreistadt e Dahlsten, 2001; Gallo et al, 2002). Sua presença acarreta, pois, grandes perdas para o setor florestal, estando relacionada a 15% de mortalidade das árvores de eucalipto no seu primeiro ano de vida e até 40% no segundo ano (figura 2) (Gill, 1998).



**Figura 2** – Danos observados em árvores de *Eucalyptus sp.*, provocado pela presença de *Glycaspis briblecombei* (Wilcken, 2004).

Com isso, verificamos que o psílideo de concha acarreta grandes danos as plantações de eucalipto de diferentes espécies, devido a sua rápida dispersão e a presença das conchas em grande número na superfície foliar. Dessa forma, pode resultar em um impacto considerável na produtividade da eucaliptocultura brasileira.

### **1.3. Marcador ITS1 (*Internal Transcribed Spacer 1*)**

Os marcadores moleculares são todo e qualquer fenótipo molecular oriundo de um gene expresso ou de um segmento específico do DNA (Ferreira e Grattapaglia, 1996). Na última década foi crescente a aplicação deles nos estudos genéticos e em programas de melhoramento (Brammer, 2000).

Os estudos de melhoramento genético, incorporando técnicas de biologia molecular, são ferramentas importantes para a compreensão da variabilidade populacional de pragas, além de possibilitar a exploração de sua biologia, auxiliando no manejo e aumentando a eficácia do controle químico e biológico.

Com o advento da reação em cadeia da polímerase (PCR) e do seqüenciamento do DNA, as técnicas para os estudos com DNA ribossômico (rDNA) tornaram-se relativamente de fácil aplicação e de baixo custo sendo muito utilizadas para estudos filogenéticos em todos os níveis taxonômicos, permitindo uma melhor avaliação da homologia dos caracteres moleculares.

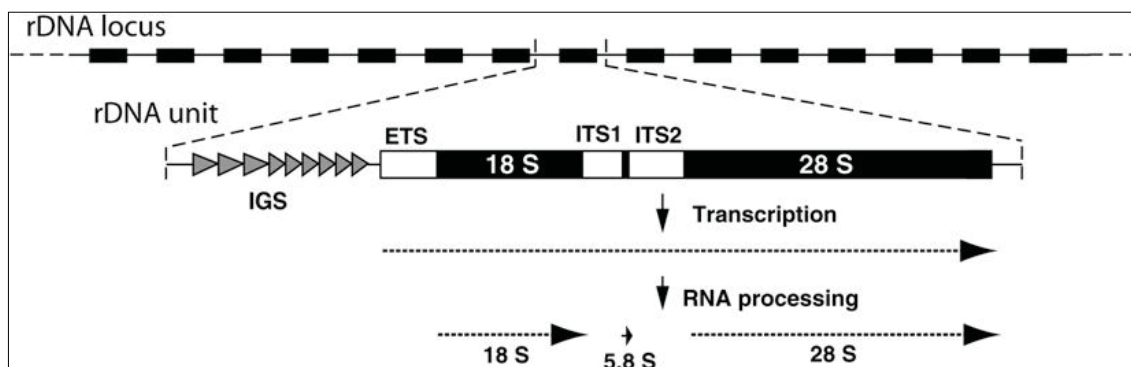
O sequenciamento permite o estudo da mesma região do genoma de várias espécies aparentadas ou não e a sua comparação, originando uma classificação mais natural ao nível da espécie (Judd et al., 1999).

A determinação da sequência de nucleotídeos que compõem um fragmento de DNA representa um dos processos finais de sua análise e é a estratégia mais direta no estudo dos polimorfismos existentes. O uso desta técnica é consistente, reprodutível, informativa e adaptada para diferentes níveis de discriminação por meio da seleção de regiões específicas do genoma.

Um instrumento eficiente para a identificação da variabilidade genética entre indivíduos de uma mesma população ou entre indivíduos de populações diferentes é o sequenciamento de regiões gênicas variáveis. Entre essas regiões, destaca-se o sequenciamento das regiões denominadas ITS (*Internal Transcribed Spacers*), presentes no genoma nuclear, e que integra o gene que codifica as subunidades 18S, 5.8S e 28S do RNA ribossômico (rRNA). Devido a alta taxa de substituição nucleotídica no ITS, eles têm sido empregados como ferramentas para o estudo tanto da diversidade genética como para desenvolver estudos filogenéticos entre os mais variados organismos (Schmickl et al, 2010).

O rDNA dos eucariotos é constituído por uma família multigênica, responsável pela síntese dos rRNAs, está organizado em unidades repetitivas (RU) em *tandem* nas regiões organizadoras nucleolares (NORs) (Hoy, 1994).

As unidades possuem sequências codificadoras altamente conservadas e sequências intercalares que, em geral, variam dentro e entre populações. Na maioria dos animais existem de 100 a 500 cópias das RU dos rDNAs no genoma nuclear (Hoy, 1994). Cada unidade do rDNA eucarioto consiste de: um espaçador externo (*External Transcribed Spacer*, ETS), transcrito em uma sequência que contém a extremidade 5' da molécula precursora do rRNA; uma região codificadora do rRNA 18S; o primeiro espaçador interno (*Internal Transcribed Spacer*, ITS1), que é transcrito; a região que codifica o rRNA 5.8S; um segundo espaçador interno (ITS2); uma região codificadora do rRNA 28S e um espaçador externo (*Non Transcribed Spacer*, NTS), que não é transcrito (Flavell e O'Dell, 1979; Long e Dawid, 1980; Elder e Urner, 1995) (figura 3). Os ITSs apresentam alta taxa de divergência quando comparados com as sequências codificadoras dos rRNA 18S, 5.8S e 28S (Schlötterer, et al., 1994).



**Figura 3-** Organização dos genes do DNA ribossômico (rDNA) em eucariontes. Os genes são organizados em unidades de repetições seriadas como diagramado no topo. A unidade típica é mostrada em detalhe ampliado. As posições dos três genes rDNA (18S, 5.8S e 28S) são indicados com caixas sólidas, enquanto as regiões processadas a partir do transcrito primário estão em caixas abertas (ETS, espaçador transcrito externo; ITS, espaçador interno transcrito). Entre as unidades de transcrição, estão os espaçadores intergênicos (IGS), que na maioria das espécies são compostos por uma ou mais sequências internas repetidas (setas sombreadas). A extensão e a direção da região transcrita de cada unidade, bem como o final do rRNAs maduros provenientes da transcrição são mostrados na parte inferior, com flechas pontilhadas (Eickbush et al., 2007)

A presença das sequências altamente conservadas (18S, 5.8S e 28S) flanqueando regiões muito variáveis (ITS 1 e ITS 2), favorece a construção de iniciadores universais (*primers*), que podem ser utilizados na PCR, permitindo o estudo de diferentes espécies oriundas de várias regiões. Portanto, os espaçadores podem ser usados para inferir filogeneticamente a relação entre espécies, para identificação de espécies ou linhagens, para estudos de hibridização e como marcadores em genética populacional (Hillis e Dixon, 1991).

As principais funções dos espaçadores, que garantem o conservadorismo estrutural dos mesmos, são: o reconhecimento de sinais para o processamento da transcrição do rRNA (Hillis e Dixon, 1991) e também na maturação do rRNA (Gonzalez et al., 1990)

Estudos utilizando os marcadores ITS foram feitos em diversos eucariotos. Herwerden et al., (1999) utilizaram dados do sequenciamento da região ITS1 para analisar as relações filogenéticas e a variação intra e interespecífica em espécies do gênero *Paragonimus* (Trematoda: Digenea). Em carrapatos do gênero *Cecidophyopsis*, diferenças na sequência da região ITS1 foram utilizadas para identificar espécies (Kumar et al., 1999). Além disso, variações da sequência da região ITS1 foram encontradas para dois grupos de peixes ciclídeos indicando uma origem monofilética (Booton et al., 1999). Já, em insetos, as regiões espaçadoras ITS1 e ITS2 vêm sendo utilizadas em muitos estudos inferindo sobre a análise das relações evolutivas entre classes taxonômicas próximas.

Em dípteros do gênero *Anopheles*, foi realizada a identificação de espécies crípticas utilizando-se dados do sequenciamento da região ITS2 (Beebe et al, 1999). Em outro estudo, diversas espécies crípticas de *Culex* foram diferenciadas por meio de produtos

amplificados correspondentes à região intergênica ITS1 (Toma et.al, 2000). Em *Drosophila* do *Cluster buzzatii*, Lucca Jr, M. (2006) observou que o espaçador intergênico ITS1 é adequado para a análise das relações filogenéticas por corresponder a uma região não codificadora que apresenta alta variabilidade interespecífica e pelo fato de que as espécies do *cluster buzzatii* compreendem um grupo evolutivo em processo de especiação recente.

A diferenciação genética entre populações de uma espécie constitui o primeiro estágio da divergência evolutiva. Essa diferenciação resulta, na maioria dos casos, da ação de diferentes ambientes a que cada população está sujeita e a variabilidade preexistente na espécie (Marques, 2003).

Diante do exposto, podemos dizer que os marcadores ITS auxiliam nos estudos com espécies de insetos recém introduzidos e permitem que se façam inferências das diferenças apresentadas dentro e entre algumas populações.

## 2. Objetivo

Analisar a diversidade de populações de *Glycaspis brimblecombei*, coletados de diversas regiões do estado de São Paulo, por meio do uso do marcador molecular ITS1.

### 2.1. Objetivos Específicos

- Identificação da primeira região espaçadora interna transcrita (ITS1), flanqueada pelos genes 18S e 5.8S, nas sequências obtidas de *Glycaspis brimblecombei*.
- Análise das sequências de *Glycaspis brimblecombei* das diferentes populações, utilizando os diferentes parâmetros de diversidades haplotípica e diversidade nucleotídica.
- Análise dos sítios polimórficos identificados nas sequências das populações de *Glycaspis brimblecombei*.
- Desenvolvimento de um marcador molecular que auxilie na genotipagem das populações de *Glycaspis brimblecombei*.

### 3. Material e métodos

#### 3.1. Amostragem

O material biológico objeto de análise compôs-se, exclusivamente, de psilídeos de concha adultos pertencentes à espécie *Glycaspis brimblecombei*. As ninfas foram coletadas em diferentes regiões do estado de São Paulo (tabela 1), encaminhadas ao Laboratório de Entomologia, no Departamento de Produção Vegetal - Defesa Fitossanitária da Faculdade de Ciências Agrônomicas (FCA/UNESP - Campus de Botucatu), inseridas e mantidas em gaiolas de criação até a fase adulta sob a supervisão do professor Dr Carlos Frederico Wilcken. Um total de 75 amostras, distribuídas em quatro populações (tabela 1), foram enviadas vivas para o Centro de Análises Genômicas e Moleculares (CAGEM), do Departamento de Genética, Instituto de Biociências (IB), UNESP, Campus de Botucatu, estado de São Paulo, sendo então procedida a extração de seus respectivos DNA's.

**Tabela 1-** Amostragem das populações de *Glycaspis brimblecombei* utilizadas nesse trabalho.

Nº Amostra	Local das Coletas Cidade	Local das Coletas			Data da Coleta	Nº de Indivíduos
		Latitude	Longitude	Altitude		
1	Fazenda Lageado-Botucatu/SP	22° 53' 57" S	48° 25' 02" O	833m	29/07/2010	12
2	Criação de Laboratório-2ª geração	22° 50' 44" S	48° 26' 04" O	808m	04/08/2010	24
3	Quadra/SP	23° 16' 22" S	48° 08' 55" O	710m	02/08/2010	11
4	Pedra Bela/SP	22° 47' 45" S	46° 26' 42" O	1105m	30/10/2010	28
<b>Total</b>						<b>75</b>

**Legenda-** Nº: Número.

#### 3.2. Métodos

##### 3.2.1. Extração de DNA de psilídeo de concha

O primeiro protocolo para a extração do DNA do psilídeo de concha utilizado foi descrito por Jowett (1986). Em cada microtubo, contendo uma única amostra ou várias (*pool*) foi adicionado 200 µl de solução de homogeneização [Tris-HCl 1 mM (pH = 7,5), NaCl 60 mM e EDTA 50 mM], os insetos foram macerados



com o auxílio de pistilos, até que todo material pôde ser visivelmente dissolvido e diluído nas soluções. Após, se adicionou 200 µl de solução de lise [SDS 1,25%, Tris-HCl 0,3 mM (pH = 9,0), EDTA 0,1 Mm e sacarose 5%], em seguida foi acrescentado 5 µl de proteinase K, na concentração final de 100 µg/ml. Os tubos foram novamente homogeneizados e incubados por uma hora a 65 °C em banho-maria sob agitação.

Em seguida, as amostras foram resfriadas em gelo por 5 min, adicionou-se 120 µl de acetato de potássio 8 M (gelado) e retornaram ao gelo por uma hora. Os tubos foram centrifugados a 14000 rpm, a uma temperatura 4 °C por 10 min. As amostras foram retiradas da centrífuga com devido cuidado para que as diferentes fases no tubo permanecessem separadas. O sobrenadante foi transferido para outro microtubo, e adicionou-se dois volumes de etanol 100%. Os tubos foram homogeneizados levemente e ficaram em repouso por 5 min. Depois disso, as amostras foram centrifugadas por 5 min a 25 °C e 14000 rotações por minuto (rpm), em seguida retirou-se o sobrenadante e o *pellet* foi mantido.

O *pellet* foi lavado duas vezes com etanol a 70% e centrifugado a 14000rpm por 2 min a 25 °C. Posteriormente, o etanol foi dispensado e os microtubos invertidos para a secagem do *pellet* de DNA, sendo levados para o *Speed Vacuum*.

O DNA obtido foi diluído em 30 µl de água deionizada (miliQ) autoclavada e adicionado o volume de 4 µl RNase (10 mg/ml). Em seguida, o DNA foi incubado a 37 °C de 30 a 60 min e armazenado a – 20 °C.

O segundo protocolo de extração de DNA utilizado foi com a resina Chelex 100 (Sigma). Cada microtubo, contendo uma amostra de Psilídeo de concha , foi macerada com 100 µl de Chelex a 5%. Posteriormente, foi adicionado 10 µl de proteinase K (10 mg/ml) e os tubos, incubados em banho-maria sob agitação à 65 °C por 15 horas. No dia seguinte, as amostras foram incubadas em banho-maria à 95 °C por 15 min. E, logo após, foram centrifugadas a 14000 rpm por 1 min. O sobrenadante foi transferido para outro microtubo.

### 3.2.2. Reidratação

O primeiro método de reidratação utilizado foi descrito por Monnerat (2003). As amostras armazenadas em álcool etílico absoluto (100%) foram lavadas em

água destilada por 5 min. Posteriormente, a água destilada foi dispensada e as amostras foram colocadas para secagem em temperatura ambiente, em seguida foi adicionado 40 µl de tampão de eluição - TE (Tris EDTA pH 8,0) e colocadas sob agitação por 1h e 30 min.

O segundo método de reidratação foi descrito por Oliveira e colaboradores (2002). O protocolo consiste na lavagem das amostras armazenadas em álcool etílico absoluto (100%) com 50 µl de água destilada por 5 min., em seguida, as amostras foram secas a temperatura ambiente sob papel filtro e, depois, transferidas para microtubo contendo 50 µl de TE então, os tubos foram mantidos sob agitação a 150 rpm na temperatura de 28 °C por 30 min.

### **3.2.3. Quantificação do DNA obtido**

A quantificação foi realizada em espectrofotômetro (NanoDrop ND-1000) e foram obtidas as concentração do DNA em ng/µl, além de mensurar a qualidade do DNA por meio de comparações de valores de absorbância e grau de pureza.

### **3.3. Condições de Amplificação do DNA por reação de PCR (Reação em cadeia da polimerase)**

Os oligonucleotídeo utilizados são específicos para a primeira região espaçadora interna (ITS1) do DNA ribossomal: rDNA<sub>2</sub> (5'-TTGATTACGTCCCTGCCCTTT-3') (Vrain et al., 1992) e rDNA<sub>1.58S</sub> (5'-ACGAGCCGAGTGATCCACCG-3') (Cherry et al., 1997). As reações consistiram de 1 µl DNA genômico, 0.3 µM de cada *primer*, 5 µl de PCR Master Mix (Promega Corporation), água destilada e deionizada autoclavada para um volume final de 10 µl.

As condições de amplificação utilizadas, descritas por Szalanski et al. (1999), consistem em: 1 ciclo de 5 min a 94 °C, 35 ciclos de 45 s a 94 °C, 1 min a 52 °C, 2 min a 72 °C, e 1 ciclo de extensão final de 5 min a 72 °C e término com 10 °C.

O produto de amplificação foi detectado por eletroforese, na corrente constante de 120 mA por aproximadamente 2 h. Um volume de 5 µl de cada amostra juntamente com 2,5 µl de tampão de carregamento (TC) foi adicionado em cada canaleta do gel de agarose 1%,

com tampão Tris-Borato EDTA (TBE 1X). O gel foi corado com brometo de etídeo 1% e comparado com um padrão de peso molecular de 100 pares de base (pb).

### 3.4. Purificação dos produtos de PCR

A purificação foi realizada por reação enzimática ao adicionar 2  $\mu$ l da enzima ExoSAP IT (GE Healthcare) a 8  $\mu$ l do produto de PCR de acordo com as recomendações do fabricante.

### 3.5. Reação de sequenciamento

Para cada amostra foram realizadas duas reações, sendo uma para o oligonucleotídeo *forward* (F) e outra para o *reverse* (R), com um volume de DNA na concentração de 100 ng/ $\mu$ l de acordo com o tamanho do fragmento. Adicionou-se 1,0  $\mu$ l de Tampão de Sequenciamento (Tris-HCl 1M pH 9.0 e MgCl<sub>2</sub> 50mM), 2,0  $\mu$ l Big Dye e 1,0  $\mu$ l de primer (5 pmol/ $\mu$ L), água destilada ou deionizada autoclavada para o volume final de 10  $\mu$ l.

O programa de amplificação consistiu em desnaturação inicial de 1 min a 96°C, 35 ciclos de 10 s a 96 °C, 5 s a 50 °C e 4 min a 60 °C, permanecendo a 10 °C. As sequências foram obtidas a partir do sequenciador automático modelo 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems).

### 3.6. Análises das Sequências

Os eletroferogramas das sequências *forward* e *reverse*, gerados automaticamente, foram inspecionados visualmente através do *software* ChromasPro versão 1.5 (Copyright © 2003-2009 - Technelysium Pty Ltd ChromasPro) (<http://www.technelysium.com.au/chromas.hlp>), no qual o consenso das sequências foram formados. Após obtenção do consenso, foi realizado o alinhamento utilizando o *software*

Clustal X versão 2.1(Larkin et al.,2007), e utilizando a ferramenta BLASTn (Altschul et al., 1990) foi feita a comparação de cada sequência com as disponíveis no Banco de Dados GenBank do NCBI.

O arquivo gerado no *software* Clustal X versão 2.1 (Larkin et al.,2007) foi analisado no *software* Geneious versão 4.8.5 (Drummond et al.,2010), para localizar a sequência ITS1 possibilitando seu isolamento utilizando a ferramenta *Trim End*.

Com o uso do *software* DnaSP versão 5.10 (Rozas et al., 2009) e da ferramenta *DNA polymorphism* pôde-se avaliar as populações quanto: o números de sítios polimórficos, a diversidade de nucleotídeos ( $P_i$ ) e a quantidade de haplótipos ( $h$ ). Com a ferramenta *Haplotype Data File* verificou-se a distribuição dos haplótipo e a quantidade de sítios polimórficos.

### **3.7. Desenvolvimento dos oligonucleotídeos**

A partir da localização dos sítios polimórficos nas sequências do ITS1 de *Glycaspis brimblecombei* com o uso do *software* DnaSP versão 5.10 (Rozas et al., 2009), utilizou-se o *software* Geneious versão 4.8.5 (Drummond et al.,2010) para o desenvolvimento dos oligonucleotídeos específicos que serviram como marcador molecular na genotipagem dos indivíduos.

#### 4. Resultados e Discussão

O primeiro método de extração de DNA utilizado (Jowett, 1986) não foi eficiente para a obtenção do DNA, mesmo ao realizar alterações na concentração dos reagentes e/ou no número de insetos utilizados em uma única amostra (*pool*). O DNA somente foi obtido a partir da técnica com a resina *Chelex*, a qual é amplamente empregada na extração de DNA de material biológico de pouca qualidade e/ou quantidade.

O material biológico utilizado consistia de psilídeos de concha que foram coletados em 2005 e 2006, e estavam fixados em álcool etílico absoluto. Porém, a fixação de insetos em álcool pode prejudicar a qualidade e a quantidade do DNA extraído. Em estudo realizado com formigas, *Acromyrmex heyeri*, Grutzmacher (2006) testou a qualidade e a quantidade de DNA extraídos em amostras armazenadas em diferentes concentrações de álcool etílico e acabou por verificar que a fixação por um período maior que oito meses comprometeu a qualidade e a quantidade do DNA. Da mesma forma, Carvalho (2000) observou que formigas do gênero *Atta* armazenadas por mais de sete meses em álcool etílico 95% apresentaram baixa qualidade e concentração de DNA.

Assim, devido ao fato dos psilídeos de concha disponibilizados para a amostragem estarem fixados em álcool etílico por um longo período, ao extrair o DNA foi observada uma baixa quantidade e qualidade do citado ácido nucleico. Desse modo, com o objetivo de obter DNA de melhor qualidade foram testados diferentes protocolos de reidratação (Oliveira et al., 2002; Monnerat et al., 2003). Mesmo ao reidratar as amostras, o DNA obtido foi de baixa qualidade, dificultando a amplificação dos *primers*. A não eficácia do processo de reidratação pode estar relacionada ao tempo de armazenamento dos insetos em álcool etílico (3 a 4 anos).

Diante disso, o DNA das amostras pode ser obtido a partir da padronização do método de armazenamento, as quais foram transportadas vivas para Centro de Análises Genômicas e Moleculares (CAGEM-IBB/UNESP-Botucatu) e acondicionados a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ . As modificações realizadas possibilitaram a obtenção de um DNA com valores de concentração e qualidade (absorbância) desejados com média de 197,3ng/ul e 1,45, respectivamente (tabela 2).

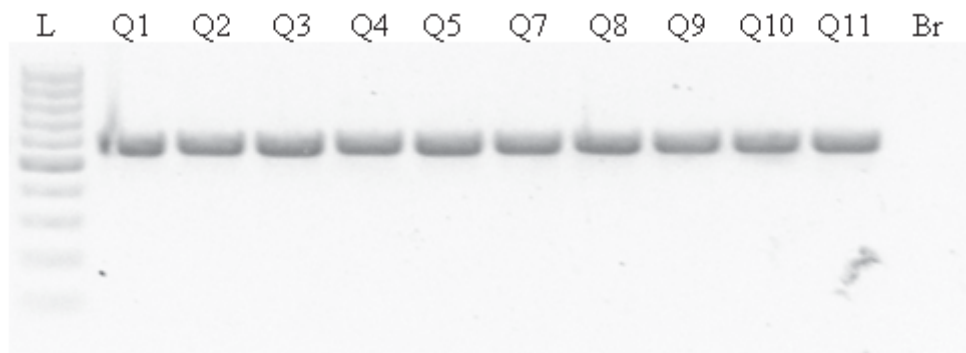
**Tabela 2** – Valores de concentração (ng/μl) e absorvância do DNA extraído

<b>Amostras</b>	<b>Concentração do DNA (ng/ul)</b>	<b>Valor de Absorbância</b>
Botucatu 1	35,1	1,46
Botucatu 2	136,5	1,47
Botucatu 3	134,7	1,61
Botucatu 4	114,3	1,33
Botucatu 5	168,3	1,58
Botucatu 6	104	1,53
Botucatu 7	116	1,6
Botucatu 8	98,8	1,47
Botucatu 9	80,9	1,55
Botucatu 10	98,9	1,58
Botucatu 11	102,3	1,11
Botucatu 12	194,7	1,56
Quadra 1	213,4	1,47
Quadra 2	188,7	1,48
Quadra 3	193,8	1,43
Quadra 4	300,6	1,46
Quadra 5	337,5	1,6
Quadra 7	158	1,43
Quadra 8	224,1	1,49
Quadra 9	176,5	1,39
Quadra 10	287,2	1,54
Quadra 11	158	1,42
Pedra Bela 1	217,5	1,3
Pedra Bela 2	371	1,58
Pedra Bela 3	282	1,34
Pedra Bela 4	223,8	1,43
Pedra Bela 5	268,5	1,48
Pedra Bela 6	227,6	1,46
Pedra Bela 7	195,6	1,43
Pedra Bela 8	216	1,42
Pedra Bela 9	251,8	1,45
Pedra Bela 10	222,7	1,42
Pedra Bela 11	278,4	1,55
Pedra Bela 12	189,2	1,49
Pedra Bela 13	228,7	1,48
Pedra Bela 14	156,9	1,47
Pedra Bela 15	224,2	1,38
Pedra Bela 16	369,3	1,58
Pedra Bela 17	280,3	1,48
Pedra Bela 18	192,4	1,3
Pedra Bela 19	238,7	1,56

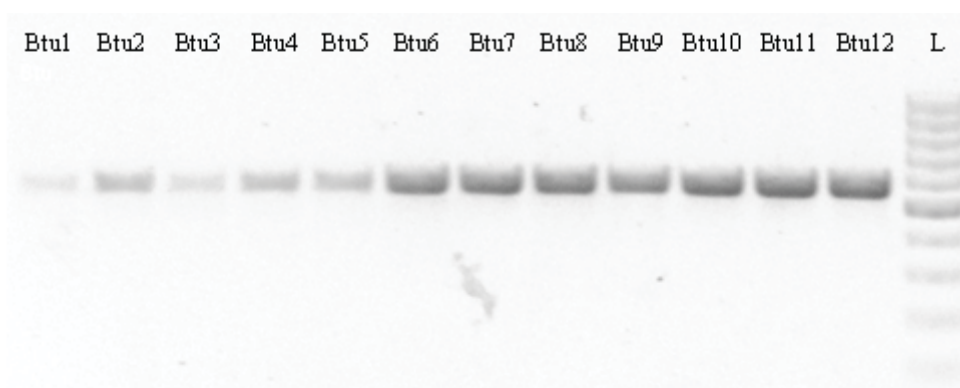
**Tabela 2** – Concentração e qualidade (260/280) do DNA extraído. (continuação)

<b>Amostras</b>	<b>Concentração do DNA (ng/ul)</b>	<b>Valor de Absorbância</b>
Pedra Bela 20	205,7	1,39
Pedra Bela 21	205,5	1,45
Pedra Bela 22	190,7	1,3
Pedra Bela 23	241,2	1,4
Pedra Bela 24	322,7	1,25
Pedra Bela 25	226	1,33
Pedra Bela 26	280,1	1,6
Pedra Bela 27	172,8	1,35
Pedra Bela 28	286	1,51
Cria 2 <sup>a</sup> geração 1	143,1	1,29
Cria 2 <sup>a</sup> geração 2	186,5	1,41
Cria 2 <sup>a</sup> geração 3	176,7	1,34
Cria 2 <sup>a</sup> geração 4	143,6	1,27
Cria 2 <sup>a</sup> geração 5	272,3	1,25
Cria 2 <sup>a</sup> geração 6	273	1,57
Cria 2 <sup>a</sup> geração 7	179,1	1,55
Cria 2 <sup>a</sup> geração 8	173,8	1,37
Cria 2 <sup>a</sup> geração 9	180,2	1,44
Cria 2 <sup>a</sup> geração 10	226,3	1,51
Cria 2 <sup>a</sup> geração 11	150,3	1,35
Cria 2 <sup>a</sup> geração 12	154,6	1,4
Cria 2 <sup>a</sup> geração 13	147,3	1,39
Cria 2 <sup>a</sup> geração 14	185,7	1,57
Cria 2 <sup>a</sup> geração 15	127,5	1,45
Cria 2 <sup>a</sup> geração 16	157	1,67
Cria 2 <sup>a</sup> geração 17	206,5	1,67
Cria 2 <sup>a</sup> geração 18	166,2	1,58
Cria 2 <sup>a</sup> geração 19	179,4	1,49
Cria 2 <sup>a</sup> geração 20	128,3	1,38
Cria 2 <sup>a</sup> geração 21	192,9	1,45
Cria 2 <sup>a</sup> geração 22	147,6	1,39
Cria 2 <sup>a</sup> geração 23	162,9	1,45
Cria 2 <sup>a</sup> geração 24	151,2	1,17
<b>Média</b>	<b>197,3</b>	<b>1,45</b>

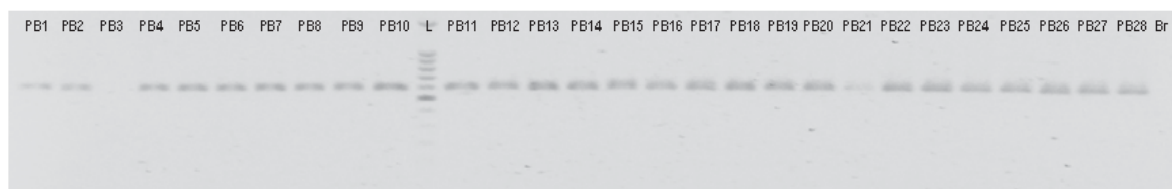
A partir da padronização da extração do DNA das amostras discutidas anteriormente foi possível observar um fragmento com aproximadamente 600 pb na amplificação com os *primers* rDNA<sub>2</sub> e rDNA<sub>1.58S</sub> (figuras 4-7).



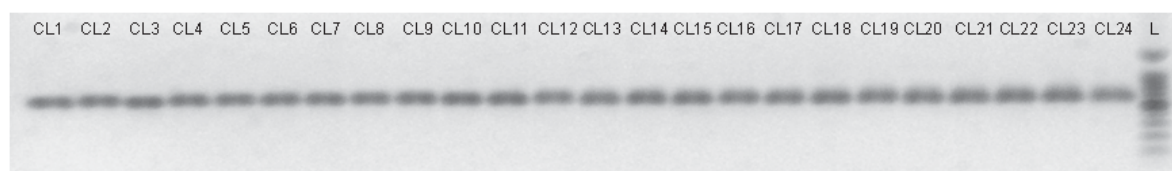
**Figura 4** – Gel de agarose a 1% corado com Brometo de Etídeo 1% com o *primer* ITS1 com amostras da população de Quadra-SP. L: *Ladder* 100pb; Q1-11: Amostras *G. brimblecombei*; Br: controle negativo.



**Figura 5** – Gel de agarose a 1% corado com Brometo de Etídeo 1% com o *primer* ITS1 com amostras da população de Botucatu - SP. L: *Ladder* 100pb; Btu1-12: Amostras *G. brimblecombei*.



**Figura 6** – Gel de agarose a 1% corado com Brometo de Etídeo 1% com o *primer* ITS1 com amostras da população de Pedra Bela - SP. L: *Ladder* 100pb; PB1-28: Amostras *G. brimblecombei*; Br: controle negativo.



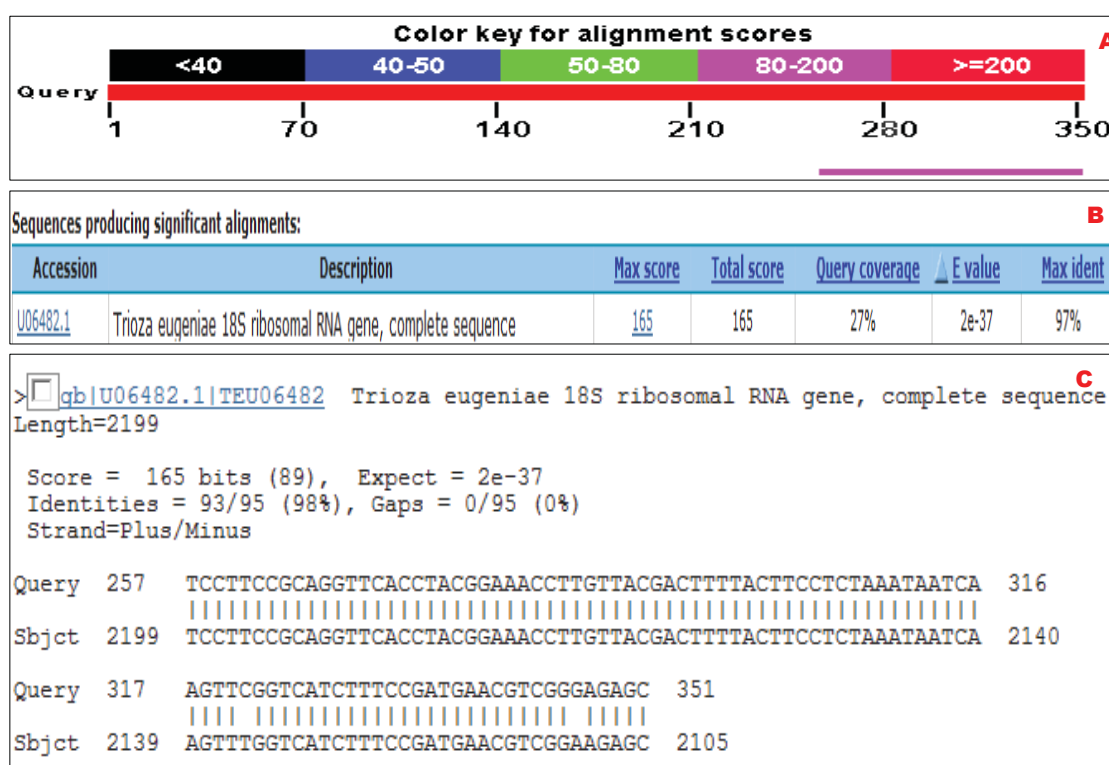
**Figura 7** – Gel de agarose a 1% corado com Brometo de Etídeo 1% com o *primer* ITS1 com amostras da população de Criação de Laboratório (2ª geração) - SP. L: *Ladder* 100pb; CL1-24: Amostras *G. brimblecombei*.



A partir dos produtos de PCR foi possível obter sequências que correspondiam a porção 3' do gene 18S, a porção 5' do gene 5.8S e a região espaçadora interna ITS1 localizada entre estes genes.

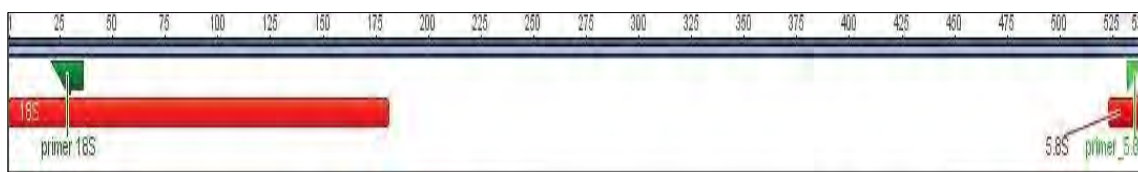
Das 75 amostras iniciais, uma foi descartada devido a não obtenção do DNA e três sequências foram retiradas da análise pois apresentaram má qualidade.

As 71 sequências foram comparadas no banco de dados NCBI, apresentando 97% de identidade e *E-value* de  $2e-37$  com a sequência completa do 18S rRNA de *Trioza eugeniae* (U06482.1) (figura 8), inseto Hemíptero pertencente à família Psyllidae.



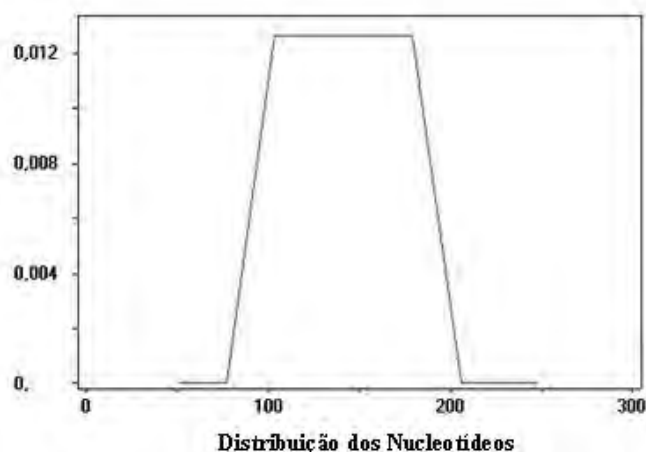
**Figura 8** – Dados obtidos a partir da análise comparativa no NCBI. (A): alinhamento da sequência da amostra BTU1; (B): valores de identidade, *E-value* observados; (C): região em que a sequência da amostra BTU1 apresentou identidade com a sequência do rRNA 18S de *Trioza eugeniae*.

Ao delimitar a primeira região espaçadora interna transcrita (ITS1) nas 71 sequências, oito não apresentaram o tamanho observado em 88,73% das sequências, de 291 pb, sendo excluídas das análises posteriores. A partir do alinhamento das 63 sequências foram delimitadas as regiões dos dois genes ribossômicos 18S e 5.8S (figura 9), que flanqueiam a região ITS1, e o local em que os *primers* pareiam nestes genes conservados (figura 9).

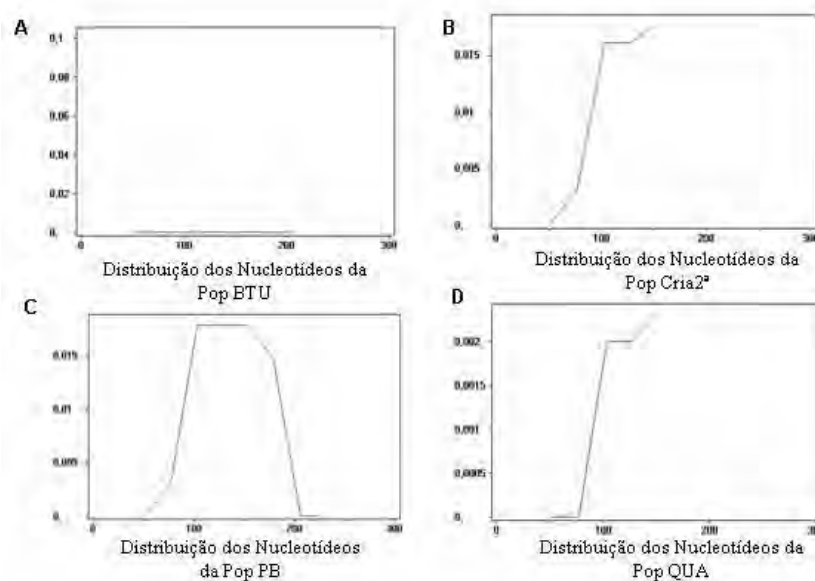


**Figura 9** – Sequência consenso do indivíduo3 da população de Botucatu(BTU3) com as anotações dos genes ribossomais 18S e 5.8S (em vermelho), espaçador interno transcrito1(ITS1) entre os genes e marcação de pareamento dos *primers* rDNA (em verde).

A sequência ITS1, após ser isolada por meio de cortes (*trimming*) nas extremidades, retirando os intervalos correspondentes aos genes 18S e 5.8S, nas 63 sequências, foi analisada. As sequências apresentaram cinco sítios polimórficos (tabela 5), no intervalo de aproximadamente 80 a 200 pb (figura 10). Os sítios polimórficos em cada população estavam distribuídos diferentemente (figura 11). A população de Pedra Bela apresentou uma maior distribuição dos seus sítios polimórficos, no intervalo de 50 a 210 pb (figura 11C). Já a população de Botucatu não apresentou polimorfismos (figura 11A). Nas populações de Quadra e Criação de Laboratório a distribuição dos sítios polimórficos apareceu de forma crescente ao longo da sequência (figura 11 B e D).



**Figura 10** - Distribuição dos sítios polimórficos nas sequências das populações.



**Figura 11-** Distribuição dos sítios polimórficos em (A) população de Botucatu (Pop BTU), (B) população de Criação de laboratório (Pop Cria2ª), (C) população de Pedra Bela (Pop PB) e (D) população de Quadra (Pop QUA).

A presença de sítios polimórficos em dois ou mais pontos de um mesmo cromossomo ou de uma região do DNA de interesse identificam genótipos distintos, denominados haplótipos. Esses sítios podem ser polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs), polimorfismos de inserção e deleção (indels), ou quaisquer outros polimorfismos (Templeton, 2005).

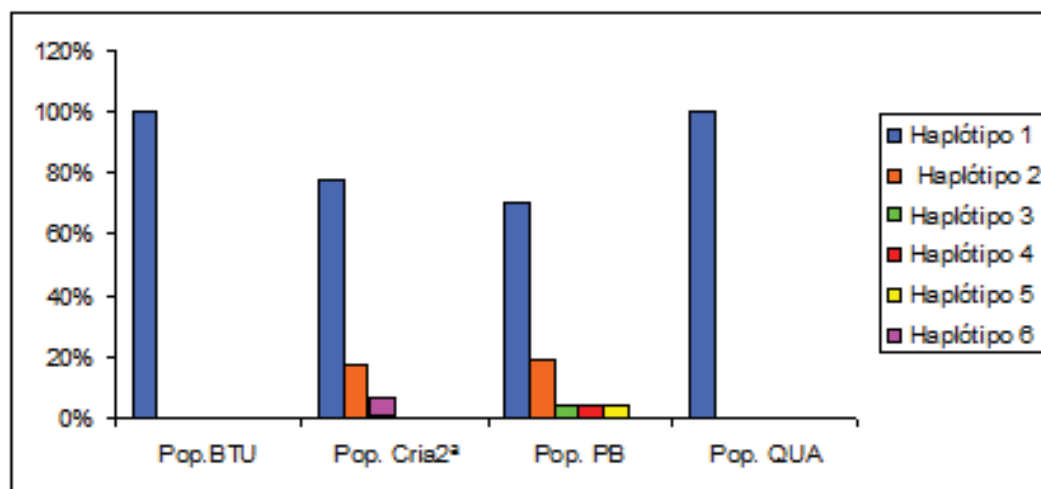
As variações observadas no intervalo de 120pb (figura 10) distribuídas nas 63 sequências resultaram na identificação de seis haplótipos. O haplótipo 1 apresentou a maior frequência relativa dentre todos os haplótipos com 80,9% do total de sequências analisadas, enquanto que os haplótipos 3, 4, 5 e 6 apresentaram a menor frequência sendo que cada um contém 1,5% das sequências (tabela 3).

**Tabela 3-** Posições dos sítios polimórficos e total de indivíduos com estes polimorfismos para as quatro populações estudadas distribuídos em seis haplótipos.

Haplótipos	Posição dos sítios variáveis					Total de indivíduos	Fr*
	129	130	131	132	134		
1	T	A	C	A	A	51	80,9%
2	A	T	A	T	C	8	12,6%
3	*	*	*	T	C	1	1,5%
4	*	T	*	*	C	1	1,5%
5	*	T	*	*	*	1	1,5%
6	*	*	*	T	*	1	1,5%

\*Fr = Frequência relativa dos haplótipos observados nas populações.

A população de Pedra Bela (PB) apresentou o maior número de haplótipos, sendo que 70,37% de suas sequências são do haplótipo 1, e as demais sequências estão distribuídas entre os haplótipos 2, 3, 4 e 5. Nas amostras da Criação de laboratório (Cria2ª) foram identificados três haplótipos; entre eles, o haplótipo 6 que foi identificado somente nesta população, com uma frequência de 5,55%, da mesma forma que na população de PB o haplótipo 1 apresentou a maior frequência, correspondendo a 77,77% das sequências. Nas populações de Botucatu e Quadra foi identificado somente o haplótipo 1 (figura 12).



**Figura 12-** Frequência dos haplótipos em cada população. Pop. BTU: população de Botucatu; Pop. Cria2ª: população de criação de laboratório - 2ª geração; Pop. PB: população de Pedra Bela; Pop. QUA: população Quadra.

A diversidade nucleotídica ( $P_i$ ) entre as sequências foi de 0,00445, indicando que estas populações do estado de São Paulo possuem uma base genética estreita. A população de Criação de Laboratório dentre as populações estudadas apresentou o maior valor de  $P_i$  de 0,00841, diferentemente da população de Botucatu e de Quadra em que os valores de  $P_i$  foram muito baixos de zero e 0,00107 respectivamente. O valor de  $P_i$  observado na população de Pedra Bela foi de 0,00683.

Os dados obtidos sobre a diversidade nucleotídica e haplotípica a partir do pequeno número de insetos estudados, nos permite especular sobre sua introdução no Brasil, já que ainda é incerta a origem dos insetos presentes nos estados brasileiros.

A pouca variabilidade encontrada nas populações pode ser devido a processos evolutivos. Um desses processos é a deriva genética, em que as frequências dos alelos oscilam por puro acaso, esta é de maior importância quando os alelos de um gene são neutros, ou seja, quando eles não diferem substancialmente quanto a seus efeitos na sobrevivência ou na reprodução como é o caso do ITS 1 (Futuyma, 2002).

Outro desses processos evolutivos que pode ter contribuído para a baixa variabilidade é o efeito do fundador que segundo a definição de Mayr (1963) é quando uns poucos fundadores originais se estabelecem formando uma nova população e carregam consigo apenas uma pequena fração da variação genética total da população parental.

Essa base genética estreita encontrada nas populações avaliadas pode representar um avanço para as estratégias de controle dessa praga nas plantações de eucalipto, principalmente se as mesmas forem diferenciadas por genotipagem.

A facilidade de genotipagem por meio de PCR torna os marcadores que envolvem a análise de haplótipos uma técnica mais ágil e com baixo custo, podendo ser aplicada em larga escala com intuito de auxiliar nos programas de controle de pragas (Rosa e Paiva, 2009).

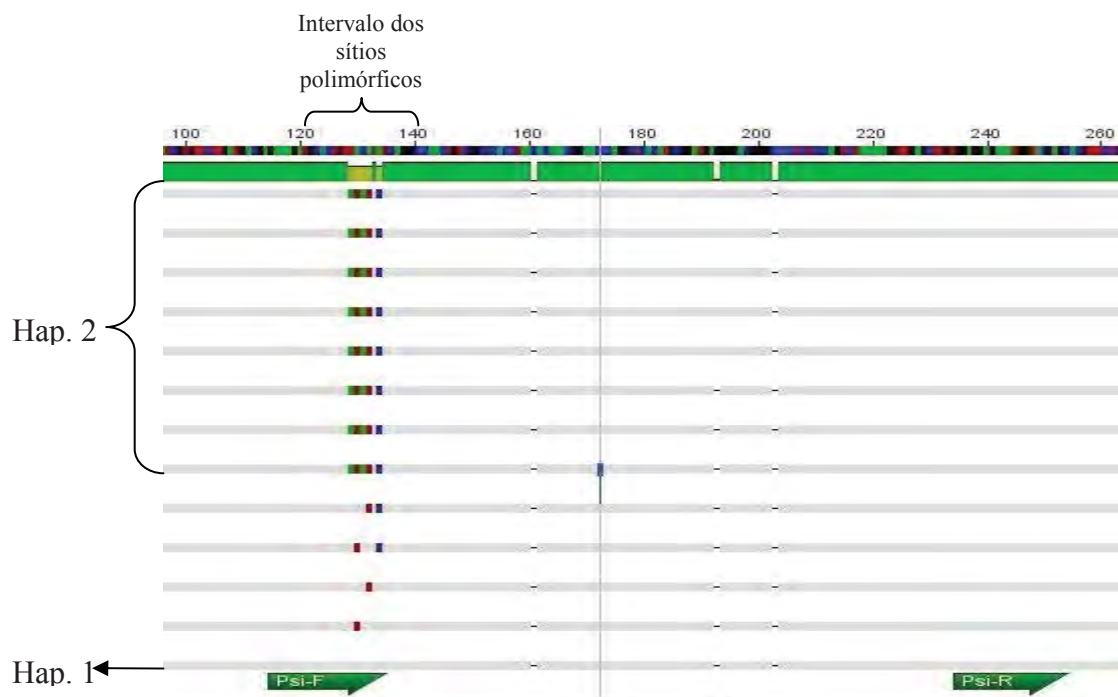
Assim com a identificação e localização dos cinco sítios polimórficos no intervalo de 120pb, foi possível desenvolver oligonucleotídeos específicos a partir das sequências do haplótipo mais freqüente nas populações estudadas (haplótipo 1) (figura 13). Os *primers* foram chamados de Psilídeo *forward* (Psi-F) e Psilídeo *reverse* (Psi-R), suas sequências estão apresentadas na tabela 4.

**Tabela 4:** Sequências dos iniciadores desenvolvidos a partir da sequência do haplótipo 1.

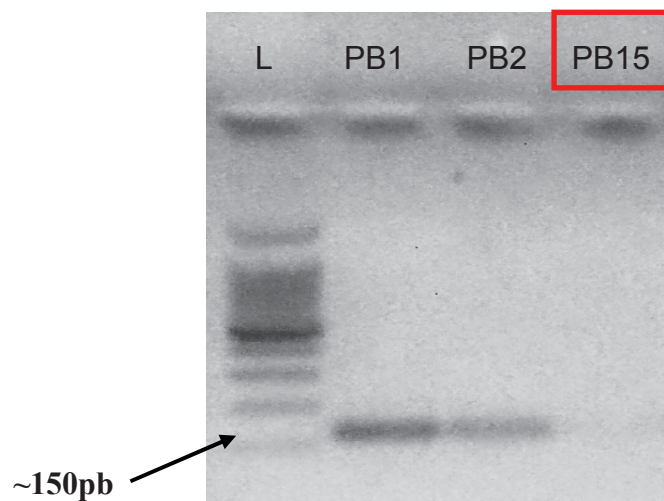
<i>Primers</i>	Sequência
Psi-F	5' - GAAAGATGCACTGTTACATA-3'
Psi-R	5' - CTCGTACCATTTCTCCTCC-3'

A validação dos *primers* foi realizada com três indivíduos sabidamente distintos, os indivíduos 1 e 2 da população de Pedra Bela que são do haplótipo 1 e o indivíduo 15 também da população de Pedra Bela, que é do haplótipo 2. A padronização da reação de PCR consistiu em mudanças nas concentrações do *primer* e também na modificação da temperatura de anelamento. Assim as reações apresentaram a concentração de 0.3  $\mu$ M de cada *primer* para um volume final de 10 $\mu$ l e condições de amplificação de: 1 ciclo de 5 min a 94 °C, 35 ciclos de 45 s a 94 °C, 1 min a 60 °C, 2 min a 72 °C, e 1 ciclo de extensão final de 5 min a 72 °C e término com 10 °C.

O fragmento observado em gel de agarose a 1% e corado com Brometo de Etídeo 1% apresentou aproximadamente 150 pb na amplificação com os *primers* Psi-F e Psi-R (figura 14) nos indivíduos que são do haplótipo 1 (PB1 e PB2) e a não amplificação no indivíduo que é do haplótipo 2 (PB15).



**Figura 13** – As oito primeiras sequências são do haplótipo 2, o segundo mais freqüente dentre as populações estudadas; os pontos coloridos representam os sítios polimórficos identificados no intervalo de 120pb; a última sequência é do haplótipo 1, o mais freqüente nas populações estudadas; as setas verdes são as marcações do pareamento dos oligonucleotídeos desenvolvidos (Psi-F e Psi-R).



**Figura 14** - Gel de agarose a 1% corado com Brometo de Etídeo 1% com os primers Psi-F e Psi-R com amostras de *G. brimblecombei* da população de Pedra Bela - SP. L: Ladder 100pb; PB1 e 2: haplótipo 1 e PB15 em destaque: haplótipo 2.

## 5. Conclusões

- O método de extração de DNA do inseto *Glycaspis brimblecombei* mais adequado foi o que faz uso da resina *Chelex*. Os resultados observados indicam que esse método é o mais eficiente para a obtenção de DNA de boa qualidade e em concentrações favoráveis a amplificação.
- O uso do marcador molecular *Internal Transcribed Spacer* (ITS 1) demonstrou ser uma boa ferramenta para estudar as populações de *Glycaspis brimblecombei*, pois os *primers* rDNA<sub>2</sub> e rDNA<sub>1,58S</sub> permitiram a amplificação da porção 3' do gene 18S, a porção 5' do gene 5.8S e a primeira região espaçadora interna (ITS 1) localizada entre estes genes, resultando em um fragmento de aproximadamente 600 pares de bases em todos os indivíduos estudados.
- Foram identificados cinco sítios polimórficos no intervalo de aproximadamente 80 a 200 pares de bases, porém estes não apresentam uniformidade em sua distribuição, sendo que a população do município de Pedra Bela foi a que apresentou uma maior distribuição dos seus sítios polimórficos enquanto que a população do município de Botucatu não apresentou polimorfismos.
- Foram identificados seis haplótipos, destes, dois foram os que apresentaram maior frequência relativa, o haplótipo 1 com 80,9% do total de sequências analisadas e o haplótipo 2 com 12,6%. As análises realizadas quanto a diversidade nucleotídica (Pi) entre todas as sequências das populações do estado de São Paulo estudadas, indicaram uma base genética estreita com valor de Pi de 0,00445.
- A população de Criação de Laboratório apresentou maior valor de Pi de 0,00841, enquanto que as populações de Botucatu e de Quadra apresentaram valores de Pi muito baixos de zero e 0,00107 respectivamente. O valor de Pi observado na população de Pedra Bela foi de 0,00683.

- Os primers Psi-F e Psi-R demonstraram ser eficientes na identificação do haplotipo 1, com a amplificação de um fragmento com aproximadamente 150 pares de bases. Este marcador poderá auxiliar nos métodos de genotipagem com baixo custo e em larga escala desse inseto praga.



## 6. Referências Bibliográficas

- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE CELULOSE E PAPEL (BRACELPA). **Relatório estatístico 2009/2010**. 2011 <Disponível: <http://www.bracelpa.org.br/bra2/index.php>> Acesso em: 20/08/2011.
- ASTSCHUL, S.F.; GISH, W.; MILLER, W.; MYERS, E.W.; LIPMAN, D.J. **Basic local alignment search tool**. J. Mol. Biol. V.215, p.403-410, 1990.
- BEEBE, N.W., ELLIS, J.T., COOPER, R.D., SAUL, A. **DNA sequence analysis of the ribosomal DNA ITS2 region for the *Anopheles punctulatus* group of mosquitoes**. Insect Molecular Biology, V.8, n.3, p.381-390, 1999.
- BOOTON, G.C.; KAUFMAN, L.; CHANDLER, M.; OGUTO-OHWAYO, R.; DUAN, W.; FUERST, P.A. **Evolution of the Ribosomal RNA Internal Transcribed Spacer One (ITS-1) in Cichlid Fishes of the Lake Victoria Region**. Molecular Phylogenetics and Evolution, V.11, p.273-282, 1999.
- BOUVET, J.P.R.; HARRAND, L.; BURCKHARDT, D. **Primera cita de *Blastopsylla occidentalis* y *Glycaspis brimblecombei* (Homoptera: Psyllidae) para la República Argentina (in Spanish with English abstract)**. Revista de la Sociedad Entomológica Argentina, V.64, p.99-102, 2005.
- BRAMMER, S.P. **Marcadores moleculares: princípios básicos e uso em programas de melhoramento genético vegetal**. Passo Fundo: Embrapa Trigo. 7p.html. (Embrapa Trigo. Documentos Online 3), 2000<Disponível: [http://www.cnpt.embrapa.br/biblio/p\\_do03.htm](http://www.cnpt.embrapa.br/biblio/p_do03.htm)> acesso em 20/03/2011
- BREDA, M.O.; OLIVEIRA, J.V.; MOREIRA, A.N.; QUEIROZ, D.L. **Registro de *Glycaspis brimblecombei* em *Eucalyptus ssp.*, em Petrolina, Pernambuco**. Nota Científica: Pesquisa Florestal Brasileira, Colombo, V.30, n.63, p. 253-255, ago./out. 2010.
- BRENNAN, E.B.; GILL, R.J.; HRUSA, G.F.; WEINBAUM, S.A. **First record of *Glycaspis brimblecombei* (Moore) (Homoptera: Psyllidae) in North America: initial observations and predator associations of a potentially serious new pest of *Eucalyptus* in California**. Pacific Coast Entomological Society, V.75, p.55-57, 1999.
- BRENNAN, E.B.; HRUSA, G.F.; WEINBAUM, S.A.; LEVISON, W.Jr. **Resistance of *Eucalyptus* species to *Glycaspis brimblecombei* (Homoptera: Psyllidae) in the San Francisco by area**. Pacific Coast Entomological Society, V.77, p.249-253, 2001.
- CARVALHO, A.O.R. **Análise da variabilidade genética e identificação de espécies do gênero *Atta* (Hymenoptera: Formicidae) por meio de marcadores moleculares**. Universidade federal do Paraná Tese (Doutorado em Ciências Biológicas), 134p, Curitiba, 2000.
- CHERRY, T, SZALANSKI, A. L., TODD, T.C., POWERS, T.O. **The internal transcribed spacer region of *Belonolaimus* (Nemata: Bolonolaimidae)**. J Nematol, n.29, p.23-29, 1997.
- CIBRIAN-TOVAR, D. et al. **Introducción y antecedentes sobre *Glycaspis brimblecombei* y de su parasitoide *Psyllaephagus bliteus***. Manual Técnico Operativo-Tema I. Chapingo: Universidad Autónoma Chapingo, División de Ciencias Forestales, s.d. 85p.
- CIBRIÁN-TOVAR, D.; IÑIGUEZ-HERRERA, G. **Manual para la identificación y manejo de las plagas y enfermedades forestales del estado de Jalisco**. Documento técnico PRODEFO, n.32, p.23-29, 2001.

- COSTA LIMA, A. **Insetos do Brasil: Homopteros**. Rio de Janeiro: ENA, 1942, v.3, 32p, (série didática, 4).
- CUNHA, C. **Uma nova praga nos eucaliptos: o piolho australiano**, Agricultura Brasileira Online - [www.AgroBrasil.com.br](http://www.AgroBrasil.com.br) 30/03/2004. Acesso em: 18/03/2011
- DAHLSTEN, D.L. **Biological control of the red gum lerp psyllid, aspects of eucalyptus species in California**. Center of biological control, University of California, 5p. (2003) <<http://www.cnr.berkeley.edu/biocon/dahlsten/rglp/>>. Acesso em: 20/04/2011.
- DAHLSTEN, D.L.; ROWNEY, D.L. **The red gum lerp psyllid, a new pest of *Eucalyptus* species in California**, 2000. Disponível em: <<http://www.cnr.berkeley.edu/biocon/dahlsten/rglp/index.htm>>. Acesso em: 25/03/2011
- DIODATO, L.; VENTURINI, M. **Presencia del “ Psilideo del escudo” (*Glycaspis brimblecombei*, hemiptera, psyllidae), plaga del *Eucalyptus*, em Santiago del Estero, Argentina**. Quebracho, n.14, p. 84-89, 2007.
- DREISTADT, S. H; DAHLSTEN, D. L. **Pest notes: Psyllids**. University of California Agricultural natural Resources Publications. n.7423, p.1-6, 2001.
- DRUMMOND AJ, ASHTON B, BUXTON S, CHEUNG M, COOPER A, HELED J, KEARSE M, MOIR R, STONES-HAVAS S, STURROCK S, THIERER T, WILSON A.. **Geneious Pro v. 4.8.5**. Biomatters Ltd, 2010. Disponível em: < <http://www.geneious.com>. >. Acesso em: 15/04/2011.
- EICKBUSH, T. H., EICKBUSH, D.G. **Finely Orchestrated Movements: Evolution of the Ribosomal RNA Genes**. Genetics. n. 175, p. 477-485, 2007.
- ELDER, J. F.; TURNER, B. J. **Concerted evolution of repetitive DNA sequences in Eukaryotes**. The Quarterly Review of Biology, V.70, p.297-320, 1995.
- FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares na análise genética**. Brasília: EMBRAPA, CENARGEM, 1996, 220p.
- FIRMINO, D.C. **Biologia do psilídeo-de-concha *Glycaspis brimblecombei* Moore (Hemiptera: Psyllidae) em diferentes espécies de eucalipto e em diferentes temperaturas**. 2004. 49f. Dissertação (Mestrado em Proteção de Plantas) – Faculdade de Ciências agrônômicas, Universidade Estadual Paulista, Botucatu.
- FIRMINO-WINCKLER, D.C.; WILCKEN, C.F.; OLIVEIRA, N.C.; MATOS, C.A.O. **Biologia do psilídeo-de-concha *Glycaspis brimblecombei* Moore (Hemiptera, Psyllidae) em *Eucalyptus* spp**. Revista Brasileira de Entomologia, V.53, n.1, p. 144-146, março 2009.
- FLAVELL, R. B.; O'DELL, M. **The genetic control of nucleolus formation in wheat**. **Chromosoma**, V.71, p.135-52, 1979.
- FUTUYMA, D.J. **Evolução, Ciência e Sociedade**. Sociedade Brasileira de Genética (SBG), Editora de livros SBG, 2002.
- GALLO, D.; NAKANO, O.; SILVEIRA NETO, S. CARVALHO, R.P.L.; BATISTA, G.C.; BERTI FILHO, E.; PARRA, J.R.P.; ZUCCHI, R.A.; ALVES, S.B.; VENDRAMIM, J.D.; MACHINI, L.C.; LOPES, J.R.S.; OMOTO, C. **Manual de entomologia agrícola**. Piracicaba: Fealq, 2002. 920p.
- GARRISON, R.W. **New agricultural pest for Southern California; redgum lerp psyllid, *Glycaspis brimblecombei***. Los Angeles County Agricultural Commissioner's Office, 1998. 2p. Disponível em: <<http://acwm.co.la.ca.us/scripts/Spotted.htm>>. Acesso em: 19/03/2011.

- GILL, R.J. **New state records: Redgum lerp psyllid, *Glycaspis brimblecombei***. California Pest and Disease, n.17, p.7-8, 1998.
- GONZALEZ, I. L., CHAMBERS, C., GORSKI, J.L., STAMBOLIAN, D., SCHMICKEL, R.D. and SYLVESTER, J.E. **Sequence and structure correlation of human ribosomal transcribed spacers**. Journal of Molecular Biology, V.1212, p.27-35, 1990.
- GRUTZMACHER, D.D., LOECK, A.E., OLIVEIRA, A.C., FISCHER, S., ELIAS, S.A.A. **Efeito do período de armazenamento em etanol sobre a qualidade e quantidade de DNA extraído de *Acromyrmex heyeri* (Forel, 1899) (Hymenoptera: Formicidae)**. Nota Técnica, R. Bras. Agrociência, Pelotas-RS, V.12, n.1, p.105-106, 2006.
- HALBERT, S. E.; R. J. GILL & J. N. NISSON. **Two *Eucalyptus* psyllids new to Florida (Homoptera: Psyllidae)**. Entomology Circular, V.407, p.1-2, 2001.
- HERWERDEN, L.; BLAIR, D.; AGATSUMA, T. **Intra- and interindividual variation in ITS1 of *Paragonimus westermani* (Trematoda: Digenea) and related species: implications for phylogenetics studies**. Molecular Phylogenetics and Evolution, V.12, n.1, p.67-73, 1999.
- HILLIS, D. H.; DIXON, M. T. **Ribosomal DNA: Molecular evolution and Phylogenetic Inference**. The Quarterly Review of Biology, V.66, n.4, p.411-453, 1991
- HODKINSON, I. D. **The biology of Psylloidea (Homoptera): a review**. Bulletin of entomological research. V.64, p.325-339, 1974.
- HOLLIS, D. **Australian Psylloidea: jumping plantlice and lerp insects**. CSIRO, Canberra, Australia, 2004.
- HOY, M.A. **Insect Molecular Systematics and Evolution**. In: **Insect Molecular Genetics: An Introduction to principles and Applications**. (Hoy, M. A eds.) Academic Press, p.360-363, 1994.
- JOWETT, T. **Preparation of Nucleic Acids**. In: Roberts D. B. (Ed.) *Drosophila: a practical approach*. Oxford: Press, Oxford. p. 275- 286, 1986.
- JUDD, W.S.; CAMPBELL, C.S.; KELLOGG, E.A.; STEVENS, P.F. **Plant systematics: a phylogenetic approach**. Sinauer Associates, Sunderland. 1999.
- KUMAR, P. L.; FENTON, B.; JONES, A. T. **Identification of *Cecidophyopsis* mites (Acari: Eriophyidae) based on variable simple sequence repeats of ribosomal DNA internal transcribed spacer-1 sequences via multiplex PCR**. Insect and Molecular Biology, V.8, n.3, p.347, 1999.
- LARKIN, M.A.; BLACKSHIELDS, G.; BROWN, N.P.; CHENNA, R.; MCGETTIGAN, P.A.; MCWILLIAM, H.; VALENTIN, F.; WALLACE, I.M.; WILM, A.; LOPEZ, R.; et al. **ClustalW and ClustalX version 2.1**. Bioinformatics. V.23, p.2947-2948, 2007.
- LIBRADO, P.; ROZAS, J. **DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data**. Bioinformatics, V.25, p.1451-1452, 2009.
- LONG, E. O.; DAWID, I. B. **Repeated genes in Eukariotes**. Annual Review of Biochemistry, V.49, p.727-64, 1980.
- LUCCAJR, M. **Análise de Sequências da Região Intergênica ITS-1 do rDNA em espécies de *Drosophila* do Cluster *Buzzatii* (complexo *Buzzatii*, Subgrupo *Mulleri*, Grupo *Repleta*)**. Tese de Doutorado. UNESP- São José do Rio Preto. 2006.
- LUTINSKI, J.A.; LUTINSKI, C.J.; GARCIA, F.R.M. **Primeiro registro de *Glycaspis brimblecombei* Moore 1964, (Homoptera: Psyllidae) em Eucalipto no Estado de Santa Catarina, Brasil**. Ciência Rural, Santa Maria, V.36, n.2, p.653-655, mar-abr 2006.

- MARQUES, E.K. **Diagnóstico genético molecular**. Canoas: ULBRA, 2003. 370p.
- MASSON, V.M.; COSTA, W.M.; SILVA, A.G.P.; ALVES, J.M.; RIBEIRO, G.T.; WILCKEN, C.F. **Ocorrência e Distribuição populacional do psilídeo-de-concha *Glycaspis brimblecombei* Moore 1964, (Homoptera: Psyllidae) em florestas de Eucalipto no litoral norte do estado da Bahia, Brasil**. Boletín de Sanidad Vegetal Plagas, V.35, p. 559-562, 2009.
- MONNERAT, R.; BERTIOLI, S. L.; BUTT, T.; BORDAT, D. **Variabilidade genética de *Diadegma sp.*, parasitoide da traça-das-crucíferas, através de RAPD-PCR**. Horticultura Brasileira, Brasília, V.22, n.1, p.90-92, 2004.
- MOORE, K.M. **The *Glycaspis* spp. (Homoptera: Psyllidae) associated with *Eucalyptus camaldulensis***. Proceedings of the Linnean Society of New South Wales V.99, p.121-128, 1964.
- OLIVEIRA, C.M.; FUNGARO, M.H.P.; CAMARGO, L.E.A.; LOPES, J.R.S. **Análise Comparativa da Estabilidade do DNA de *Dalbulus maidis* (DeLong & Wolcott) (Homoptera: Cicadellidae) sob Diferentes Métodos de Preservação Para Uso em RAPD-PCR**. Neotropical Entomology, V.31, n.02, p.225-231, 2002.
- OLIVEIRA, L. S.; COSTA, E. C.; GRELLMANN, M.; CANTARELLI, E. B.; PERRANDO, E. R. **Ocorrência de *Glycaspis brimblecombei* (Moore,1964) (Homoptera:Psyllidae) em *Eucalyptus ssp* no Rio Grande do Sul, Brasil**. Ciências florestal, Santa Maria, V.16, n.3, p.353-355, 2006.
- PAINE, T.D.; STEINBAUER, M.J.; LAWSON, S.A. **Native and Exotic Pests of *Eucalyptus*: A Worldwide Perspective**. The Annual Review of Entomology is on line at ento < www.annualreviews.org >. V.56, p.181-201. Acesso em: 22/03/2011.
- PHILLIPS C., - ***Lerps insects***.- Forest Health Information Fact Sheets, PIRSA Forestry, Government of South Australia. 1992.
- RAMIREZ, A.L.G. et al. **Análisis del efecto de las condiciones ambientales en la fluctuación poblacional del psílido del eucalipto en el estado de México**. Cuautitlán Izcalli: Editorial Habana, 2002. 5p.
- RAMIREZ, A.L.G. **Fluctuacion poblacional del psilido del eucalipto *Glycaspis brimblecombei* y el efecto del control biológico con la avispa parasitoide *Psyllaephagus bliteus***. 45f. Tesis de Maestria (Entomología Agrícola) - Ingeniera Agrícola-Facultad de Estudios Superiores Cuautitlan, Edo. de México, 2003.
- RESENDE, M.Q.; SANTANA,D.L.Q. **Ocorrência de três espécies de Psilídeo (Homoptera: Psyllidae) em Eucalipto no Espírito Santo, Brasil**. In: Congresso Brasileiro de Entomologia, 22, 2008, Uberlândia. Anais...Uberlândia-MG: SEB, 2008. CD ROM.
- ROSA, A.J.M.; PAIVA, S.R. **Marcadores Moleculares e suas Aplicações em Estudos Populacionais de Espécies de Interesse Zootécnico**. Embrapa Cerrados, 2009.
- SÁNCHEZ, B. S. **Aspectos bionómicos del psilídeo del eucalipto *Glycaspis brimblecombei* Moore (Homoptera: Psylloidea: Spondyliaspidae)**. Tesis de maestria. Universidad Autónoma Chapingo. División de ciencias Forestales. Chapingo, Texcoco, Edo. de México, 76 p. 2003
- SANTANA, D.L.Q., **Psilideos em Eucaliptos no Brasil**., Circular técnica Embrapa, n.109, p. 1-14, Colombo-Paraná, 2005.

- SCHLÖTTERE, C.; HAUSER, M. T.; VON HAESLER, A.; TAUTZ, D. **Comparative Evolutionary Analysis of rDNA ITS Region in *Drosophila***. *Molecular Biology and Evolution*, V.11, n.3, p.513-22, 1994.
- SCHMICKL, R.; JORGENSEN, M.H.; BRYSTING, A.K.; KOCH, M.A. **The evolutionary history of the *Arabidopsis lyrata* complex: a hybrid in the amphi-Beringian area closes a large distribution gap and builds up a genetic barrier**. *BMC Evolutionary Biology*, V.10, p.2-18, 2010.
- SOFTWARE **ChromasPro version 1.5** of Copyright © 2003-2009 - Technelysium Pty Ltd ChromasPro. Disponível em: <<http://www.technelysium.com.au/chromas.hlp>>.
- SZALANSKI, A.L., ROEHRDANZ, R.L., TAYLOR, D.B., CHANDLER, L. **Genetic variation in geographical populations of western and Mexican corn rootworm (*Coleoptera: Chrysomelidae*)**. *Insect Molecular Biology*. n.8, p.519-526, 1999.
- TEMPLETON, A.R. **Haplotype Trees and Modern Human Origins**. *Yearbook of Physical Anthropology*, V.48, p.33-59, 2005.
- TOMA, T.; MIYAGI, I.; CRABTREE, M.B.; MILLER, B.R. **Identification of *Culex vishnui* subgroup (*Diptera: Culicidae*) mosquitoes from the Ryukyu Archipelago, Japan: development of a species-diagnostic polymerase chain reaction assay based on sequence variation in ribosomal DNA spacers**. *Journal of Medical Entomology*. V.37, p.554-558, 2000.
- VALVERDE, R.S. **As Plantações de Eucalipto no Brasil**. 2009. Disponível em: <<http://www.ciflorestas.com.br/documentos.php?t=E>> Acesso em: 23/03/2011.
- VRAIN, T.C., WAKARCHUK, D.A., LEVESQUE, A.C., HAMILTON, R. **Intraspecific rDNA restriction fragment length polymorphism in the *Xiphinema americanum* group**. *Fund Appl Nematol*. n.15, p. 563-573, 1992.
- WILCKEN, C. F., et al. **Ocorrência do Psilideo-de-concha (*Glycaspis brimblecombei*) (*Hemiptera: Psyllidae*) em florestas de Eucalipto no Brasil**. *Circular técnica Ipef*, n.201, p.1-11, 2003.