

# **Boletim de Pesquisa** 177

---

## **e Desenvolvimento** ISSN 1676 - 340

Outubro, 2007

**Desenvolvimento de novos  
marcadores moleculares para a  
identificação de insetos de interesse  
agrônômico**



**Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária  
Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia  
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento**

ISSN 0102 0110  
Outubro, 2007

# **Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento 177**

## **Desenvolvimento de novos marcadores moleculares para a identificação de insetos de interesse agronômico**

Paulo Roberto Queiroz  
Maria de Nazaré Klautau Guimarães  
Dulce Maria Sucena da Rocha  
Maria Regina Vilarinho de Oliveira  
Luzia Helena Corrêa Lima

*Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia*  
Brasília, DF  
2007

Exemplares desta edição podem ser adquiridos na

Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia  
Serviço de Atendimento ao Cidadão  
Parque Estação Biológica, Av. W/5 Norte (Final) –  
Brasília, DF CEP 70770-900 – Caixa Postal 02372 PABX: (61) 448-4600 Fax: (61) 340-3624  
<http://www.cenargen.embrapa.br>  
e.mail:sac@cenargen.embrapa.br

Comitê de Publicações

Presidente: *Sergio Mauro Folle*  
Secretário-Executivo: *Maria da Graça Simões Pires Negrão*  
Membros: *Arthur da Silva Marante*  
*Maria de Fátima Batista*  
*Maurício Machain Franco*  
*Regina Maria Dechechi Carneiro*  
*Sueli Correa Marques de Mello*  
*Vera Tavares de Campos Carneiro*  
Supervisor editorial: *Maria da Graça S. P. Negrão*  
Normalização Bibliográfica: *Maria Iara Pereira Machado*  
Editoração eletrônica:

1ª edição

1ª impressão (2007):

**Todos os direitos reservados**

A reprodução não autorizada desta publicação, no todo ou em parte, constitui violação dos direitos autorais (Lei nº 9.610).

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)**  
**Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia**

D 451 Desenvolvimento de novos marcadores moleculares para a identificação de insetos de interesse agrônômico. / Paulo Roberto Queiroz ... [et al.]. – Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2007.  
20 p. : il. (Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento / Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, ISSN 1676-1340 ; 177)

1. Inseto - identificação. 2. Marcador molecular - desenvolvimento. 3. RAPD. I. Queiroz, Paulo Roberto. II. Série.

595.7 – CDD 21.

# Desenvolvimento de novos marcadores moleculares para a identificação de insetos de interesse agrônômico

---

Paulo Roberto Queiroz<sup>1</sup>  
Maria de Nazaré Klautau Guimarães<sup>2</sup>  
Dulce Maria Sucena da Rocha<sup>3</sup>  
Maria Regina Vilarinho de Oliveira<sup>4</sup>  
Luzia Helena Corrêa Lima<sup>5</sup>

## Resumo

A caracterização de insetos possibilita a identificação de diversas espécies por meio do conhecimento de seus padrões fisiológicos, morfológicos e genéticos. Os marcadores moleculares são ferramentas baseadas em DNA, complementares ao estudo desta caracterização. As informações obtidas pelas metodologias de marcadores moleculares fornecem valiosos instrumentos para a caracterização de populações naturais. Os marcadores apresentam muitas vantagens, pois independem do estágio de desenvolvimento do organismo e não são influenciados pelas condições ambientais. Por isso, o desenvolvimento de marcadores moleculares específicos para a identificação de espécies de interesse agrônômico será de grande utilidade para o estabelecimento de estratégias baseadas em DNA, para o monitoramento de insetos em áreas agrícolas e para auxiliar na interceptação de amostras infestadas por meio de métodos mais eficientes, precisos e de maior sensibilidade de detecção. Utilizando-se os marcadores de RAPD, o objetivo foi realizar um estudo comparativo do perfil molecular de *B. tabaci* com outras espécies de insetos. Uma vez determinadas as condições de extração de DNA das várias espécies de insetos analisadas, os padrões de bandejamento foram comparados para fins de identificação com base molecular. A análise por AMOVA de todas as populações consideradas indicou que, a maior parte da variabilidade encontrada era devida a variações

---

<sup>1</sup> Professor, Pesquisador Dr., da Faculdade de Ciências da Saúde, do Centro Universitário de Brasília – UniCEUB. CEP 70.000-000, Brasília, DF. E.mail:

[queiroz@cenargen.embrapa.br](mailto:queiroz@cenargen.embrapa.br)

<sup>2</sup> Professora, Pesquisadora Dra., do Departamento de Genética e Morfologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília, CEP. 70.910-900, Brasília, DF. E.mail:

[nklautau@unb.br](mailto:nklautau@unb.br)

<sup>3</sup> Professora, Pesquisadora Dra., da Faculdade da Universidade de Brasília, Planaltina (FUP) CEP. 73.300-000, Brasília, DF. E.mail: [dmsrocha@unb.br](mailto:dmsrocha@unb.br)

<sup>4</sup> Pesquisadora Dra., Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Cx. Postal 02372, CEP 70.849-970, Brasília, DF. E.mail: [vilarin@cenargen.embrapa.br](mailto:vilarin@cenargen.embrapa.br)

<sup>5</sup> Pesquisadora Dra. Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Cx. Postal 02372, CEP 70.849-970, Brasília, DF. E.mail: [luzia@cenargen.embrapa.br](mailto:luzia@cenargen.embrapa.br)

entre as populações e que a menor parte era de variações dentro das populações. Esses resultados indicaram a possibilidade de seleção de determinados fragmentos de DNA, gerados por RAPD e específicos para cada espécie. O início para o desenvolvimento de *kits* de identificação, com métodos mais precisos e específicos para a identificação e monitoramento da dispersão de espécies de insetos.

Palavra-chave: RAPD; Marcadores Moleculares; Marcadores - DNA.

## **Abstract**

The characterization of insects makes possible the identification of several species through the knowledge of their patterns physiologic, morphologic and genetic. The molecular markers are tools based in DNA, complemented to the study of this characterization. The information obtained by the methodologies of molecular markers supply valuable instruments for the characterization of natural populations. The markers present a lot of advantages, because they do not depend on the stage of development of the organism and they are not influenced by the environmental conditions. Therefore, the development of specific molecular markers for the identification of species of agronomic interest will be of great usefulness for the establishment of strategies based in DNA, for following the insects in agricultural areas and to aid in the interception of samples infested through methods more efficient, necessary and of larger detection sensibility. Being used the markers of RAPD; the objective was to accomplish a comparative study of the molecular profile of *B. tabaci* with other species of insects. Once certain the conditions of extraction of DNA of the several species of insects analyzed, the profiles and patterns were compared for identification ends with molecular base. The analysis for AMOVA of all of the considered populations indicated that, most of the found variability was owed to variations among the populations and that to smallest part was of variations inside of the populations. Those results indicated the possibility of selection of certain fragments of DNA, generated by RAPD and specific for each species. The beginning for the development of identification kits, with methods more specific for the identification and for following the dispersion of species of insects.

Key word: RAPD; Molecular Markers; DNA Markers.

## Introdução

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

Dessa forma, os marcadores moleculares entram como ferramentas complementares para os estudos de caracterização de organismos. O marcador molecular representa todo e qualquer fenótipo de um gene expresso, como no caso das isoenzimas, ou de um segmento do DNA que corresponde a regiões, expressas ou não, do genoma (Ferreira & Grattapaglia, 1995). O desenvolvimento da Biologia Molecular permitiu o surgimento de diversos métodos de detecção de polimorfismo genético, tanto bioquímico (isoenzimas) quanto molecular (baseados em DNA). As principais vantagens do uso dos marcadores moleculares baseados em DNA são: **1.** a análise de um grande número de *locus*; **2.** a neutralidade em relação a efeitos fenotípicos (efeito epistático ou pleiotrópico mínimo ou nulo); **3.** a co-dominância, com maior quantidade de informação genética por *locus*; **4.** a caracterização do genótipo de um indivíduo a partir de amostras de células ou tecidos.

Tais propriedades dos marcadores podem ser aplicadas ao estudo das espécies de insetos de interesse agrônomo. Uma identificação rápida desses insetos-praga que seria uma alternativa na prevenção dos problemas causados por eles.

Uma técnica aplicada ao estudo da variabilidade de insetos é o RAPD (DNA polimórfico amplificado ao acaso). O princípio dessa técnica consiste em utilizar *primers* de 10 nucleotídeos de comprimento e de seqüência aleatória em reações de PCR ajustadas para baixas condições de anelamento desses *primers* randômicos (Williams *et al.*, 1990). O resultado consiste na amplificação de vários fragmentos de DNA em virtude do anelamento aleatório dos *primers* ao longo do genoma da amostra estudada. Esses fragmentos são convertidos em dados binários (presença ou ausência de bandas) e, posteriormente, usados para a determinação das relações filogenéticas entre populações ou espécies, como também, para a determinação de perfis eletroforéticos (*fingerprints* genômicos) das amostras analisadas. Utilizando-se essa técnica, por exemplo, Gawel & Bartlett (1993) e Perring *et al.* (1993) usando o DNA de indivíduos de *B. tabaci* distinguiram dois biótipos: A e B. Os resultados indicaram que os biótipos dessa espécie, similares morfológicamente, seriam completamente diferentes. Assim, devido à existência de numerosas formas variantes de *B. tabaci*, um estudo sobre a diversidade genética, fisiológica e morfológica foi conduzido com todas as formas variantes de *B. tabaci* antes de uma definição das relações taxonômicas entre as formas A e B. Guirao *et al.* (1994) utilizando a técnica de RAPD, determinaram os perfis eletroforéticos específicos para *T. vaporariorum* e *B. tabaci*. Além disso, para as populações de *B. tabaci*, foi possível observar diferenças intrapopulacionais,

como também, diferenciar as populações coletadas nas regiões de Múrcia e Tenerife na Espanha. Em 2000, Lima *et al.* distinguiram os biótipos B e BR por perfis de amplificação de RAPD, correlacionando à distribuição de populações dentro do biótipo B em função do tipo da planta hospedeira.

Os instrumentos moleculares tais como, o estudo das proteínas, como as isoenzimas e da variação do DNA (RAPD) poderão fornecer marcadores específicos para as principais espécies de insetos de interesse agrônômico. O uso de marcadores moleculares específicos tem como vantagem principal a sua facilidade de detecção além de, permitir o seu uso em associação a estudos de identificação de biótipos, o estabelecimento de relações filogenéticas entre diferentes espécies ou populações e a construção de mapas genéticos de interesse econômico. Os marcadores apresentam muitas vantagens, pois independem do estágio de desenvolvimento do organismo e não são influenciados pelas condições ambientais (Haymer, 1994). Esses dados serão de grande importância no monitoramento de populações com genes resistentes a inseticidas, no estudo da dispersão das populações e no controle da entrada de novas espécies de insetos em regiões agrícolas do Brasil.

## **Metodologia**

### **OBJETIVO**

Utilizando-se os marcadores baseados em DNA (RAPD), realizar um estudo comparativo do perfil molecular de *B. tabaci* com outras espécies de insetos para o desenvolvimento de novos marcadores mais específicos.

## **Materiais e Métodos**

### **MANUTENÇÃO DAS POPULAÇÕES DE INSETOS**

Adultos de várias populações de *B. tabaci* e de outros insetos de importância quarentenária foram identificados segundo critérios morfológicos adotados internacionalmente e mantidos em etanol 70% a - 20° C para posterior análise molecular.

### **EXTRAÇÃO DE DNA DE *B. tabaci* e OUTROS ALEIRODÍDEOS**

Para a análise por RAPD, o DNA foi obtido macerando-se fêmeas adultas e individualizadas de cada amostra em 60 µL de tampão de extração (Tris-HCl 10mM pH 8; EDTA 1mM; Triton X-100; proteinase K 60µg.mL<sup>-1</sup>). O macerado foi incubado por 15 min a 65°C,

seguinto-se fervura durante 10 min. O homogenato final foi armazenado a – 20°C até o momento do uso.

## **EXTRAÇÃO DE DNA DE LEPIDÓPTEROS E COLEÓPTEROS**

Para os estudos moleculares, o DNA de indivíduos de terceiro ínstar de lepidópteros e larvas de coleópteros foram extraídas a partir de um método previamente estabelecido (Queiroz *et al.*, 2004) seguindo-se adaptações dos protocolos de Agusti *et al.* (1999) e Monnerat *et al.* (2004).

## **EXTRAÇÃO DE DNA DE MOSCA NEGRA *Aleurocanthus woglumi***

Fêmeas individualizadas de *A. woglumi* foram maceradas e o seu DNA extraído em 100µL de tampão de extração (Tris-HCl 10mM pH8, EDTA 1mM, Triton X-100 0,3% e proteinase K 60µg.mL<sup>-1</sup>). A seguir, completou-se o volume com 200µL de tampão de extração. O macerado foi incubado por 15 min a 65°C, seguindo-se fervura durante 6 min e centrifugação a 10000xg por 10s. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo plástico e mantido a – 20°C até o momento do uso.

## **EXTRAÇÃO DE DNA DE COCCINELÍDEOS**

Para a caracterização molecular, amostras individualizadas de coccinelídeos foram maceradas e o DNA extraído em 100µL de tampão de extração (Tris-HCl 10mM pH 8; EDTA 1mM; Triton X-100; proteinase K 60µg.mL<sup>-1</sup>). A seguir, completou-se o volume com 500µL de tampão de extração e o macerado foi incubado por 15 min a 65°C, seguindo-se fervura durante 6 min e centrifugação a 10000xg por 10s. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo plástico e mantido a – 20°C até o momento do uso. Para a realização das reações de RAPD, adicionou-se 5µL do sobrenadante em 100µL de tampão TE 0,1X.

## **REAÇÃO DE RAPD**

As reações de amplificação foram realizadas em 30µL de uma mistura contendo 24,9µL de água milliQ autoclavada, 3,0µL de tampão 10X (Tris-HCl 60 mM pH8,8, KCl 500mM e MgCl<sub>2</sub> 20mM, Amersham, CA, USA), 1,2µL de um *primer* de seqüência aleatória (Operon

Technologies, Inc.) na concentração de 10 $\mu$ M (Tabela 1), 0,6 $\mu$ L de dNTP 10mM, 0,3 $\mu$ L de *Taq* DNA polimerase na concentração de 1 U. $\mu$ L<sup>-1</sup> (Amersham, CA, USA) e 4 $\mu$ L de DNA (20ng).

### **PRIMERS DE RAPD USADOS NAS ANÁLISES MOLECULARES**

Para a obtenção dos perfis de marcadores moleculares das populações de insetos analisadas nesse trabalho, foram utilizados vários *primers* (Operon Technologies, Inc.) decaméricos de composição aleatória de nucleotídeos (Tabela 1).

Tabela 1 – *Primers* de RAPD utilizados na determinação dos perfis eletroforéticos das diversas populações de insetos submetidas à análise molecular.

<i>Primer</i>	Seqüência 5' → 3'
OPA-02	TGCCGAGCTG
OPA-03	AGTCAGCCAC
OPA-04	AATCGGGCTG
OPA-05	AGGGGTCTTG
OPA-07	GAAACGGGTG
OPA-10	GTGATCGCAG
OPA-11	CAATCGCCGT
OPA-13	CAGCACCCAC
OPA-15	TTCCGAACCC
OPA-17	GACCGCTTGT
OPA-20	GTTGCGATCC
OPR-06	GTCTACGGCA

### **CONDIÇÕES DE AMPLIFICAÇÃO POR RAPD**

As ampliações foram efetuadas em termociclador (PTC-100 MJ Research) contendo uma etapa inicial de desnaturação de 3 min a 94°C, programado para 45 ciclos de

desnaturação de 1 min a 93°C, anelamento por 1 min a 35°C e extensão por 2 min a 72°C e uma etapa final de extensão de 5 min a 72°C.

## ANÁLISE E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE POPULAÇÕES DE ALEIRODÍDEOS

Para a caracterização molecular, cinco indivíduos coletados a partir de várias populações de aleirodídeos (Tabela 2) foram comparados por meio dos seus padrões de marcadores moleculares de RAPD com a mosca branca *B. tabaci*, biótipos B e BR usando-se os *primers* OPA-02, OPA-03, OPA-04, OPA-05, OPA-10, OPA-11, OPA-13, OPA-15, OPA-17, OPA-20 e OPR-06, para a determinação de possíveis bandas de DNA com potencial para a identificação dessas diferentes espécies de aleirodídeos.

Tabela 2 – Populações de aleirodídeos utilizados nas determinações dos perfis de marcadores de RAPD para a identificação molecular.

Código	Procedência	Cultura	Identificação
34	Rondonópolis – MT	Tomate e Almeirão	<i>B. tabaci</i> biótipo BR
236	Deadópolis – MS	Mandioca	<i>B. tuberculata</i>
255	Embrapa Cerrado - DF	Mandioca	<i>Aleurothrixus aepim</i>
261	Floriano – PI	<i>Caju</i>	<i>Aleurodicus cocois</i>
264	Planaltina – DF	<i>Tomate</i>	<i>B. tabaci</i> biótipo B
278	Flórida – USA	<i>Citros</i>	<i>Aleurocanthus woglumi</i>
279	Texas – USA	<i>Citros</i>	A. woglumi
282	Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia – DF	<i>Fumo</i>	<i>Trialeurodes vaporariorum</i>

## ANÁLISE COMPARATIVA ENTRE *B. tabaci* E OUTRAS ESPÉCIES DE INSETOS DE INTERESSE AGRONÔMICO

Indivíduos de várias espécies de insetos de interesse agrícola (Tabela 3) foram comparados por meio dos seus padrões de marcadores moleculares de RAPD com a mosca branca *B. tabaci*, biótipo B usando-se os *primers* OPA-04, OPA-07, OPA-10, OPA-11 e OPA-13. Em função dos resultados foi possível a determinação de possíveis bandas de DNA com potencial para a clonagem e desenvolvimento de marcadores a serem utilizados na identificação do biótipo B de *B. tabaci*.

Tabela 3 – Populações de insetos utilizadas nas determinações dos perfis de marcadores de RAPD.

Procedência	Cultura	Identificação
Mossoró – RN	Melão	<i>B. tabaci</i> biótipo B
Texas – USA	<i>Citros</i>	<i>A. woglumi</i>
Embrapa – Recursos Genéticos e Biotecnologia	X	<i>Trichogramma</i>
Embrapa – Recursos Genéticos e Biotecnologia	X	<i>A. grandis</i>
Embrapa – Recursos Genéticos e Biotecnologia	X	<i>S. frugiperda</i>
Embrapa – Recursos Genéticos e Biotecnologia	X	<i>A. gemmatalis</i>
Embrapa – Recursos Genéticos e Biotecnologia	X	<i>Nephaspis gemini</i>

X Indica a manutenção da criação sob condições controladas (dieta, fotoperíodo e umidade).

## ANÁLISE POR ELETROFORESE DOS FRAGMENTOS DE DNA GERADOS POR RAPD

Os produtos de amplificação originários das reações de RAPD foram separados em gel de agarose 1,5% submerso em tampão TBE 1X (Tris-borato 90mM e EDTA 1mM) durante 3h a 160V. Ao término da corrida, os géis foram corados por 30 min em uma solução corante contendo brometo de etídio ( $5\mu\text{g.mL}^{-1}$ ), descorados por 30 min em água destilada e

fotografado sob luz ultravioleta no comprimento de onda de 300 nm. A documentação fotográfica foi feita usando-se o sistema EagleEye II still video system™ (Stratagene). Em todos os géis, marcadores de massa molecular (100 bp Ladder - INVITROGEN) foram usados para a determinação da massa molecular dos fragmentos amplificados pela técnica de RAPD.

## **ANÁLISE DOS DADOS**

As fotos das amplificações realizadas com os *primers* selecionados foram usadas para a análise do polimorfismo entre os indivíduos da população. As bandas presentes nos géis foram consideradas como marcadores RAPD. Foi gerada então uma matriz de similaridade levando-se em consideração as relações entre indivíduos, *primers* e massas moleculares das bandas obtidas com um dado *primer*. Utilizou-se o valor um (1) para a presença de um marcador e (0) para a ausência. No caso de dúvida o número (9) foi usado como padrão. A seguir, a planilha obtida foi submetida a um programa de análise estatística multivariada para a determinação das distâncias genéticas entre os indivíduos. A matriz de similaridade foi obtida por meio do coeficiente de Jaccard (Sneath e Sokal, 1973) e que, por meio da análise por UPGMA (unweighted pair-group method analysis), produziu-se um dendrograma que evidenciou o agrupamento dos indivíduos, utilizando-se o programa NTSYS (Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System) versão 2.02 pc (Rohlf, 1993). A seguir, os valores obtidos e tabelados em uma planilha foram submetidos à análise de variância molecular (AMOVA) para a determinação estatística das possíveis origens das variabilidades encontradas nas populações pela aplicação de algoritmos específicos pelo programa Arlequin ver. 2000 (Schneider *et al.*, 2000).

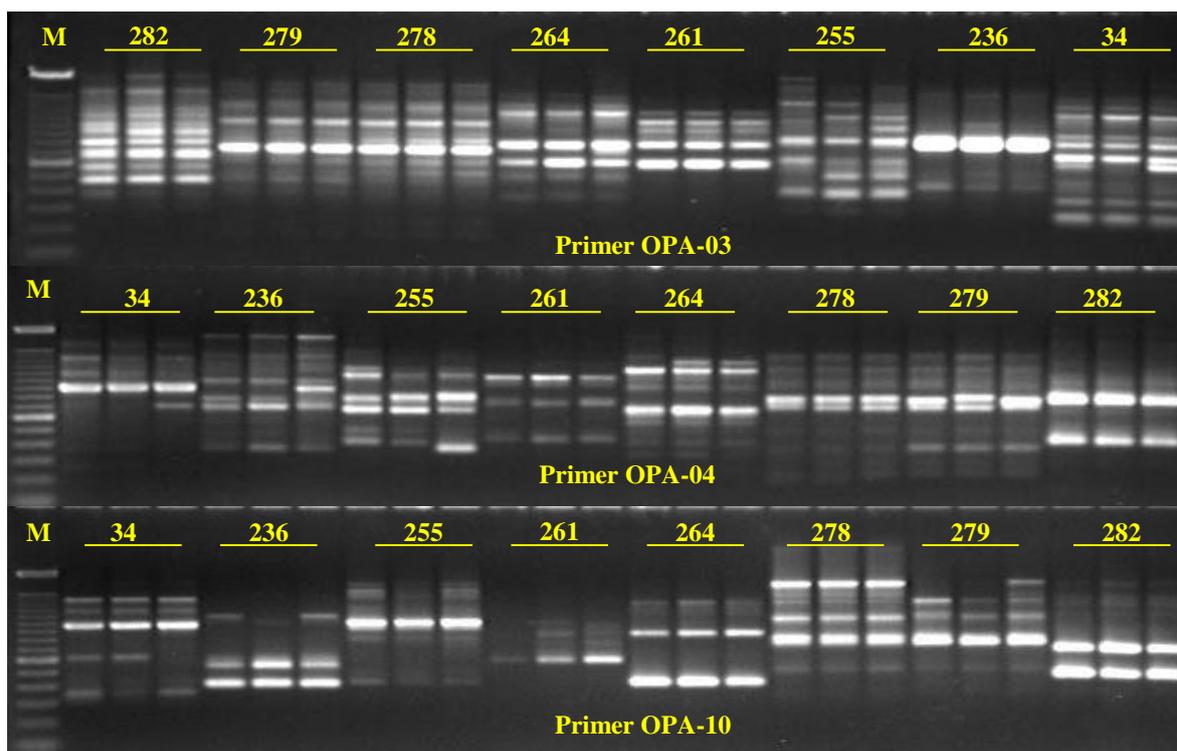
## **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE POPULAÇÕES DE ALEIRODÍDEOS**

Indivíduos de várias populações de artrópodos incluindo um inseto exótico, a mosca negra (*Aleurocanthus woglumi*), tiveram seus padrões de bandas determinados com os *primers* OPA-02, OPA-03, OPA-04, OPA-05, OPA-10, OPA-11, OPA-13, OPA-15, OPA-17 OPA-20 e OPR-06 e comparados com os perfis de marcadores moleculares já determinados para os biótipos de B e BR de *B. tabaci*.

Para a análise da mosca negra (*Aleurocanthus woglumi*), foi estabelecido um protocolo de extração de DNA, uma vez que, para as demais amostras usadas no experimento, inclusive

*B. tabaci* biótipos B e BR, o volume de tampão de extração de DNA foi de 60 µL. No caso da mosca negra, determinou-se um volume de 300 µL de tampão de extração de DNA. Uma vez determinadas as condições de extração de DNA da mosca negra, esta teve seu padrão de bandejamento comparado com outras populações presentes no banco de aleirodídeos, para fins de identificação por meio molecular. Observou-se que os perfis eletroforéticos obtidos para as diversas populações de artrópodos apresentaram diferenças em relação aos biótipos de *B. tabaci* (Figura 1).



**Figura 1** - Análise dos fragmentos de DNA de várias populações de aleirodídeos, obtidos de amplificação com os *primers* OPA-03, OPA-04 e OPA-10. A letra M indica o marcador de massa molecular 100 pb ladder. Os códigos indicam: 34, *Bemisia tabaci* biótipo BR; 236, *B. tuberculata*; 255, *Aleurothrixus aepim*; 261, *Aleurodicus cocois*; 264, *B. tabaci* biótipo B; 278, *Aleurocanthus woglumi*; 279, *A. woglumi*; 282, *Trialeurodes vaporariorum*. As barras indicam o número de indivíduos analisados.

Utilizando-se os perfis de fragmentos de DNA obtidos para as populações de mosca negra como padrão de comparação, observou-se que: um forte sinal de amplificação na região de 1000 pb foi obtido com o *primer* OPA-11; com o *primer* OPA-13, um fragmento de massa molecular de 600 pb; utilizando-se o *primer* OPA-10 obteve-se uma banda de massa molecular de 800 pb; já o *primer* OPA-03, amplificou um sinal de 750 pb; o *primer* OPA-05 produziu um fragmento de 450 pb não encontrado nas demais amostras; o *primer* OPA-20 produziu bandas de 650 pb e de 1000 pb que não apresentaram correspondência com os

biótipos B e BR de *B. tabaci*; o *primer* OPA-15 produziu um fragmento de 950 pb, que poderá ser usado na identificação molecular da mosca negra.

Usando-se o *primer* OPA-11, observou-se que o biótipo BR de *B. tabaci* produziu um fragmento de DNA de 500 pb que também foi encontrado na amostra de *B. tuberculata*. Entretanto, aquele não foi observado na amostra do biótipo B de *B. tabaci*. As reações de amplificação com o *primer* OPA-13 produziram uma banda de 850 pb na amostra do biótipo BR de *B. tabaci*. Esta mesma banda apresentou correspondência nas amostras de mosca negra, mas com fraco sinal de amplificação. O uso deste *primer* permitiu identificar molecularmente os biótipos de *B. tabaci*.

O *primer* OPA-03, por sua vez, produziu um fragmento de 850 pb característico para a identificação de amostras de *Bemisia tuberculata*. Provavelmente, este *primer* poderá ser empregado na identificação molecular daquele inseto.

O uso do *primer* OPA-05 nas reações de RAPD, produziu uma banda característica de 900 pb na amostra de *B. tabaci* biótipo B. Contudo, para as amostras de *B. tabaci* biótipo BR foram visualizados dois sinais de amplificação de 900 pb e de 1200 pb.

Os biótipos B e BR de *B. tabaci*, assim como, a mosca negra apresentaram padrões distintos de bandejamento utilizando-se o *primer* OPA-04. Além disso, com o uso desse mesmo *primer*, determinou-se um padrão para *Aleurodicus cocois*. A identificação de *Aleurothrixus aepim* também foi possível nas reações de amplificação de RAPD quando se utilizou o *primer* OPA-10.

A partir das informações obtidas pelos perfis eletroforéticos, *primers* de RAPD foram propostos como candidatos para a identificação molecular de alguns insetos de interesse agrônômico (Tabela 4).

Tabela 4 – Seleção de *primers* de RAPD prováveis candidatos para a identificação molecular de insetos de interesse agrícola.

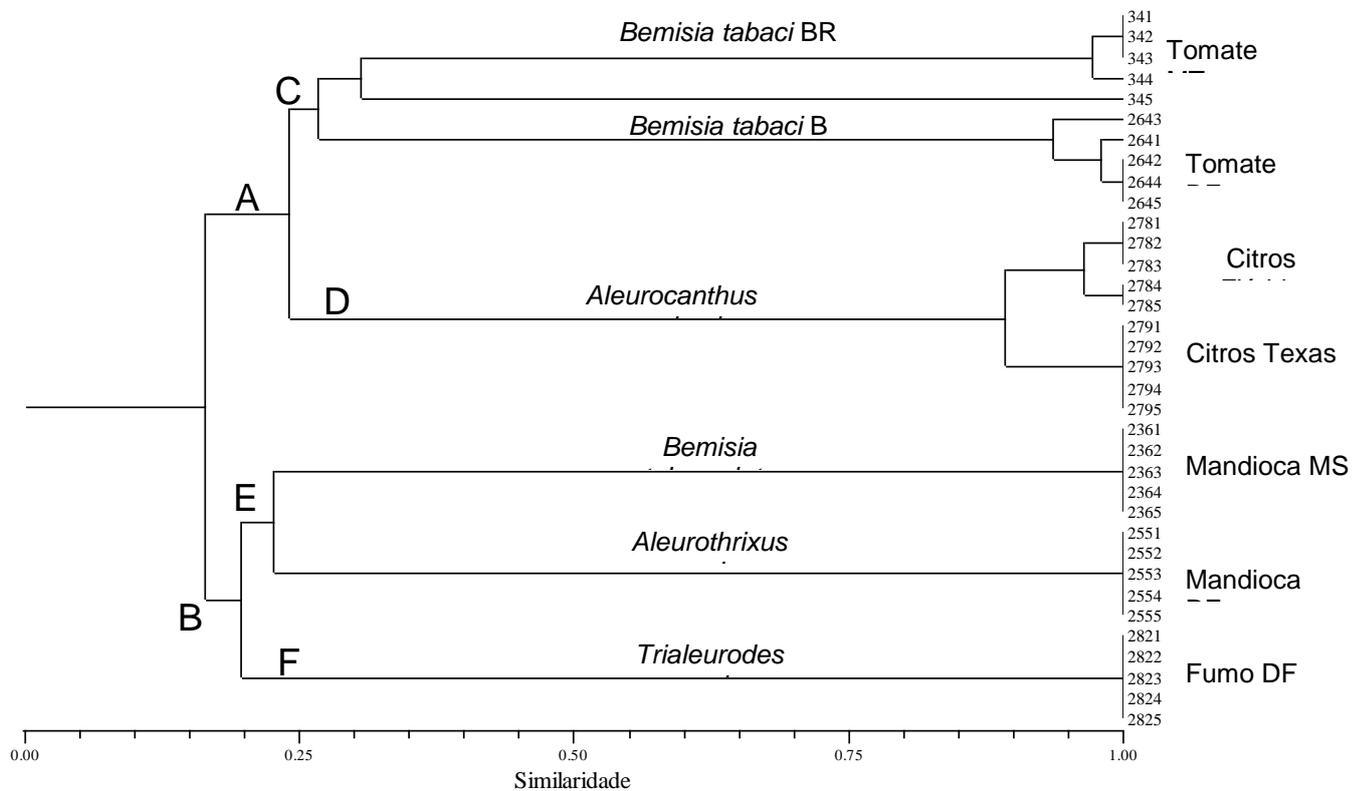
<i>Primer</i> de RAPD	Espécie	Fragmento (pb)
OPA-03	<i>A. woglumi</i>	750 e 1050
OPA-03	<i>B. tuberculata</i>	800
OPA-04	<i>B. tabaci</i> biótipo BR	900
OPA-04	<i>B. tabaci</i> biótipo B	650 e 1200
OPA-04	<i>Aleurodicus cocois</i>	420, 750 e 1050
OPA-10	<i>Trialeurodes vaporariorum</i>	500 e 720
OPA-10	<i>Aleurothrixus aepim</i>	1000

Gawel & Bartlett (1993) identificaram os biótipos A e B de *B. tabaci* empregando a técnica de RAPD. Além disso, Haymer (1994) sugere o uso de *primers* de seqüências aleatórias

para o estudo de variações genéticas em populações de insetos. Guirao *et al.* (1994) empregaram a técnica de RAPD para a identificação, por meio de diferenças entre os perfis de marcadores moleculares, das espécies de *T. vaporariorum* e *B. tabaci*.

Além da obtenção de perfis moleculares para a identificação de *T. vaporariorum* e *B. tabaci*, outros insetos poderão ser identificados por meio dessa estratégia baseada em DNA como, por exemplo, a mosca negra dos citros *A. woglumi*. Esse inseto é considerado uma praga de nível A1 para o Brasil e outros países do Comitê de Sanidade Vegetal do Cone Sul (COSAVE), principalmente em relação aos citros e outras frutíferas. Este inseto faz parte do alerta máximo e é considerado uma das pragas que estão na iminência de entrada no país. Sendo assim, de modo a estabelecer critérios para uma identificação rápida e eficiente deste inseto caso ele venha a ser detectado em pontos de entrada do país e ainda visando auxiliar em medidas fitossanitárias necessárias para a erradicação do inseto conforme determinação do DDIV/DAS/MA, padrões moleculares foram estabelecidos para este inseto, assim como, determinou-se o seu grau de similaridade genética em relação a outras populações de aleirodídeos.

Uma vez estabelecida a identificação molecular das amostras de moscas branca e negra por meio de RAPD, poderão ser realizados estudos destas populações. Os resultados obtidos foram utilizados para a determinação das relações filogenéticas entre estes insetos de importância econômica. A análise dos perfis eletroforéticos permitiu organizar as populações em 2 agrupamentos principais (Figura 2).



**Figura 2** - Análise das populações de aleirodídeos coletadas em diferentes culturas. Os números indicam: 34, *B. tabaci* biótipo BR; 236, *B. tuberculata*; 255, *Aleurothrixus aepim*; 261, *Aleurodicus cocois*; 264, *B. tabaci* biótipo B; 278, *Aleurocanthus woglumi*; 279, *A. woglumi*; 282, *Trialeurodes vaporariorum*.

Com relação ao primeiro agrupamento (definido com **A**), observou-se que as populações de *B. tabaci* biótipos B e BR, assim como, *A. woglumi*, formaram um agrupamento com 17 % de similaridade em relação às demais populações de aleirodídeos. Dentro desse agrupamento foram encontradas duas divisões (**C** e **D**), sendo que, os biótipos B e BR de *B. tabaci* formaram um grupo único (divisão **C**) apresentando 28 % de similaridade entre si e 25 % em relação às populações de *A. woglumi* (divisão **D**). As duas populações de mosca negra apresentaram uma relação filogenética de 89 %.

No agrupamento B, observou-se que *B. tuberculata* e *A. aepim*, apresentaram similaridade de 24 % entre as suas populações, formando um grupo único (divisão **E**). E, em relação à população de *T. vaporariorum*, apresentam um grau de similaridade filogenética de 20 %.

Da análise da distribuição das populações de insetos no dendrograma, observa-se um resultado interessante que está relacionado com o agrupamento das populações em função

da cultura hospedeira. Esse padrão foi observado tanto para as populações dos biótipos de *B. tabaci* em cultura de tomate, quanto para *A. woglumi* atacando citros, formando o agrupamento **A** no dendrograma. As mesmas observações puderam ser feitas para as populações de insetos encontradas no agrupamento **B** do dendrograma, uma vez que, *B. tuberculata* e *A. aepim* foram encontradas em culturas de mandioca. Fazendo-se a comparação com o trabalho das populações de aleirodídeos atacando cultura de mandioca, confirmou-se também, nesse trabalho, a baixa similaridade entre estas duas populações. Por fim, a população de *T. vaporariorum* apresentou similaridade em torno de 20 % em relação às populações coletadas em mandioca.

As análises sugerem, mais uma vez, uma possível separação das populações de aleirodídeos em função da cultura hospedeira. Dessa forma, foram conduzidas análises de AMOVA para a determinação das fontes de variação entre as populações desse estudo. Comparando-se os padrões binários produzidos por cada população, observou-se que: 97,75% da fonte de variação eram provenientes de variações entre as populações e 2,25% de variações dentro das populações de insetos. Comparando-se a influência das culturas na separação das populações no dendrograma observou-se que: 59,47% da variação eram devidas a variações entre populações dentro dos grupos, 38,41% de variações entre os grupos e 2,13% de variações dentro das populações. Mais uma vez, exclui-se a interferência das culturas sobre o padrão de separação das espécies de artrópodos no dendrograma. Provavelmente, o resultado observado possa ser devido às estratégias reprodutivas de cada espécie, por exemplo, reprodução assexuada gerando populações clonais e, dessa forma, isogênicas. Uma vez determinados os perfis eletroforéticos e as relações filogenéticas das populações de aleirodídeos, estudos poderão ser realizados usando marcadores desenhados especificamente para cada população de inseto buscando-se averiguar quais fatores são determinantes para a escolha de uma dada cultura hospedeira e para o estabelecimento das populações em uma determinada área. Por sua vez, foi também possível determinar bandas de DNA candidatas para o desenvolvimento de marcadores moleculares que sejam específicos para os biótipos de *B. tabaci*. Essa praga que foi introduzida no país apresenta-se dispersa na maioria dos estados da federação, provocando prejuízos à produção e causando impactos ao agro-ecossistema.

### **COMPARAÇÃO DE PERFIS DE MARCADORES MOLECULARES ENTRE *B. tabaci* E VÁRIAS ESPÉCIES DE INSETOS DE INTERESSE AGRONÔMICO**

Utilizando-se *primers* de RAPD para a obtenção de perfis de marcadores moleculares entre os vários insetos de interesse agronômico, foram observadas diferenças entre os padrões de bandas produzidos pelo biótipo B de *B. tabaci* em relação aos demais insetos analisados (Figura 3).

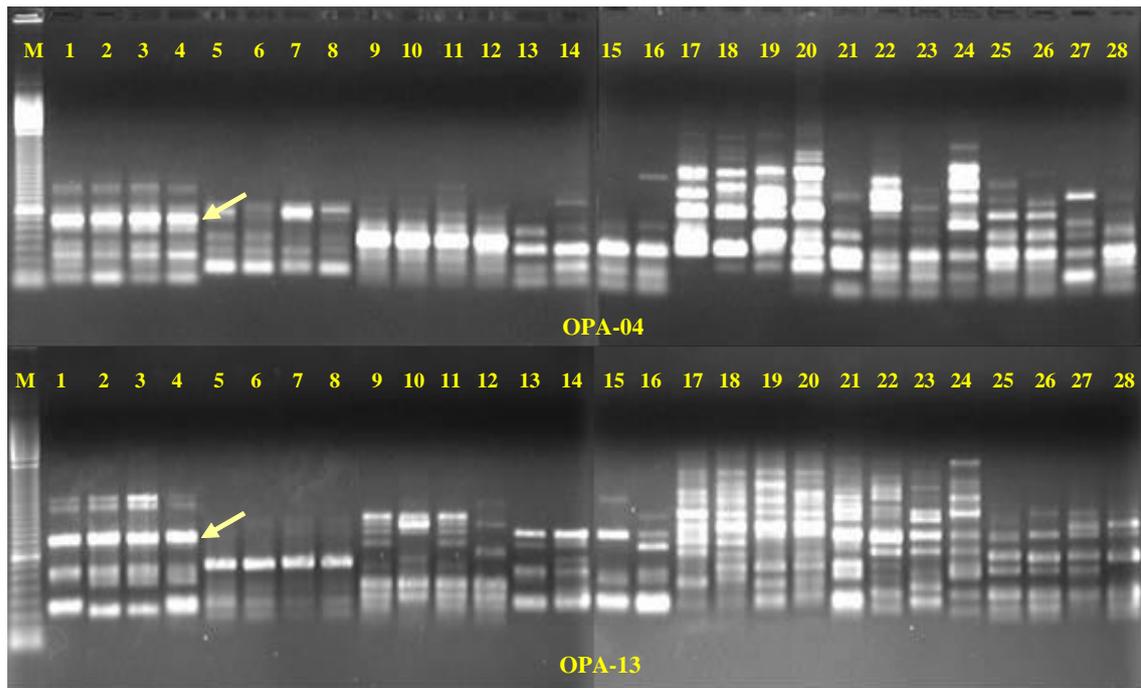


Figura 3 – Perfis de marcadores moleculares gerados pela técnica de RAPD utilizando-se os *primers* OPA-04 e OPA-13. Os números indicam: 1 a 4, *B. tabaci* biótipo B; 5 a 8, *A. woglumi*; 9 a 12, *Trichogramma*; 13 a 16, *A. grandis*; 17 a 20, *S. frugiperda*; 21 a 24, *A. gemmatalis*; 25 a 28, *N. gemini*. A letra M indica o marcador de massa molecular 100 pb Ladder. As setas indicam fragmentos de DNA característicos para a o biótipo B de *B. tabaci*.

Utilizando-se o *primer* OPA-04 nas reações de RAPD foram obtidos diferentes perfis de DNA para cada população de inseto. Observou-se que a população de *Tichogramma* produziu um único e forte sinal de amplificação de 450 pb. Para *A. grandis* obteve-se uma banda de 400 pb. Para *S. frugiperda* identificou-se uma banda característica para essa população de 800 pb. Já a população de *A. gemmatalis* produziu uma banda de 350 pb específica para essa população. Para *N. gemini* obteve-se, também, uma banda de 350 pb. Entretanto, o perfil de fragmentos de DNA para essa população foi diferente se comparado com a população de *A. gemmatalis*. Para *B. tabaci* biótipo B foram identificadas três bandas de DNA de 150 pb, 350 pb e 700 pb. Além disso, observou-se que o perfil eletroforético para esse hemíptero foi diferente se comparado aos perfis de coleópteros, lepidópteros e himenópteros usados nesse estudo.

Utilizando-se o *primer* OPA-13 obteve-se uma banda de DNA de 750 pb característica para *A. woglumi*. Para a população de *Trichogramma* foram obtidas duas bandas características de 450 pb e 550 pb. Já as espécies de lepidópteros apresentaram intenso polimorfismo variando de 300 pb a 1700 pb. Um resultado interessante foi a grande semelhança entre

os perfis eletroforéticos do biótipo B de *B. tabaci* e *A. grandis*. A diferença entre estas duas espécies ficou relacionada com a presença de duas bandas de DNA de 1700 pb e 1800 pb que são encontradas apenas na população de *B. tabaci* biótipo B. Por meio da técnica de RAPD foi possível identificar diferenças moleculares entre importantes espécies de insetos de interesse agrônômico. Além disso, a técnica de RAPD revelou possíveis bandas de DNA candidatas à clonagem e ao desenvolvimento de marcadores mais específicos para a detecção de uma determinada espécie de inseto.

Os dados gerados pelos perfis eletroforéticos de RAPD permitiram selecionar dois *primers* de RAPD como possíveis candidatos para a identificação de algumas espécies de insetos de interesse agrônômico (Tabela 5).

Tabela 5 – *Primers* de RAPD candidatos para a identificação de algumas espécies de insetos de interesse agrônômico.

<i>Primer</i> de RAPD	Espécie	Fragmento (pb)
OPA-04	<i>B. tabaci</i> biótipo B	700
OPA-04	<i>Trichogramma</i>	450
OPA-04	<i>A. grandis</i>	400
OPA-04	<i>S. frugiperda</i>	1500
OPA-04	<i>A. gemmatalis</i>	350
OPA-13	<i>A. woglumi</i>	750
OPA-13	<i>N. gemini</i>	800

Uma vez obtidos os perfis de marcadores de RAPD entre as populações de inseto, estes foram usados para a determinação de um dendrograma para a análise do grau de similaridade entre as espécies analisadas nesse estudo (Figura 4).

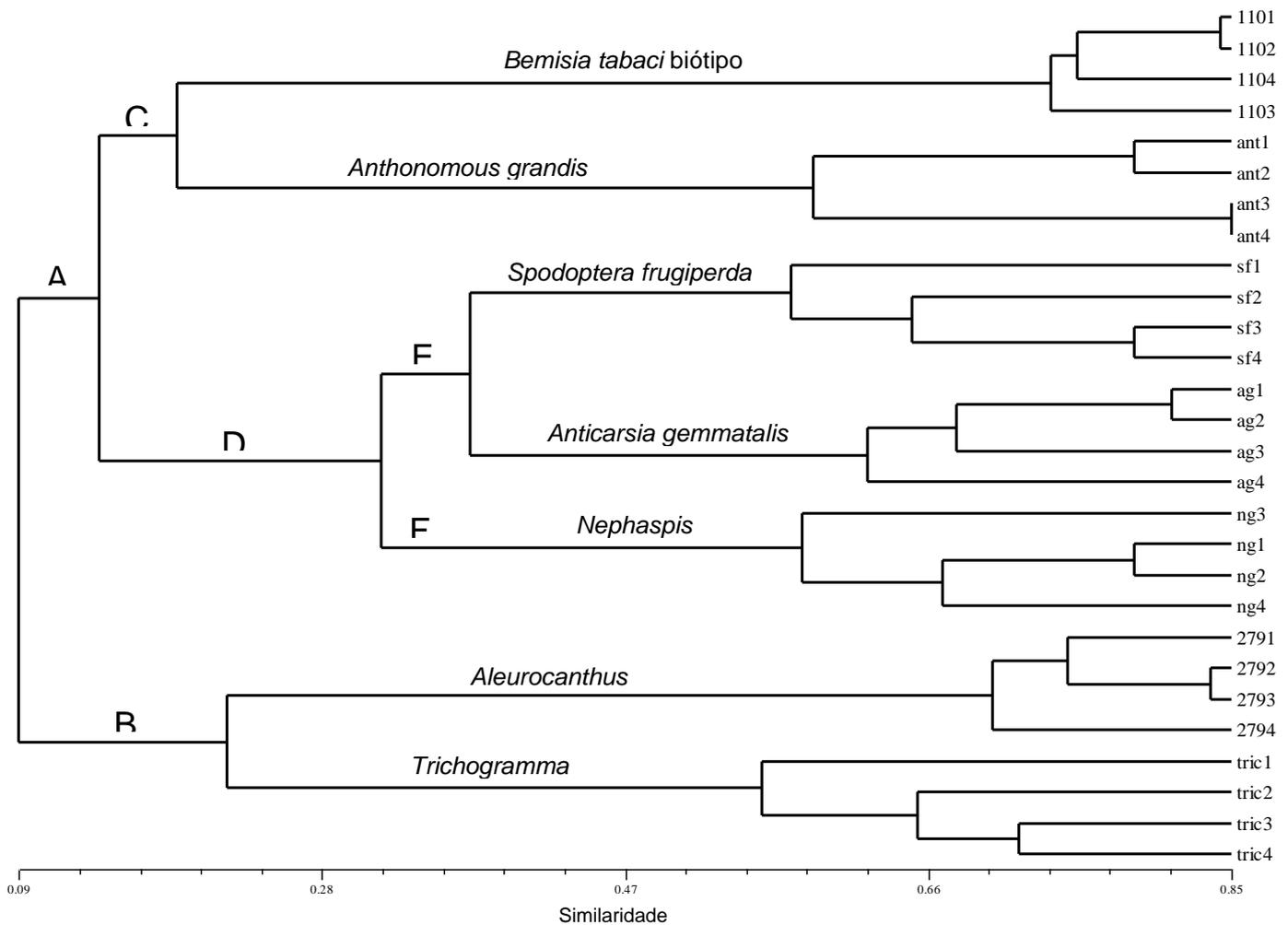


Figura 4 – Determinação do grau de similaridade entre várias populações de insetos pertencentes a diferentes famílias taxonômicas. Os números indicam: 110, *B. tabaci* biótipo B; 279, *A. woglumi*. Os códigos indicam: ag, *A. gemmatalis*; ant, *A. grandis*; ng, *N. gemini*; sf, *S. frugiperda*; tric, *Trichogramma*.

A análise com os cinco *primers* de RAPD permitiu organizar as populações de insetos em dois agrupamentos principais. No agrupamento **A** foram encontradas as espécies *B. tabaci* biótipo B, *A. grandis*, *S. frugiperda*, *A. gemmatalis* e *N. gemini*. Dentro desse agrupamento, encontrou-se a divisão **C** compreendendo as espécies *B. tabaci* biótipo B e *A. grandis* que apresentaram 20% de similaridade genética. Dentro da divisão **D** foram encontradas as espécies de lepidópteras *S. frugiperda* e *A. gemmatalis* e o coccinéldeo *N. gemini*. As lepidópteras formaram um grupo em separado (divisão **E**) apresentando 32% de similaridade filogenética em relação ao coccinéldeo. Entre as lepidópteras, o grau de similaridade compreendeu 38 %.

Já o agrupamento **B** ficou constituído pelas espécies *A. woglumi* e *Trichogramma* que apresentaram um grau de similaridade de 23%.

A distribuição das populações de insetos no dendrograma indicou uma baixa similaridade genética entre estas espécies, sendo encontrado um grau de similaridade abaixo de 38%.

Contudo, o grau de similaridade encontrado dentro de cada população de inseto ficou acima de 54% sendo que para *B. tabaci* biótipo B, encontrou-se o maior valor de similaridade, ficando em torno de 73%.

A análise por AMOVA de todas as populações consideradas em conjunto indicou que 77,04% da variabilidade encontrada era devida a variações entre as populações e que 22,96% era devida a variações dentro das populações. Fazendo-se a análise das espécies distribuídas nos três agrupamentos principais (**B**, **C** e **D**), observou-se que 53,16% da variabilidade encontrada era devida a variações entre as populações dentro de cada grupo, 25,26 % era proveniente de variações entre os grupos e que 21,58% estava relacionada com variações dentro das populações.

Esses resultados indicaram a possibilidade de seleção de determinados fragmentos de DNA, gerados por RAPD e específicos para cada espécie, com indicação para o desenvolvimento de *kits* na identificação de espécies. Essa estratégia é particularmente importante para os estudos envolvendo os biótipos de *B. tabaci*, uma vez que, cada biótipo apresenta características peculiares e a sua introdução constitui um risco quarentenário em determinadas regiões do mundo. Dessa forma, o desenvolvimento de *kits* diagnósticos, a partir de fragmentos de DNA gerados por *primers* de RAPD e que sejam estritamente relacionadas a uma dada espécie, é uma ferramenta crucial para a prevenção da entrada de determinados insetos em áreas agrícolas. Em consequência disso, os prejuízos provocados pela entrada de espécies exóticas tendem a ser minimizados assim como a demanda pelo uso de produtos químicos nocivos ao homem reduzido, garantindo as condições de produtividade. Uma alternativa metodológica é a conversão de marcadores de RAPD em marcadores SCAR. Os marcadores SCAR têm como característica a simplicidade e eficiência de uso, pois são específicos a uma dada região do genoma da espécie-alvo.

Alguns trabalhos sobre a aplicação dos marcadores SCAR no estudo de várias espécies de insetos são descritos na literatura. Por exemplo, Agusti *et al.* (1999) que descreveram o desenvolvimento de marcadores SCAR para a detecção de *Helicoverpa armigera* (Hubner) (Lepidoptera: Noctuidae) no intestino de possíveis predadores. Um fragmento de 1200 pb resultante da amplificação por RAPD usando o DNA de *H. armigera* permitiu o desenho de três conjuntos de *primers* sendo que dois desses foram capazes de detectar vestígios de *H.*

*armigera* no intestino médio do seu predador *Dicyphus tamaninii* (Wagner) (Heteroptera: Miridae) mesmo após 4 h da ingestão dos ovos de *H. armigera*.

A mesma estratégia aplicada para *H. armigera*, foi aplicada por Agusti *et al.* (2000) em estudos com *Trialeurodes vaporariorum* para detectar vestígios dessa mosca branca no intestino do predador *D. tamaninii*. A partir de um fragmento de 2400 pb gerado por RAPD e presente apenas em *T. vaporariorum*, foram gerados dois jogos de *primers* sendo que, apenas um foi capaz de detectar a mosca branca no intestino do seu hospedeiro. Como esperado, o marcador SCAR foi identificado em todos os estágios de vida da mosca branca. Nesse mesmo trabalho pôde ser feita uma comparação entre os marcadores de natureza bioquímica e os baseados em DNA. Utilizando-se anticorpos monoclonais para vitelina, uma proteína expressa apenas em ovos de *T. vaporariorum*, os autores relataram a ineficiência dos anticorpos anti-vitelina em detectar predadores *D. tamaninii* positivos quando estes se alimentaram de ninfas de mosca-branca. Isto se deve ao fato de que o emprego de anticorpos monoclonais pode resultar em análise subestimada do processo de seleção de possíveis predadores em virtude de esse marcador bioquímico ser estágio-específico. Por outro lado, o mesmo experimento utilizando-se marcadores SCAR detectou o DNA da presa em 60% dos predadores após 4 h da ingestão de ninfas de *T. vaporariorum*. O DNA, por sua vez, não sofre variações ao longo do ciclo de vida da presa e, dessa forma, *primers* de SCAR desenhados para *T. vaporariorum*, podem ser usados para detectar a presa em qualquer estágio do seu ciclo de vida (ovo, ninfa ou adulto) no intestino de predadores. Com o emprego de marcadores SCAR é possível a seleção de insetos potenciais, predadores para emprego em programas de manejo integrado de pragas.

Existem inúmeras vantagens para o uso dos marcadores SCAR na análise molecular de insetos: **a)** não necessitam de grandes quantidades de DNA com alto grau de pureza se comparado com outras técnicas como, por exemplo, os métodos de hibridação requeridos pelo RFLP; **b)** a análise dos resultados é mais simples do que outros métodos baseados em DNA, tais como, RAPD e AFLP. Os marcadores SCAR são revelados por PCR simples, não necessitando digestão com enzimas de restrição; **c)** a informação genômica pode ser obtida diretamente pela análise dos produtos de PCR. Estes marcadores oferecem um método mais prático para a varredura de um número elevado de amostras em um curto intervalo de tempo e dispensam etapas laboriosas; **d)** oferecem também um ponto de partida para a clonagem de genes que estejam compreendidos na seqüência do marcador (Kethidi *et al.*, 2003).

A partir das informações disponibilizadas, entende-se que a utilização da técnica de RAPD, como em qualquer técnica molecular, apresenta limitações e é justamente por isso, que são continuamente vasculhadas novas regiões do genoma dos organismos visando à

identificação de *loci* mais vantajosos do ponto de vista técnico e molecular. Nesse aspecto, a técnica de RAPD cumpre com o seu papel, uma vez que, é possível, com poucos *primers*, varrer um número muito superior de *loci* no genoma do organismo-alvo quando comparado com outras técnicas, fornecendo o ponto de partida para o desenvolvimento de novos marcadores mais específicos quando não se conhece, em sua totalidade, o genoma do organismo de estudo. Complementar às informações produzidas pelos marcadores RAPD, a conversão destes em marcadores mais específicos, tais como, o SCAR permite aumentar ainda as possibilidades de desenvolvimento de novas estratégias moleculares para o entendimento da dinâmica, ecologia e biologia das populações em estudo. Essa visão é particularmente importante para *B. tabaci*, praga de distribuição global que apresenta variações entre os seus biótipos. O desenvolvimento de marcadores específicos para cada biótipo é uma etapa decisiva para o estabelecimento de estratégias baseadas em DNA para a detecção e a prevenção da entrada de novos biótipos no Brasil, minimizando os riscos provocados pela entrada de insetos exóticos no agro-ecossistema brasileiro.

Sendo assim, o desenvolvimento de novos critérios de identificação usando outras marcas moleculares, torna-se imperioso para esclarecer dúvidas e para o entendimento da dinâmica das espécies de interesse. Em função dessa demanda, perfis de RAPD específicos a uma dada espécie poderão ser usados para o desenvolvimento de um método mais preciso de identificação de biótipos, para o monitoramento da dispersão e para o entendimento da dinâmica das espécies em campo.

## CONCLUSÃO

A partir das informações geradas pela aplicação dos marcadores RAPD na obtenção de perfis moleculares específicos para algumas espécies de interesse agrônômico, foram obtidos fragmentos de DNA com potencial para a identificação de espécies específicas de insetos de interesse agrônômico. Os fragmentos de RAPD obtidos das análises mostraram-se com potencial para o desenvolvimento de kits diagnóstico para a identificação molecular das espécies de insetos de interesse agrônômico. Contudo, maiores experimentos deverão ser realizados, utilizando-se um número maior de *primer*, na busca e seleção de outros fragmentos com o mesmo potencial. Essas informações poderão ser utilizadas, posteriormente, para a identificação, o monitoramento e o controle da entrada de insetos em áreas agrícolas livres de praga.

## REFERÊNCIAS

- Agusti, N., De Vicente, M. C. e Gabarra, R. (1999). Development of sequence amplified characterized region (SCAR) markers of *Helicoverpa armigera*: a new polymerase chain reaction-based technique for predator gut analysis. **Molecular Ecology**, 8, 1467-1474.
- Agusti, N., de Vicente, M. C. e Gabarra, R. (2000). Developing SCAR markers to study predation on *Trialeurodis vaporariorum*. **Insect Molecular Biology**, 9 (3), 263-268.
- Ferreira, M. E. e Grattapaglia, D. (1998). Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética. Brasília: EMBRAPA-CENARGEN, 220 pp.
- Frutos, R., Federici B. A., Revet, B. e Bergoin, M. (1994). Taxonomic studies of *Rickettsiella*, *Rickettsia*, and *Chlamydia* using genomic DNA. **J. Invertebr. Pathol.**, 63, 294-300.
- Gawel, N. J. e Bartlett, A.C. (1993). Characterization of differences between whiteflies using RAPD-PCR. **Insect Molecular Biology**, 2 (1), 33-38.
- Guirao P., Beitia, F e Cenis, J. L. (1994). Aplicación de la técnica RAPD-PCR a la toxonomía de moscas blancas (Homoptera, Aleyrodidae). **Bol. San. Veg. Plagas**, 20, 757-764.
- Haymer, D. S. (1994). Arbitrary (RAPD) primer sequences used in insect studies. **Insect Molecular Biology**, 3 (3), 191-194.
- Kethidi, D. R., Roden, D. B., Ladd, T. R., Krell, P. J., Retnakaran, A. e Feng, Q. (2003). Development of SCAR markers for the DNA-based detection of the asian long-horned beetle, *Anoplophora glabripennis* (Motschulsky). **Archives of insect Biochemistry and Physiology**, 52, 193-204.
- Lima, L. H. C., Návia, D., Inglis, P. W. e de Oliveira, M. R. V. (2000). Survey of *Bemisia tabaci* (Gennadius) (Hemiptera: Aleyrodidae) biotypes in Brazil using RAPD markers. **Genetics and Molecular Biology**, 23 (4), 781-785.
- Perring, T. M., Cooper, A. D., Rodriguez, R. J., Farrar, C. A. e Bellows, T. S. (1993). Identification of a whitefly species by genomic and behavioral studies. **Science**, 259, 74-77.

Rohlf, F. J. (1993). NTSYS-pc. Numerical taxonomy and multivariate system. Version 1.80. Applies Biostatistics Inc., New York.

Schneider, S., Roessli, D. e Excoffier, L. (2000). Arlequin ver. 2000: A software for populations genetics data analysis. Genetics and biometry laboratory. University of Geneva, Switzerland.

Sneath, P. H. A. e Sokal, R. R. (1973). Numerical Taxonomy. Freeman: San Francisco. 573 pp.

Sosa-Gómez, D. R., Tigano, M. S. e Arantes, O. M. N. (1998). Caracterização de entomopatógenos. In: Controle Microbiano de Insetos, (ed. Alves, S. B.), Piracicaba – SP, FEALQ = Fundação de Estudos Agrários Luiz de Queiroz, pp. 731-763.

Williams, J.G.K., Kubelik, A.R., Livak, K.J., Rafalski, J.A. e Tingey, S.V. (1990). DNA polymorphism amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. **Nucleic Acids Research**, 18 (22), 6531-6535.