

*Boletim de Pesquisa 54*  
*e Desenvolvimento* ISSN 1676-1340  
Novembro, 2003

---

**Variabilidade Genética determinada por  
RAPD-PCR de Populações de *Bemisia  
tabaci* provenientes do Brasil, Argentina e  
Paraguai.**



**República Federativa do Brasil**

*Luiz Inácio Lula da Silva*  
Presidente

**Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento**

*Roberto Rodrigues*  
Ministro

**Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária**

**Conselho de Administração**

*José Amauri Dimázio*  
Presidente

*Clayton Campanhola*  
Vice-Presidente

*Alexandre Kalil Pires*  
*Dietrich Gerhard Quast*  
*Sérgio Fausto*  
*Urbano Campos Ribeiral*  
Membros

**Diretoria-Executiva da Embrapa**

*Clayton Campanhola*  
Diretor-Presidente

*Gustavo Kauark Chianca*  
*Herbert Cavalcante de Lima*  
*Mariza Marilena T. Luz Barbosa*  
Diretores-Executivos

**Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia**

*Luiz Antonio Barreto de Castro*  
Chefe -Geral

*Clra de Oliveira Goedert*  
Chefe-Adjunto de Pesquisa e Desenvolvimento

*José Manuel Cabral de Sousa Dias*  
Chefe-adjunto de Comunicação e Negócios

*Arthur da Silva Mariante*  
Chefe-Adjunto de Administração

**Boletim de Pesquisa  
e Desenvolvimento 54**

**Variabilidade Genética determinada por  
RAPD-PCR de Populações de *Bemisia  
tabaci* provenientes do Brasil, Argentina e  
Paraguai.**

**Graciela Truol  
Wendel Neiva Martins Lago  
Paulo Roberto Queiroz  
Luzia Helena Corrêa Lima  
Maria Regina Vilarinho de Oliveira  
Graciela Laguna  
W.M. Paiva  
Álvaro Manoel Rodrigues Almeida**

Brasília, DF  
Novembro, 2003

Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na:

**Embrapa - Recursos Genéticos e Biotecnologia**

Serviço de Atendimento ao Cidadão  
Parque Estação Biológica, Av. W5 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 da Unidade**

Presidente: José Manuel Cabral de Sousa Dias  
Secretária-Executiva: Maria José de Oliveira Duarte  
Membros: Maurício Machaim Franco  
          Regina Maria Dechechi G. Carneiro  
          Maria Alice Bianchi  
          Sueli Correa Marques de Mello  
          Vera Tavares Campos Carneiro  
Suplentes: Arthur da Silva Mariante  
          Maria Fátima Batista  
Supervisor Editorial: Maria José de Oliveira Duarte  
Normalização Bibliográfica: Maria Alice Bianchi  
Tratamento de Ilustrações: Altevir de Carvalho Freitas  
Editoração Eletrônica: Altevir de Carvalho Freitas

**1ª edição**

1ª impressão (2003): tiragem

**Todos os direitos reservados.**

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

V 299 Variabilidade genética determinada por RAPD-PCR de populações de *Bemisia tabaci* provenientes do Brasil, Argentina e Paraguai / Graciela Truol ... [et al.]. – Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2003.  
19 p. – (Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento / Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 1676-1340; 54)

1. *Bemisia tabaci*. 2. Marcadores moleculares. 3. Mosca-branca.  
4. Espécie-complexo. 5. Brasil. 6. Argentina. 7. Paraguai. I. Truol, Graciela. II. Série.

632.752 – CDD 21

## Sumário

<b>Resumo .....</b>	<b>6</b>
<b>Abstract .....</b>	<b>7</b>
<b>Introdução .....</b>	<b>8</b>
<b>Materiais e Métodos .....</b>	<b>9</b>
<b>Resultados e Discussão .....</b>	<b>12</b>
<b>Conclusões .....</b>	<b>17</b>
<b>Referências Bibliográficas .....</b>	<b>18</b>

## **Variabilidade genética determinada por RAPD-PCR de populações de *Bemisia tabaci* provenientes do Brasil, Argentina e Paraguai.**

### **Resumo**

No mundo, a espécie *Bemisia tabaci* vem ocasionando danos econômicos em diversas culturas e trouxe à tona a espécie-complexo *Bemisia tabaci* como praga e como vetor de fitoviroses. Estudos recentes sugerem que a espécie *Bemisia tabaci* representa um complexo de numerosos biótipos, cada qual com suas peculiaridades adaptativas e disruptivas. A identificação e a caracterização corretas da espécie se fazem necessárias para que estratégias de controle mais específicas e eficazes sejam aplicadas. Populações de *B. tabaci* coletadas em três regiões sul-americanas – Brasil, Argentina e Paraguai – foram avaliadas e caracterizadas utilizando-se a técnica de RAPD-PCR. Os resultados demonstraram a variabilidade genética entre as populações estudadas, confirmando a predominância do biótipo B, mais agressivo, no Brasil e detectando a persistência do biótipo BR na Argentina e Paraguai, mesmo em presença do biótipo B.

Palavras-chaves: *Bemisia tabaci*, marcadores moleculares, mosca-branca, espécie-complexo, Brasil, Argentina, Paraguai.

## Genetic variability determined by RAPD-PCR of *Bemisia tabaci* populations from Brazil, Argentina and Paraguay

### Abstract

In the world, *Bemisia tabaci* species-complex triggered economic damages to several agroecosystems shows up as a pest and fitoviruses vector. Once, that recent studies reveal that *B. tabaci* specie represents a complex of various biotypes, each one with your own power of adaptation and survival capacity. The identification and characterization of the species must be corrected so it could be applied efficient control strategies. Populations collected in Brazil, Argentina and Paraguay were characterized by RAPD-PCR methodology. The results showed significant genetic variability among the populations analysed, confirming the B biotype is predominant in Brazil and BR biotype in Argentina and Paraguay, resisting the invasion of the B biotypes population.

Index-terms: *Bemisia tabaci*, molecular markers, whitefly, species-complex Brazil, Argentina, Paraguay.

## Introdução

A dispersão rápida de *Bemisia tabaci* Gennadius (Hemiptera: Aleyrodidae) em diversas regiões do mundo, causando perdas consideráveis em inúmeras culturas, trouxe à tona a complexidade de atuação desse inseto como praga e como vetor de viroses. Na América Latina, o prejuízo causado pela ação da praga mudou definitivamente o sistema tradicional do plantio de culturas (Morales & Anderson, 2001). Em um contexto geral, a América Latina tem sido a região mais afetada por *B. tabaci*, como praga ou vetor, no que se refere à questão de culturas essenciais, tanto para indústria quanto para o consumo *in natura*. Em 20 países latino-americanos existem cinco milhões de hectares de áreas cultivadas sendo devastadas pela praga e de geminiviroses por ela transmitidas (Morales & Anderson, 2001, Oliveira *et al.*, 2001).

Na Argentina, o aumento do cultivo da soja teve início em 1975 e após dez anos essa cultura chegou a um patamar de 3,3 milhões de hectares plantados, com a maior expansão do plantio nas regiões de Tucuman, Salta e Santiago Del Estero. Como resultado, houve um aumento na ocorrência da praga *B. tabaci*, provocando prejuízos superiores a 30% da produção de soja, em uma área plantada de 40,000 ha e perdas de 10% da produção de feijão, em uma área plantada de 12,000 ha (Morales & Anderson, 2001).

A identificação morfológica de *B. tabaci* é extremamente difícil por se tratar de uma coleção heterogênea de biótipos geneticamente distintos, sugerindo com isso, tratar-se de “espécie complexo” (Brown *et al.*, 1995). Atualmente, 41 populações distintas de *B. tabaci* foram estudadas em todo o mundo, sendo que 24 destas populações receberam designação de biótipo e 17 populações não foram identificadas, continuando sem designação taxonômica (Perring, 2001). Técnicas bioquímicas e moleculares dão suporte aos estudos filogenéticos das populações da espécie-complexo *B. tabaci* que foram agrupadas de acordo com a sua localidade (Costa & Brown, 1991, Gawel & Bartlett, 1993, Perring *et al.*, 1993, Haymer, 1994, De Barro & Driver 1997, De Barro *et al.*, 2000, Moya *et al.*, 2001, Brown *et al.*, 2002, Simon *et al.*, 2003).



Até o momento, sete grupos da mosca-branca foram estabelecidos ao redor do mundo, de acordo com sua região predominante de ocorrência (Perring, 2001). No Brasil, são encontrados os biótipos B e BR (Lima *et al.*, 1999) com peculiaridades metabólicas e comportamentais próprias (Brown *et al.*, 1995).

Nesse trabalho, populações de *B. tabaci*, coletadas em três regiões sul-americanas – Brasil, Argentina e Paraguai – foram avaliadas e caracterizadas utilizando-se a técnica de RAPD-PCR.

## **Materiais e Métodos**

**Origem das amostras** – A tabela 1 apresenta um quadro com as indicações do local de coleta e das plantas hospedeiras referentes às populações analisadas.

**Extração de DNA** – Uma única fêmea adulta foi colocada em tubos plásticos de 1,5 mL, macerada em 60 µL de tampão de lise (Tris-HCl 10 mM pH 8, EDTA 1 mM, Triton X-100 0,30%, proteinase K 60 µg/mL) e incubada a 65°C. Após 20 min, o homogenato foi incubado a 95°C por 7 min e congelado imediatamente a -20°C (Lima *et al.*, 2000).

**Análises RAPD** – Seguindo metodologia de Lima *et al.*(2002), as reações de amplificação foram feitas em volumes de 30 µL, contendo tampão 1X (Tris-HCl 6mM pH 8,8, KCl 50 mM, MgCl<sub>2</sub> 2 mM), dNTPs 0,2 mM, primer 0,4 µM (OPA-02, OPA-04, OPA-10 ou OPA-13, Operon Technologies), 2 U de *Taq* DNA polimerase (Pharmacia) e 4 µL de DNA. As amplificações foram efetuadas em termociclador MJ Research, modelo PTC 100, programado para uma etapa inicial de 3 min a 94°C, seguindo-se 45 ciclos (1 min a 93°C, 1 min a 35°C e 2 min a 72°C) e uma extensão final de 5 min a 72°C. Os produtos de amplificação foram separados em géis de agarose a 1,5 % de concentração, submersos em tampão TBE 1 X (Tris-

borato 90 mM, EDTA 1 mM), corados em solução de brometo de etídio ( $0,5 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) e fotografados em um sistema de foto-documentação. Marcadores de massa molecular (100 pares de bases) foram usados para a determinação do tamanho dos fragmentos amplificados.

**Análise dos dados** - Os dados, de natureza binária, foram analisados de acordo com a presença (1) ou ausência (0) da banda no gel, sendo o nível de similaridade genética entre os indivíduos, estimado através do índice de Jaccard. Um dendrograma foi construído pelo método UPGMA (unweighted pair-group method analysis). As análises feitas, utilizando-se padrões de RAPD de organismos conhecidos obtiveram suporte estatístico no programa NTSYS-pc 2.02 (Rohlf, 1993).

**Tabela 1:** Regiões de coleta e respectivas plantas hospedeiras de *Bemisia tabaci*.

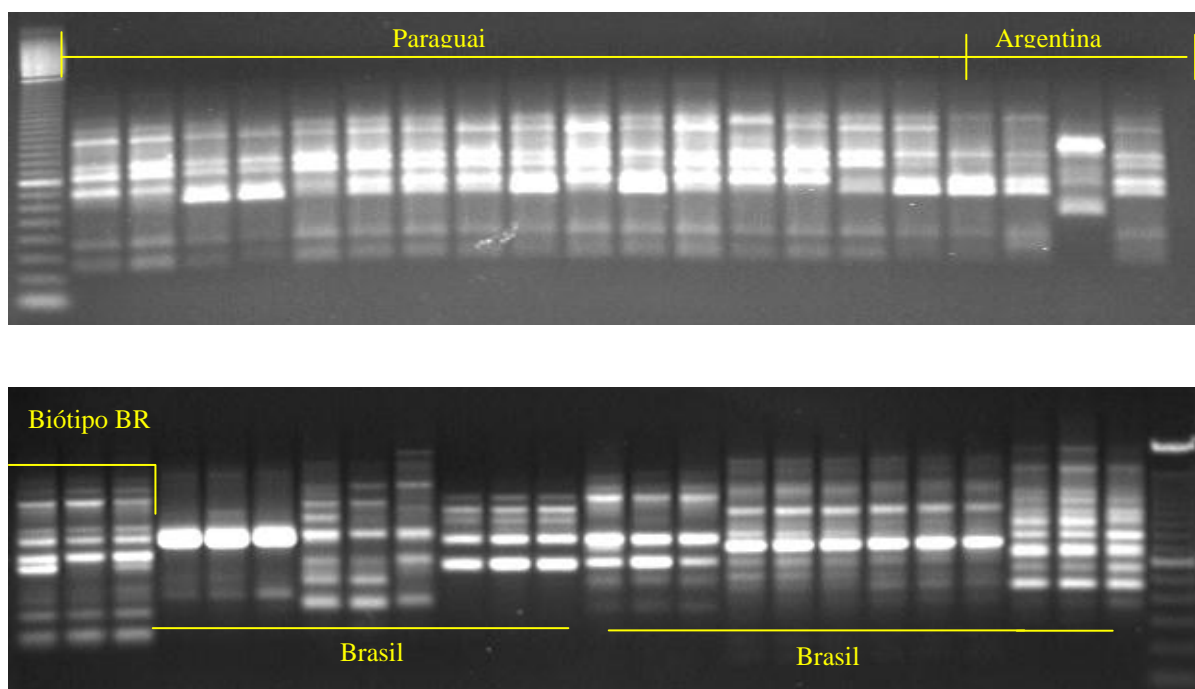
<b>País</b>	<b>Cidade</b>	<b>Planta Hospedeira</b>
Brasil	Distrito Federal	Algodão ( <i>Gossypium</i> spp.)
Brasil	Distrito Federal	Couve ( <i>Brassica oleraceae</i> )
Brasil	Distrito Federal	Soja ( <i>Glycine max</i> )
Paraguai	Naranjal	Soja ( <i>Glycine max</i> )
Paraguai	Santa Maria	Soja ( <i>Glycine max</i> )
Paraguai	Obligado	Soja ( <i>Glycine max</i> )
Argentina	La Invernada	Soja ( <i>Glycine max</i> )
Argentina	Huerta Grande	Plantas Invasoras (não identificadas)
Argentina	Cocha	Plantas Invasoras (não identificadas)
Argentina	Monte Redondo	Plantas Invasoras (não identificadas)
Argentina	Horcones	Plantas Invasoras (não identificadas)
Argentina	Horcones	Colônia de mosca-branca do INTA

## Resultados e Discussão

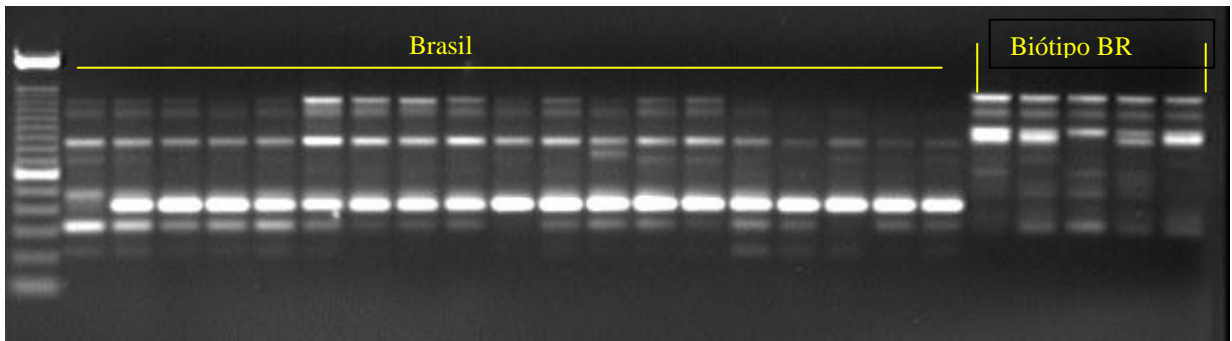
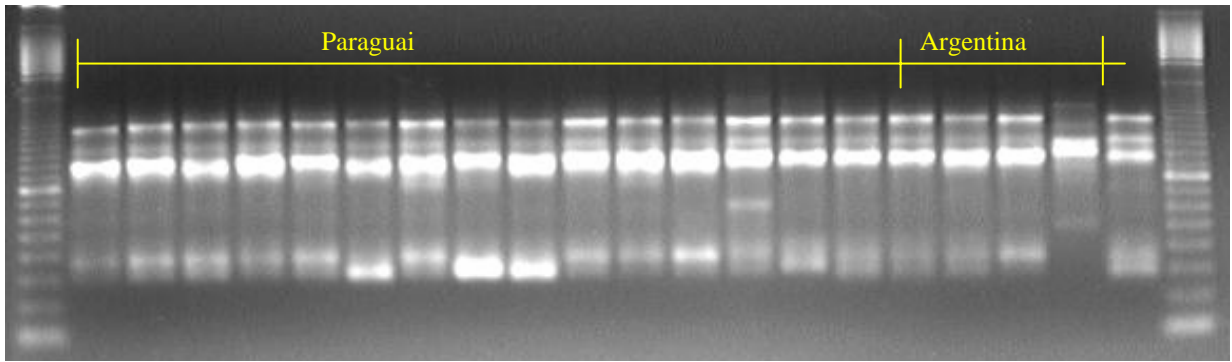
Os resultados das análises com os perfis eletroforéticos das amostras argentinas, paraguaias e brasileiras (Figuras 1, 2 e 3) utilizando-se os primers OPA 03 (Figura 1), OPA 10 (Figura 2) e OPA 15 (Figura 3) podem ser visualizados e comparados com os resultados apresentados na sessão de figuras relacionadas abaixo.

O padrão de bandeamento do biótipo **BR** de *B. tabaci* foi evidente para as amostras provenientes dos três países.

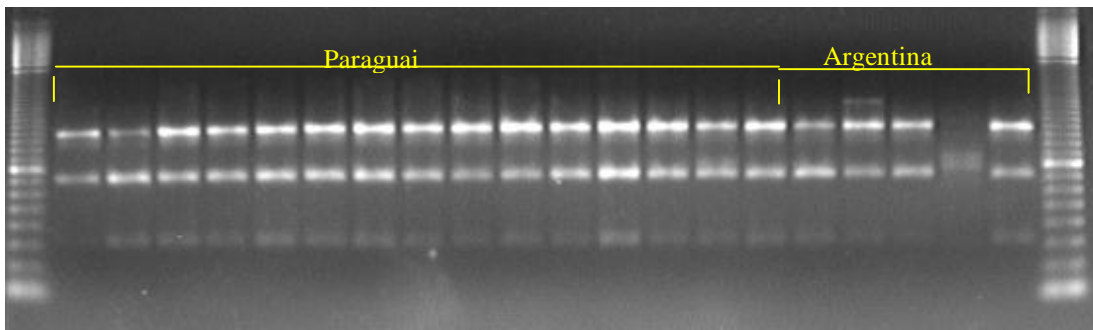
O diagnóstico molecular confirmou mais uma vez a presença e a predominância de populações do biótipo B no Brasil. O mesmo não ocorreu nas populações analisadas da Argentina e Paraguai, apesar de ter sido relatado a presença do biótipo B na Argentina (Lima *et al.*, 2001, Viscarret *et al.*, 2003).

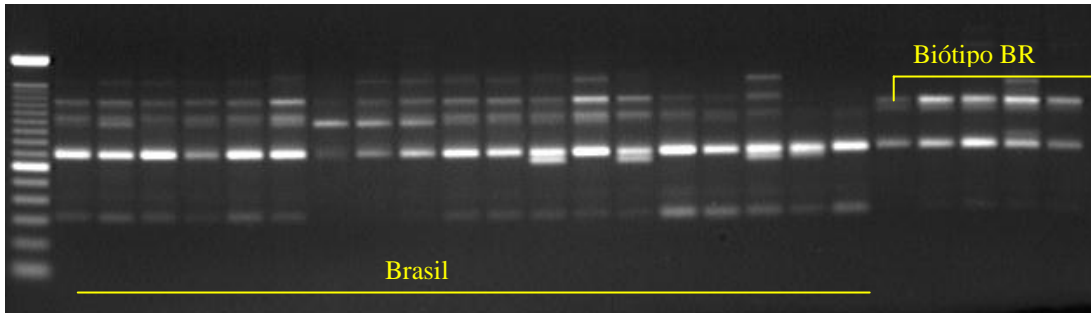


**Figura 1.** Perfis de RAPD obtidos com o primer OPA 03 de populações coletadas na Argentina, Paraguai e Brasil. O biótipo BR de *B. tabaci* coletado em cultura de tomate, em Rondonópolis / MT foi utilizado como padrão.



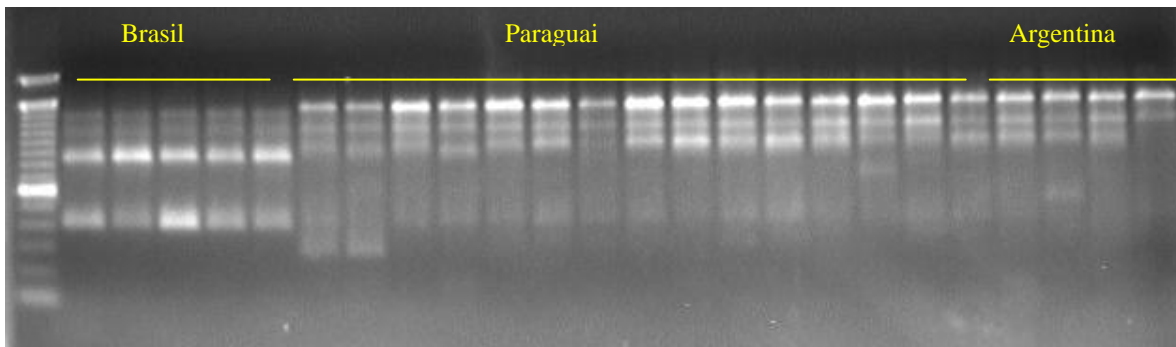
**Figura 2.** Perfis de RAPD obtidos com o primer OPA 10 de populações coletadas na Argentina, Paraguai e Brasil. O biótipo BR de *B. tabaci* coletado em cultura de feijão, em Buritis / GO foi utilizado como padrão.



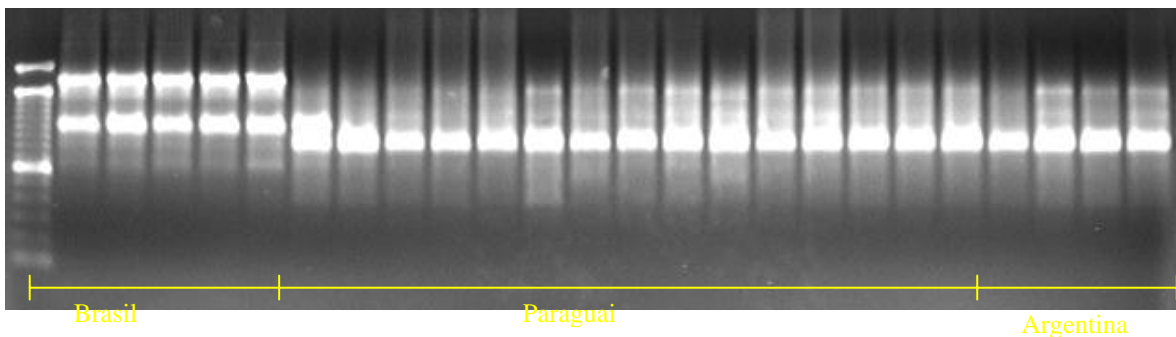


**Figura 3.** Perfis de RAPD obtidos com o primer OPA 15 de populações coletadas na Argentina, Paraguai e Brasil. O biótipo BR de *B. tabaci* coletado em cultura de feijão, em Buritis / GO foi utilizado como padrão.

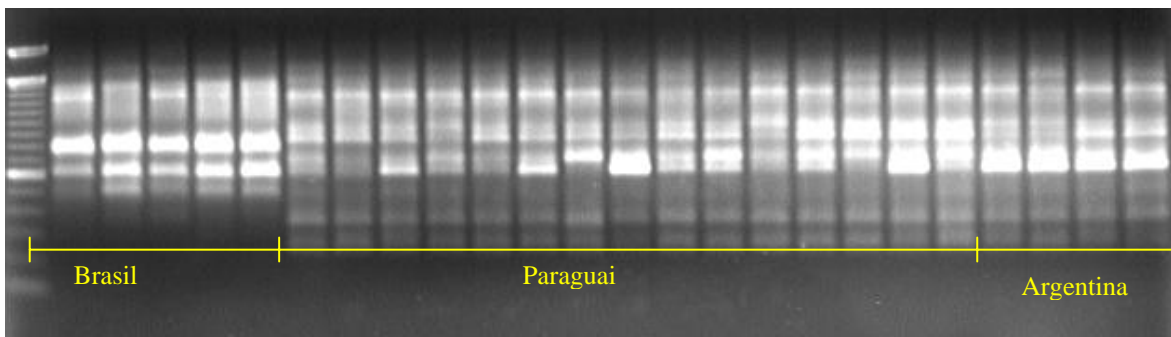
Na cultura de soja, os perfis de RAPD gerados confirmam as divergências genéticas entre os indivíduos morfologicamente idênticos (Figuras 4, 5, 6, 7 e 8).



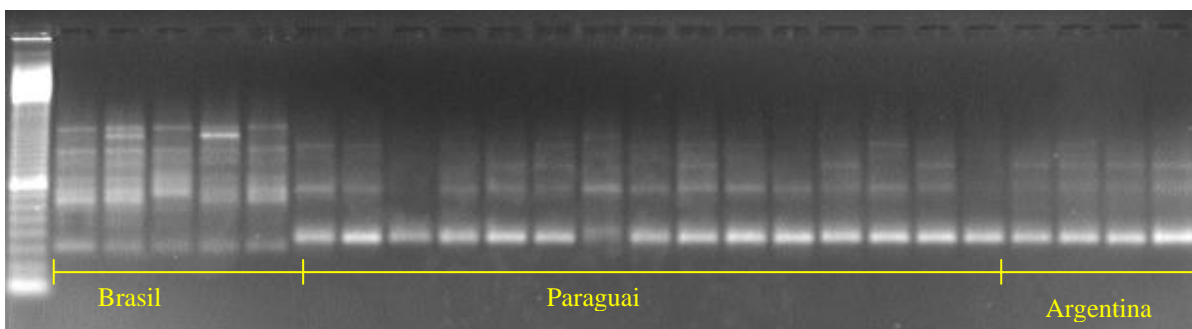
**Figura 4.** Perfis de RAPD obtido com primer OPA 10 de indivíduos coletados em soja, confirmando os padrões: biótipo B para indivíduos nacionais e biótipo BR para os estrangeiros.



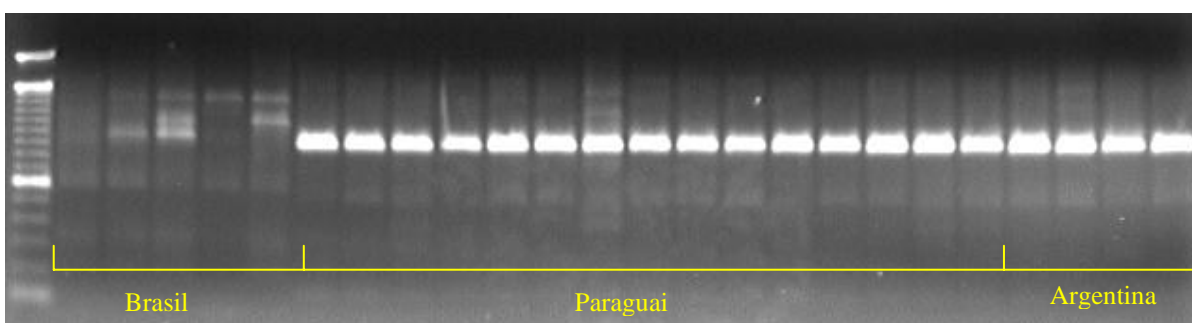
**Figura 5.** Perfis de RAPD obtido com primer OPA 13 de indivíduos coletados em soja, confirmando os padrões: biótipo B para indivíduos nacionais e biótipo BR para os estrangeiros.



**Figura 6.** Perfis de RAPD obtido com primer OPA 03 de indivíduos coletados em soja, confirmando os padrões: biótipo B para indivíduos nacionais e biótipo BR para os estrangeiros.



**Figura 7.** Perfis de RAPD obtido com primer OPA 02 de indivíduos coletados em soja, confirmando os padrões: biótipo B para indivíduos nacionais e biótipo BR para os estrangeiros.



**Figura 8.** Perfis de RAPD obtido com primer OPA 04 de indivíduos coletados em soja, confirmando os padrões: biótipo B para indivíduos nacionais e biótipo BR para os estrangeiros.

Utilizando-se o programa NTSYS-pc (versão 2.0), construiu-se as matrizes referentes a dois dendogramas (dados não apresentados). O primeiro resultado mostra a similaridade genética entre as populações coletadas no Brasil, Argentina e Paraguai e o segundo resultado, a similaridade entre os indivíduos coletados em cultura de soja na Argentina, Paraguai e Brasil.

Indivíduos coletados no Brasil em culturas de algodão (*Gossypium* spp.) e couve (*Brassica oleraceae*) constituíram um único agrupamento, apresentando 87% de variabilidade e dissimilaridade genética em relação ao outro grupo estabelecido pelas amostras provenientes da Argentina e Paraguai. Essas amostras perfizeram dois grupos com 8% de variabilidade genética entre eles, sendo um dos grupos, constituído em sua maioria de amostras argentinas.

Tais resultados indicam uma uniformidade genética entre os indivíduos coletados no Brasil e pouca variabilidade genética entre os indivíduos provenientes dos outros dois países. Os resultados dos dois subgrupos estrangeiros sugerem indícios de uma nova organização genômica dos indivíduos do complexo *B. tabaci*.

Quanto aos indivíduos coletados somente em soja, a análise revela uma segregação de 90 % de variabilidade genética entre os dois agrupamentos básicos e uma similaridade de apenas 10%.

## **Conclusões**

O biótipo BR foi confirmado na maioria das amostras analisadas.

O biótipo B não foi encontrado nas amostras provenientes da Argentina e Paraguai, apesar de ter sido relatada a sua presença na Argentina (Lima *et al.*, 2001, Viscarret *et al.*, 2003).

Observou-se nas análises estatísticas a similaridade no agrupamento por cultura hospedeira das populações do biótipo BR e do biótipo B.



Os resultados sugerem a necessidade constante de um monitoramento e fiscalização quanto à entrada de novos biótipos no país e a introdução de métodos de manejo mais adequados.

## Referências Bibliográficas

BROWN, J.K.; FROHLICH, D.R.; ROSSEL, R.C. The sweet potato or silverleaf whiteflies: biotypes of *Bemisia tabaci* or a species complex? **Annual Review of Entomology**, v.40, 1995.

BROWN, S.; MCLAUGHLIN, W., JEREZ, I.T. & BROWN, J.K. Identification and distribution of *Bemisia tabaci* (Gennadius) (Homoptera: Aleyrodidae) haplotypes in Jamaica. **Tropical Agriculture** v.79 n.3:140-149. 2002.

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

DE BARRO, P.J.; DRIVER, F. Use of RAPD PCR to distinguish the B biotype from other biotypes of *Bemisia tabaci* (Gennadius) (Hemiptera: Aleyrodidae). **Australian Journal Entomology**, v. 36, p. 149-152, 1997

DE BARRO, P.J., DRIVE, F., TREMAN, J.W. & CURRAN, J.. Phylogenetic relationship of world populations of *Bemisia tabaci* (Gennadius) using ribosomal ITS1. **Molecular Phylogenetic Evolution**, v. 16, p. 29-36, 2000.

GAWEL, N.J. & BARTLETT, A.C. Characterization of differences between whiteflies using RAPD-PCR. **Insect Molecular Biology**. 2, 33-38. 1993.

HAYMER, D.S. Arbitrary (RAPD) primer sequences used in insect studies. **Insect Molecular Biology**, v.3, p.191-194. 1994.

LIMA, L. H. C.; CAMPOS, L.; MORETZSOHN, M. C., FERREIRA D. N. M; RIBEIRO E SILVA, O. L., OLIVEIRA, M. R. V. **Populações de *Bemisia tabaci* (Gennadius) raça B no Brasil: análise da diversidade genética por RAPD.** Pesquisa em Andamento, nº 22, Dez/99, p.1-6, EMBRAPA/ CENARGEN, 1999.

LIMA, L.H.C.; NÁVIA, D.; INGLIS, P.W ; OLIVEIRA, M.R.V.. Survey of *Bemisia tabaci* (Gennadius) (Hemiptera:Aleyrodidae) biotypes in Brazil using RAPD markers. **Genetics and Molecular Biology**, v. 23(4), p. 1-5, 2000.

LIMA, LHC.; CAMPOS, L.; QUEIROZ, P.R.; LAGO, W.N.M.; OLIVEIRA, M.R.V. de. **Identificação de populações de mosca branca *Bemisia* spp. (hemiptera, aleyrodidae) coletadas no Paraguai.** Brasília. Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2001. 4p. (Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Comunicado Técnico, 72).

LIMA, L. H. C.; CAMPOS, L.; MORETZSOHN, M. C.; NÁVIA D.; OLIVEIRA, M. R. V. Genetic Diversity of *Bemisia tabaci* (Genn.) Populations in Brazil Revealed by RAPD Markers. **Genetics and Molecular Biology**, v. 25(2), p. 217-223, 2002.

MOYA, A., GUIRAO, P., CIFUENTES, D., BEITIA, F. & CENIS, J.L. Genetic diversity of Iberian populations of *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae) based on random amplified polymorphic DNA-polymerase chain reaction. **Molecular Ecology** v.10 p.4891-897. 2001.

MORALES, F.J. & ANDERSON, P.K. The emergence and dissemination of whitefly-transmitted geminiviruses in Latin America. **Archives of Virology** v.146: p.415-441. 2001.

OLIVEIRA, M.R.V. de; MORETZSOHN, M. de C.; QUEIROZ, P.R.; LAGO, W.N.M.; LIMA, L.H.C. **Levantamento de moscas-brancas na cultura de mandioca no Brasil**. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2001. 19p. (Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento, 3).

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

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

ROHLF, F.J. NTSYS-pc, Numerical taxonomy and multivariate analysis system, vers. 1.80. **Applied Biostatistics Inc.**, NY, 1993.

SIMON, B., CENIS, J.L., DEMICHELIS, S., RAPISARDA, C., CACIAGLI, P. & BOSCO, D. Survey of *Bemisia tabaci* (Hemiptera:Aleyrodidae) biotypes in Italy with the description of a new biotype (T) from Euphorbia characias. **Bulletin of Entomological Research** v.93, n.3, p.259-264. 2003.

VISCARRET, M.M., TORRES-JEREZ, I., AGOSTINI DE MANERO, E., LÓPEZ, S.N., BOTTO, E.E. & BROWN, J.K. Mitochondrial DNA evidence for a distinct new world group of *Bemisia tabaci* (Gennadius) (Hemiptera:Aleyrodidae) indigenous to Argentina and Bolívia, and presence of the old world B biotype in Argentina. **Annals of the Entomological Society of America** v.96, n.1, p.65-72. 2003.