

**DIFERENCIAÇÃO DE BIÓTIPOS DE *Bemisia tabaci* UTILIZANDO  
PCR-RFLP E SEQUENCIAMENTO DA REGIÃO ITS1 rDNA**

## **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**

*Luis Carlos Guedes Pinto*

Presidente

*Silvio Crestana*

Vice-Presidente

*Alexandre Kalil Pires*

*Ernesto Paterniani*

*Helio Tollini*

*Marcelo Barbosa Saintive*

Membros

## **Diretoria-Executiva da Embrapa**

*Silvio Crestana*

Diretor Presidente

*José Geraldo Eugênio de França*

*Kepler Euclides Filho*

*Tatiana Deane de Abreu Sá*

Diretores Executivos

## **Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia**

*José Manuel Cabral de Sousa Dias*

Chefe-Geral

*Maurício Antônio Lopes*

Chefe-Adjunto de Pesquisa e Desenvolvimento

*Maria Isabel de Oliveira Penteado*

Chefe-Adjunto de Comunicação e Negócios

*Maria do Rosário de Moraes*

Chefe-Adjunto de Administração

## **Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento 95**

### **DIFERENCIAÇÃO DE BIÓTIPOS DE *Bemisia tabaci* UTILIZANDO PCR-RFLP E SEQUENCIAMENTO DA REGIÃO ITS1 rDNA**

**Aline R. Rabello  
Paulo R. Queiroz  
Kenya C. Simões  
Cássia O. Hiragi  
Luzia H. C. Lima  
Maria Regina V. Oliveira  
Ângela Mehta**

Brasília, DF  
2005

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) 3348-4739 Fax:

(61) 3340-3666 <http://www.cenargen.embrapa.br>

e.mail:sac@cenargen.embrapa.br

### **Comitê de Publicações**

Presidente: *Maria Isabel de Oliveira Penteado*

Secretário-Executivo: *Maria da Graça Simões Pires Negrão*

Membros: *Arthur da Silva Mariante*

*Maria Alice Bianchi*

*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 Lara Pereira Machado*

Editoração eletrônica: *Maria da Graça S. P. Negrão*

### **1ª edição**

1ª impressão (2005):

- D 569 Diferenciação de biótipos de *Bemisia tabaci* utilizando PCR-RFLP e seqüenciamento da região ITS1 rDNA / Aline R. Rabello ... [et al.]. – Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2005. 23 p. – (Boletim de pesquisa e desenvolvimento / Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 1676 – 1340; 95)

1. *Bemisia tabaci* – praga cosmopolita. 2. *Bemisia tabaci* - mosca branca - análise dos biótipos B e Q. 3. *Bemisia tabaci* - mosca branca - PCR-RFLP. 4. *Bemisia tabaci* - mosca branca - seqüenciamento da região ITS1 rDNA. I. Rabello, Aline R. II. Série.

595.752 – CDD 21.

## SUMÁRIO

RESUMO.....	6
ABSTRACT.....	8
INTRODUÇÃO.....	9
MATERIAL E MÉTODOS .....	10
Biótipos de <i>B. tabaci</i> .....	10
Extração de DNA.....	11
PCR-RFLP da região ITS1 rDNA .....	12
Clonagem e sequenciamento da região ITS1 rDNA.....	12
Análise filogenética .....	13
RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	13
AGRADECIMENTOS.....	19
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	19

# DIFERENCIAÇÃO DE BIÓTIPOS DE *Bemisia tabaci* UTILIZANDO PCR-RFLP E SEQUENCIAMENTO DA REGIÃO ITS1 rDNA

---

**Aline R. Rabello<sup>1</sup>**

**Paulo R. Queiroz<sup>2</sup>**

**Kenya C. Simões<sup>3</sup>**

**Cássia O. Hiragi<sup>4</sup>**

**Luzia H. C. Lima<sup>5</sup>**

**Maria Regina V. Oliveira<sup>6</sup>**

**Ângela Mehta<sup>7</sup>**

## RESUMO

A mosca branca (*Bemisia tabaci*) é considerada uma das principais pragas da agricultura, causando danos nos agroecossistemas do Brasil e do mundo, em regiões tropicais e subtropicais. Atualmente, o complexo *B. tabaci* é constituído de aproximadamente 41 biótipos. Trata-se de uma praga cosmopolita, vetora de fitoviroses e polífaga, incluindo espécies cultivadas e ornamentais. Para o Brasil, a correta identificação desses biótipos é estratégica em termos de quarentena, pois apenas dois biótipos do complexo *B. tabaci* encontram-se presente no país. Atualmente, o biótipo Q, exótico para o Brasil, vem causando grande impacto na região do Mediterrâneo. O presente estudo teve por objetivo a análise dos biótipos B e Q utilizando PCR-RFLP (“Restriction Fragment Length Polymorphism”) e sequenciamento da região ITS1 rDNA, na tentativa de obter um marcador para diferenciação destes biótipos. Três populações do biótipo B foram utilizados, sendo uma proveniente dos Estados Unidos, coletada em cultura de melão e as outras duas do Brasil coletadas de cultura de soja e tomate, sendo o último cultivado em casa de vegetação. As três populações do biótipo Q foram provenientes da Espanha, Nigéria e Marrocos, coletadas das culturas de tomate, mandioca e pepino, respectivamente. Nas análises de PCR-RFLP utilizou-se um

---

<sup>1</sup> Universidade de Brasília

<sup>2</sup> Universidade de Brasília

<sup>3</sup> Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

<sup>4</sup> Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

<sup>5</sup> Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

<sup>6</sup> Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

<sup>7</sup> Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

total de 30 indivíduos, sendo 5 de cada um dos biótipos B e Q das diferentes regiões geográficas. A região ITS1 rDNA foi amplificada e digerida com as enzimas *AvaI*, *DdeI* e *Sau3A*. Os resultados mostraram uma alta similaridade entre os biótipos B e Q. Os biótipos B e Q da Espanha e do Marrocos apresentaram perfis idênticos, enquanto que a maioria dos indivíduos do biótipo Q da Nigéria apresentou perfil único. A região ITS1 rDNA dos indivíduos representando as populações e os perfis obtidos foi seqüenciada e a análise das seqüências demonstrou resultados semelhantes aos de PCR-RFLP. A obtenção de marcadores moleculares que permitam uma identificação rápida de biótipos é relevante para evitar a entrada de novos biótipos, contribuindo para fortalecer o sistema de quarentena vegetal do país.

## ABSTRACT

White fly (*Bemisia tabaci*) is considered one of the main pests in agriculture, causing severe losses in several vegetable and field crops in Brasil and in the world, including tropical and subtropical regions. The *B. tabaci* complex is formed by approximately 41 biotypes, and is a cosmopolitan pest able to transmit phytoviruses and to use different hosts, including cultivated and ornamental species. Therefore, the correct identification of these biotypes is a very important strategy for quarantine measures since only two biotypes of the *B. tabaci* complex are present in Brazil. The Q biotype, which is exotic to Brazil, has been causing great impact in agriculture in the Mediterranean region. The aim of the present work was to analyze the biotypes B and Q using PCR-RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) and sequencing of the ITS1 rDNA, in order to obtain a genetic marker to differentiate these biotypes. Three populations of the B biotype were used, one from the USA, collected from melon and two from Brazil, collected from soybean and tomato (Greenhouse). Three population of biotype Q, obtained from Spain, Nigeria and Morocco, were also used in this study and were collected from tomato, cassava and cucumber, respectively. A total of 30 individuals (5 from each biotype and each geographic region) were used in the PCR-RFLP analysis. The ITS1 rDNA region was amplified and digested with seven enzymes but only *Ava*I, *Dde*I and *Sau*3A produced digestion products. The results revealed a high similarity between the biotypes B and Q. The biotypes B and Q from Spain and Morocco presented identical profiles. However, the majority of the individuals of the biotype Q from Nigeria presented a unique profile. The ITS1 rDNA region of individuals representing the populations and profiles obtained were sequenced and the sequence analysis revealed similar results to those obtained by PCR-RFLP. A phylogenetic tree was constructed and showed that some individuals of the Q population of Nigeria were closer to the biotype Cassava. The results obtained herein showed that the ITS1 rDNA is a potential marker for a rapid identification of *B. tabaci* biotypes which are exotic to Brazil. The use of these markers is relevant to avoid the entry of new biotypes and contribute to the plant quarantine system in the country.



## INTRODUÇÃO

*Bemisia tabaci* (Gennadius) (Hemiptera, Aleyrodidae) é uma praga mundial que tem chamado à atenção nas últimas décadas, uma vez que tem sido responsável por prejuízos econômicos da ordem de bilhões de dólares. A mosca-branca é uma praga de culturas agrícolas e ornamentais em todas as regiões tropicais e subtropicais e podem causar danos diretamente (pragas), através de adultos e ninfas, e indiretamente (vetores) por meio da transmissão de fitovíruses (OLIVEIRA e LIMA, 1997).

O complexo *B. tabaci* é composto de numerosas populações que são morfologicamente indistinguíveis (ROSELL et al., 1997), no entanto, alguns dos biótipos como o B e Q, por serem polípagos, variam quanto a habilidade de transmitir fitovíruses (OLIVEIRA e LIMA, 1997), taxa de desenvolvimento (WANG e TSAI, 1996), habilidade em utilizar diferentes hospedeiros (BURBAN et al., 1992; BROWN e BIRD, 1995; BEDFORD et al., 1994) e habilidade de induzir mudanças fisiológicas em alguns hospedeiros (COSTA e BROWN, 1991; BEDFORD et al., 1994). A diferenciação das populações ou biótipos foi inicialmente realizada considerando-se diferentes perfis de esterases (LIU et al., 1992; BROWN e BIRD, 1995; BROWN et al., 1995; GUNNING et al., 1997), e posteriormente foi sustentada por perfis de RAPD-PCR (GAWEL e BARTLETT, 1993; DE BARRO et al., 1997; GUIRÃO et al., 1997). Atualmente, o complexo *B. tabaci* é constituído de aproximadamente 41 biótipos (DE BARRO et al., 2004), entretanto a classificação das populações desta espécie continua controversa.

No Brasil, os primeiros relatos de *B. tabaci* foram feitos por Bondar (1929) na Bahia e estas populações de *B. tabaci* foram designadas por Lima et al. (2002) de biótipo BR. O biótipo B foi detectado pela primeira vez nos Estados Unidos no início da década de oitenta (COSTA e BROWN, 1990, 1991). Esse biótipo apresenta um grande número de plantas hospedeiras, alta resistência a inseticidas (ANTHONY et al., 1995), além da habilidade de transmitir 60 diferentes tipos de fitovírus (SECKER et al., 1998). No Brasil, este biótipo foi introduzido no início da década de noventa (MELO, 1992; LOURENÇÃO e NAGAI, 1994) e nos últimos

anos sua dispersão atingiu 24 estados da Federação e o Distrito Federal, causando grandes perdas (OLIVEIRA e FARIA, 2000).

O biótipo Q é exótico ao Brasil e é de extrema importância por apresentar alta similaridade ao biótipo B encontrado no país, tanto biologicamente quanto no nível molecular. O biótipo Q embora apresente muita semelhança com o biótipo B, segundo Sanchez Campos et al. (1999) e Beitia et al. (1997) eles diferem em vários aspectos biológicos, como período de desenvolvimento, preferência de hospedeiros e transmissão eficiente de vírus. Em algumas áreas esses biótipos coexistem, levando à busca do entendimento das relações genéticas entre eles, bem como das competições no campo (MOYA et al., 2001), além de um possível cruzamento viável entre os biótipos, o que se tem verificado apenas em condições laboratoriais (RONDA et al., 1999).

De Barro et al. (2005) tem proposto a existência de seis grupos distintos no complexo *B. tabaci*: População Ásia, População Bali, População Bundaberg, População Cassava, População Gennadius e População Nova. Ainda são escassos os estudos sobre o biótipo nativo do Brasil (BR), apenas em algumas análises moleculares o biótipo BR é citado (LIMA et al., 1999, 2000, 2002). Além disso, diante da necessidade de se avaliar a diversidade genética dos diferentes biótipos presentes no país é relevante a obtenção de marcadores moleculares que permitam uma identificação rápida e segura com o objetivo de fortalecer o controle fitossanitário e evitando a entrada de novos biótipos no país, tornando o Sistema de Quarentena Vegetal mais seguro.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

### **Biótipos de *B. tabaci***

Neste estudo, foram analisados 30 indivíduos, sendo 5 de cada um dos biótipos B e Q de *B. tabaci* das diferentes regiões geográficas (Tabela 1). Populações do biótipo Q foram provenientes da Espanha, Nigéria e Marrocos. Os

indivíduos de cada população foram nomeados com o código de identificação seguido dos números 1 a 5.

**Tabela 1. Populações de *B. tabaci* utilizadas neste estudo.**

<b>Biótipo/Indivíduos</b>	<b>Origem</b>	<b>Cultura</b>	<b>Código de identificação</b>	<b>Número de acesso</b>
B	Estados Unidos Riverside, California	Melão	61	
B	Brasil Balsas, Maranhão	Soja	140	
B	Brasil Brasília, DF	Tomate	288	
Q	Marrocos	Pepino	7	
Q	Nigéria	Mandioca	8	
Q	Espanha	Tomate	14	
B*	Estados Unidos, Arizona	Algodão	-	AJ 315821
B*	Estados Unidos, Flórida	Tomate	-	AF 216072
Q*	Espanha	Curcubitácea	-	AJ 315795
A*	Estados Unidos, Arizona	Algodão	-	AJ 315796
A*	Estados Unidos Arizona	Algodão	-	AF 216068
Cassava*	Nigéria	Mandioca	-	AJ 315819
Cassava*	República Democrática do Congo	Mandioca	-	AJ 315809

\* Seqüências obtidas no banco de dados

### **Extração de DNA**

Inicialmente foi realizada a sexagem das populações, para a seleção de indivíduos fêmeas. A extração do DNA foi realizada por meio de um método simples descrita por Lima et al. (2000). As amostras foram maceradas em tampão de lise contendo Tris-HCl 10mM pH 8.0, EDTA 1mM, TRITON X-100 0,30%, proteinase K 60 µg/ml, e em seguida foram incubadas à 65°C por 30 minutos e a 95°C por 10 minutos. As amostras foram armazenadas a -20°C até o uso.

### **PCR-RFLP da região ITS1 rDNA**

A amplificação da região ITS1 rDNA foi realizada utilizando os primers TW81 (BRUST et al., 1998) e 5.8R (DE BARRO et al., 2000), conforme De Barro et al. (2000), com algumas modificações. O volume final da reação foi de 30 µl contendo 2 µl de DMSO, MgCl<sub>2</sub> 50 mM, 5µl de primer TW81 (2 mM) e 5 µl de primer 5.8R (2 mM), dNTP 10 mM, 0,2 µl de Taq Polimerase (Pharmacia). As amplificações foram realizadas com uma desnaturação inicial a 94°C por 5 min e posterior adição da Taq Polimerase. As amostras foram incubadas a 72°C por 5 min e desnaturadas a 95°C por 3 min. Em seguida foram realizados 30 ciclos com desnaturação a 95°C por 30 seg, anelamento a 54°C por 1 min e extensão a 72°C por 1 min. O produto de amplificação foi submetido à eletroforese em gel de agarose 1,5% e visualizado após coloração com brometo de etídio (0,5 µlml<sup>-1</sup>). Ladder 100 pb (Invitrogen) foi utilizado como marcador de peso molecular.

A região ITS1 rDNA amplificada foi digerida com as enzimas *XhoI*, *BamHI*, *EcoRI*, *PstI*, *AvaI*, *DdeI* e *Sau3A*. As digestões foram realizadas em volume final de 20 µl, contendo 1,0 µl de enzima para a digestão com *AvaI*, e 0,5 µl para as demais. Os fragmentos obtidos foram separados através de eletroforese em gel de agarose 2%, e visualizados após coloração com brometo de etídio (0,5 µlml<sup>-1</sup>). Na análise dos resultados, bandas menores que 100 pb não foram consideradas.

Foi construído um dendograma UPGMA baseado no coeficiente de similaridade de Jaccard usando dois indivíduos representando as populações e os perfis PCR-RFLP obtidos.

### **Clonagem e sequenciamento da região ITS1 rDNA**

Os produtos de amplificação da região ITS1 rDNA obtidos foram clonados em pGem T-Easy (Promega) e sequenciados em sequenciador automático ABI Prism 3700 DNA Analyser (Applied Biosystems Inc.). ITS1 rDNA de indivíduos representando cada população e cada perfil obtido em PCR-RFLP foi seqüenciado. O alinhamento das seqüências foi realizado utilizando o programa Clustal W (HIGGINS et al., 1994).

## Análise filogenética

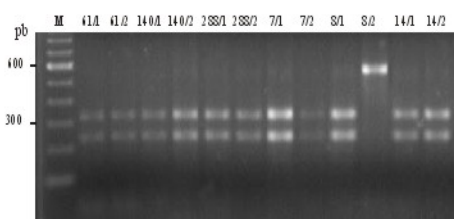
Uma árvore filogenética foi construída por meio do programa MEGA (KUMAR et al., 2004), utilizando distancia-p e o método de Neighbour-joining. Foi realizado bootstrap com 250 replicações. Além das seqüências determinadas neste estudo, foram também incluídas na análise seqüências da região ITS1 rDNA de alguns biótipos disponíveis no banco de dados para comparação (Tabela 1). *Trialeurodes vaporariorum* foi utilizado como grupo externo.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

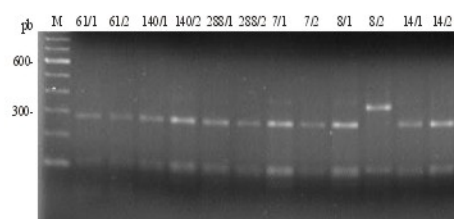
Diante das dificuldades de diferenciação morfológica já observadas por Mound (1963) e posteriormente por Rosell et al. (1997) entre populações reunidas sob a taxonomia de *B. tabaci*, existe a real necessidade de diferenciá-las por meio de algum marcador molecular. Neste estudo, foram realizadas comparações entre biótipos utilizando PCR-RFLP da região ITS1 rDNA por se tratar de uma região conservada do genoma, capaz de distinguir relações hierárquicas entre linhagens divergentes recentemente (DE BARRO, 1998).

**Figura 1.** Digestão da região ITS1 rDNA com as enzimas de restrição *Dde* I (A),

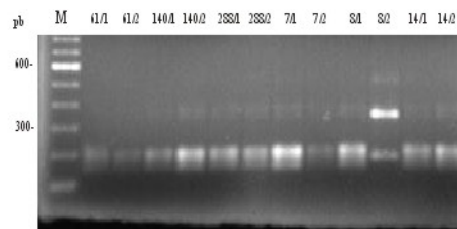
A)



B)



C)



*Ava* I (B) e *Sau*3A (C). 61, biótipo B dos Estados Unidos; 140, biótipo B do Brasil (soja); 288, biótipo B do Brasil (tomate); 7, biótipo Q do Marrocos; 8, biótipo Q da Nigéria; 14, biótipo Q da Espanha.

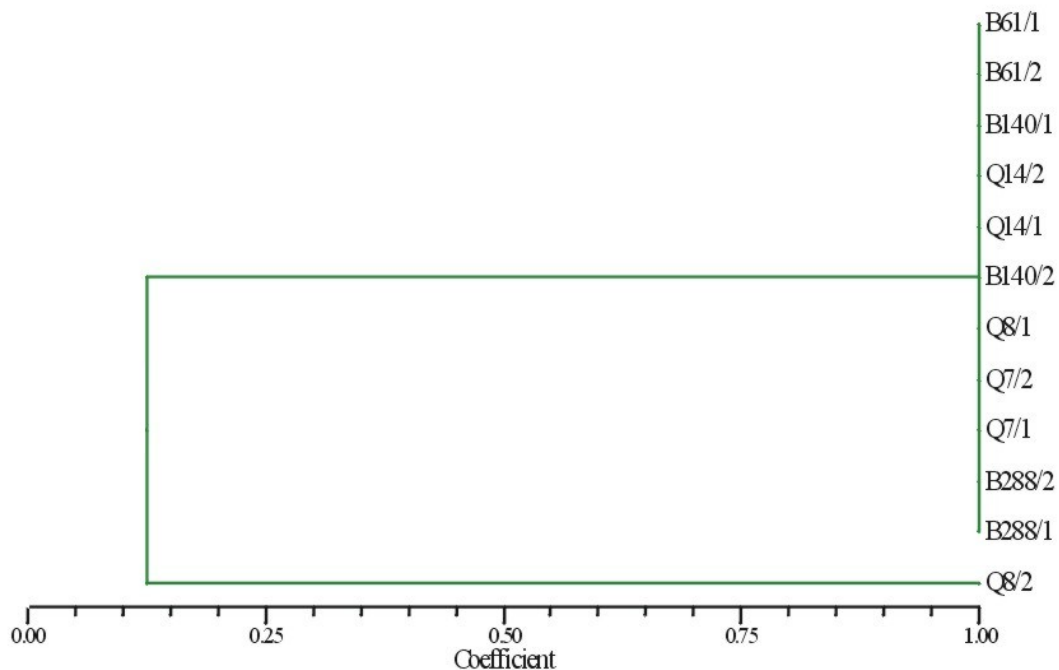
A amplificação do ITS1 rDNA revelou um fragmento de aproximadamente 550 pb para todos os indivíduos analisados. Este produto de amplificação foi submetido à digestão com 7 enzimas de restrição, sendo que não houve digestão quando as enzimas *XhoI*, *BamHI*, *EcoRI* e *PstI* foram utilizadas. Entretanto, diferentes perfis foram observados após a digestão do fragmento com as enzimas *DdeI*, *AvaI* e *Sau3A* (Figura 1).

Os resultados mostraram que indivíduos do biótipo B de populações dos Estados Unidos e do Brasil apresentaram perfil idêntico entre si e com o perfil dos indivíduos do biótipo Q do Marrocos e da Espanha para as três enzimas utilizadas (Figura 1). A população do biótipo Q da Nigéria, entretanto, apresentou características peculiares no grupo, uma vez que foi observada uma variação intrapopulacional (Figura 1). Um dos cinco indivíduos analisados dessa população apresentou o mesmo perfil dos biótipos Q e B, enquanto que os outros quatro indivíduos apresentaram perfil único para as três enzimas utilizadas. Os quatro indivíduos que apresentaram perfil diferente aos demais na população da Nigéria não apresentaram sítio de restrição para a enzima *DdeI*, entretanto apresentaram para as enzimas *SAU3A* e *AvaI*. Essa variação dentro da população do biótipo Q foi também reportada por Moya et al. (2001) e pode ser devido a ancestralidade deste biótipo em relação ao Biótipo B em determinada área. Partindo desse pressuposto, sugere-se que a presença do biótipo Q na Nigéria seja anterior à presença deste na Espanha e no Marrocos.

Um dendrograma UPGMA baseado no coeficiente de similaridade de Jaccard foi construído utilizando dois indivíduos de cada população analisada, sendo que na população da Nigéria foram utilizados indivíduos representando os diferentes perfis PCR-RFLP obtidos (Figura 2). Na análise do dendrograma evidencia-se a presença de dois grupos, sendo o primeiro formado de indivíduos do biótipo B das diferentes localidades, do biótipo Q do Marrocos e da Espanha e um indivíduo do biótipo Q da Nigéria. O segundo grupo refere-se ao indivíduo da população da Nigéria que apresentou perfil PCR-RFLP único.

A alta similaridade apresentada entre os indivíduos do biótipo B proveniente dos Estados Unidos e do Biótipo B do Brasil sugere que é inconsistente a

diferenciação dos indivíduos de acordo com as plantas hospedeiras, o que já havia sido observado por De Barro et al. (2005), segundo o qual existem apenas dois exemplos de *B. tabaci* restrita a um pequeno número de hospedeiras. Diante disso De Barro et al. (2005) sugere que a associação com as regiões geográficas é o mecanismo chave que dirige a diversidade genética, no entanto a a partir dos resultados obtidos observou-se que as distâncias geográficas não são suficientes para diferenciar as populações, uma vez que a dispersão da mosca-branca ocorreu aleatoriamente no mundo todo.



**Figura 2.** Dendrograma com representantes das populações e perfis PCR-RFLP observados.

Para uma análise mais detalhada do nível de divergência do ITS1 rDNA entre as diferentes populações e biótipos, foi seqüenciada a região ITS1 rDNA de um indivíduo representando as populações e os grupos obtidos na análise de PCR-RFLP. Foram obtidas seqüências variando de 531 a 548 pb, as quais foram alinhadas utilizando o programa Clustal W (HIGGINS et al., 1994). O alinhamento

das seqüências (Figura 3) revelou uma alta similaridade entre os indivíduos dos biótipos B e Q (99.6 % a 91,9 %). Os indivíduos do biótipo B 288/1, 140/1, 61/1 e Q 8/1, 14/1 e 7/1 apresentaram a mesma seqüência de nucleotídeos, exceto nas posições 219 e 414. O indivíduo 8/2 do biótipo Q da Nigéria apresentou a seqüência ITS1 rDNA mais divergente (Figura 3).

```

141      TGTTTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTGTCGAAACTCGACCAAGGTCTATCCGA 60
71      TGTTTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTGTCGAAACTCGACCAAGGTCTATCCGA 60
2881   TGTTTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTGTCGAAACTCGACCAAGGTCTATCCGA 60
611    TGTTTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTGTCGAAACTCGACCAAGGTCTATCCGA 60
1401   TGTTTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTGTCGAAACTCGACCAAGGTCTATCCGA 60
81     TGTTTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTGTCGAAACTCGACCAAGGTCTATCCGA 60
82     TGTTTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTGTCGAAACTCGACCAAGGTCTATCCGA 60
*****

141     CCCCAGCCGTCCCGCGGGACACAGGCCGGTGCCTCGTCGCGTCAGCGCGGGAGCGCCG 120
71     CCCCAGCCGTCCCGCGGGACACAGGCCGGTGCCTCGTCGCGTCAGCGCGGGAGCGCCG 120
2881   CCCCAGCCGTCCCGCGGGACACAGGCCGGTGCCTCGTCGCGTCAGCGCGGGAGCGCCG 120
611    CCCCAGCCGTCCCGCGGGACACAGGCCGGTGCCTCGTCGCGTCAGCGCGGGAGCGCCG 120
1401   CCCCAGCCGTCCCGCGGGACACAGGCCGGTGCCTCGTCGCGTCAGCGCGGGAGCGCCG 120
81     CCCCAGCCGTCCCGCGGGACACAGGCCGGTGCCTCGTCGCGTCAGCGCGGGAGCGCCG 120
82     CCCCAGCCGTCCCGCGGGACACAGGCCGGGCGCCCGTGCCTCGTCGCGTCAGCGCGGGAGCACCG 120
*****

141     GGCGGTGCACGGCTCGACCCCCCTGACGGCCCTGGCCCGGGAGCCCTCGTTCGGCGAGA 180
71     GGCGGTGCACGGCTCGACCCCCCTGACGGCCCTGGCCCGGGAGCCCTCGTTCGGCGAGA 180
2881   GGCGGTGCACGGCTCGACCCCCCTGACGGCCCTGGCCCGGGAGCCCTCGTTCGGCGAGA 180
611    GGCGGTGCACGGCTCGACCCCCCTGACGGCCCTGGCCCGGGAGCCCTCGTTCGGCGAGA 180
1401   GGCGGTGCACGGCTCGACCCCCCTGACGGCCCTGGCCCGGGAGCCCTCGTTCGGCGAGA 180
81     GGCGGTGCACGGCTCGACCCCCCTGACGGCCCTGGCCCGGGAGCCCTCGTTCGGCGAGA 180
82     GGCGGTGCACGGCTCGACCCCCCTGACGGCCCGGGCGCGG-AGCCCTCGTTCGGCGAGA 179
*****

141     CTCCGGGGCCGGGCCAGATCCGGAAGCGCT-AACGTCGCTCCGGCCCGGTAGAATCG--- 236
71     CTCCGGGGCCGGGCCAGATCCGGAAGCGCT-AACGTCGCTCCGGCCCGGTAGAATCG--- 236
2881   CTCCGGGGCCGGGCCAGATCCGGAAGCGCT-AACGTCGCTACGGCCCGGTAGAATCG--- 236
611    CTCCGGGGCCGGGCCAGATCCGGAAGCGCT-AACGTCGCTACGGCCCGGTAGAATCG--- 236
1401   CTCCGGGGCCGGGCCAGATCCGGAAGCGCT-AACGTCGCTACGGCCCGGTAGAATCG--- 236
81     CTCCGGGGCCGGGCCAGATCCGGAAGCGCT-AACGTCGCTCCGGCCCGGTAGAATCG--- 236
82     CTCCGAG-CCGGCCAGATCCGGAAGCGTTTAACTGCTCCGGCCCGGTCCGCTCGTCCG 238
*****

141     ---GGTCGGAGCGAGCGCCGATGCCGCCAGCGCACCCCGACCCCGCCGCGGCCGCCAGGC 293
71     ---GGTCGGAGCGAGCGCCGATGCCGCCAGCGCACCCCGACCCCGCCGCGGCCGCCAGGC 293
2881   ---GGTCGGAGCGAGCGCCGATGCCGCCAGCGCACCCCGACCCCGCCGCGGCCGCCAGGC 293
611    ---GGTCGGAGCGAGCGCCGATGCCGCCAGCGCACCCCGACCCCGCCGCGGCCGCCAGGC 293
1401   ---GGTCGGAGCGAGCGCCGATGCCGCCAGCGCACCCCGACCCCGCCGCGGCCGCCAGGC 293
81     ---GGTCGGAGCGAGCGCCGATGCCGCCAGCGCACCCCGACCCCGCCGCGGCCGCCAGGC 293
82     CCGGGCCGGCGGAGCGCCGATGCCGCCAGCGCACCCCGACCCCGCCGCGGCCGCCAGAGGC 298
** * * *

141     CCGCCGCGGGGAACGGCCCGTCTGAGAGTAGCCCCCTTCGCCGAGGGGGGACGCCGG 353
71     CCGCCGCGGGGAACGGCCCGTCTGAGAGTAGCCCCCTTCGCCGAGGGGGGACGCCGG 353
2881   CCGCCGCGGGGAACGGCCCGTCTGAGAGTAGCCCCCTTCGCCGAGGGGGGACGTCGG 353
611    CCGCCGCGGGGAACGGCCCGTCTGAGAGTAGCCCCCTTCGCCGAGGGGGGACGTCGG 353
1401   CCGCCGCGGGGAACGGCCCGTCTGAGAGTAGCCCCCTTCGCCGAGGGGGGACGTCGG 353
81     CCGCCGCGGGGAACGGCCCGTCTGAGAGTAGCCCCCTTCGCCGAGGGGGGACGTCGG 353
82     CCGCCGCGGGGAACGGCCCGTCTGAAAATTGCCCGCTTTCGCCGAGGCGGG-ACGTCGG 357
*****

141     GCCGTGGGGAGCGCGGCAGAGCGTTACGGTGCACG-ATCCGAGTCTCTCGTCGGCGAA 412
71     GCCGTGGGGAGCGCGGCAGAGCGTTACGGTGCACG-ATCCGAGTCTCTCGTCGGCGAA 412
2881   GCCGTGGGGAGCGCGGCAGAGCGTTACGGTGCACG-ATCCGAGTCTCTCGTCGGCGAA 412

```



```

611      GCCGTGGGGAGCGCGGCAGAGCGGTTACGGTGCACG-ATCCGAGTCTCTCGTCGGCGAA 412
1401    GCCGTGGGGAGCGCGGCAGAGCGGTTACGGTGCACG-ATCCGAGTCTCTCGTCGGCGAA 412
81      GCCGTGGGGAGCGCGGCAGAGCGGTTACGGTGCACG-ATCCGAGTCTCTCGTCGGCGAA 412
82      GCCGTGGGGAGCGCGGCAGAGCGGTTACGGTGCACACATCCAAGTCTCTCGTCGGCGAA 417
*****

141      ACC-GGGCCTTTCGCCGGCCTCGGGGCTCTCCGCCCGTCGGTGAGCCTCGGAACGGCGG 471
71      ACC-GGGCCTTTCGCCGGCCTCGGGGCTCTCCGCCCGTCGGTGAGCCTCGGAACGGCGG 471
2881    ATC-GGGCCTTTCGCCGGCCTCGGGGCTCTCCGCCCGTCGGTGAGCCTCGGAACGGCGG 471
611     ATC-GGGCCTTTCGCCGGCCTCGGGGCTCTCCGCCCGTCGGTGAGCCTCGGAACGGCGG 471
1401    ATC-GGGCCTTTCGCCGGCCTCGGGGCTCTCCGCCCGTCGGTGAGCCTCGGAACGGCGG 471
81      ACC-GGGCCTTTCGCCGGCCTCGGGGCTCTCCGCCCGTCGGTGAGCCTCGGAACGGCGG 471
82      ACCCGGGCCTTTCGCCGGCCTCGGGGCTCTCCGCCCGTCGGGGAGCCTCGGAACGGCGG 477
* * *****

141      AGCATCGCCAGAAAGCCCTGAAAGATGGGCGAGGAAATAACCCCGAACGGTGGATCACTC 531
71      AGCATCGCCAGAAAGCCCTGAAAGATGGGCGAGGAAATAACCCCGAACGGTGGATCACTC 531
2881    AGCATCGCCAGAAAGCCCTGAAAGATGGGCGAGGAAATAACCCCGAACGGTGGATCACTC 531
611     AGCATCGCCAGAAAGCCCTGAAAGATGGGCGAGGAAATAACCCCGAACGGTGGATCACTC 531
1401    AGCATCGCCAGAAAGCCCTGAAAGATGGGCGAGGAAATAACCCCGAACGGTGGATCACTC 531
81      AGCATCGCCAGAAAGCCCTGAAAGATGGGCGAGGAAATAACCCCGAACGGTGGATCACTC 531
82      AGCATCGCCAGCATGCCCTGAAAGATGGGCGAGGAAATAACCCCGAACGGTGGATCACTC 537
*****

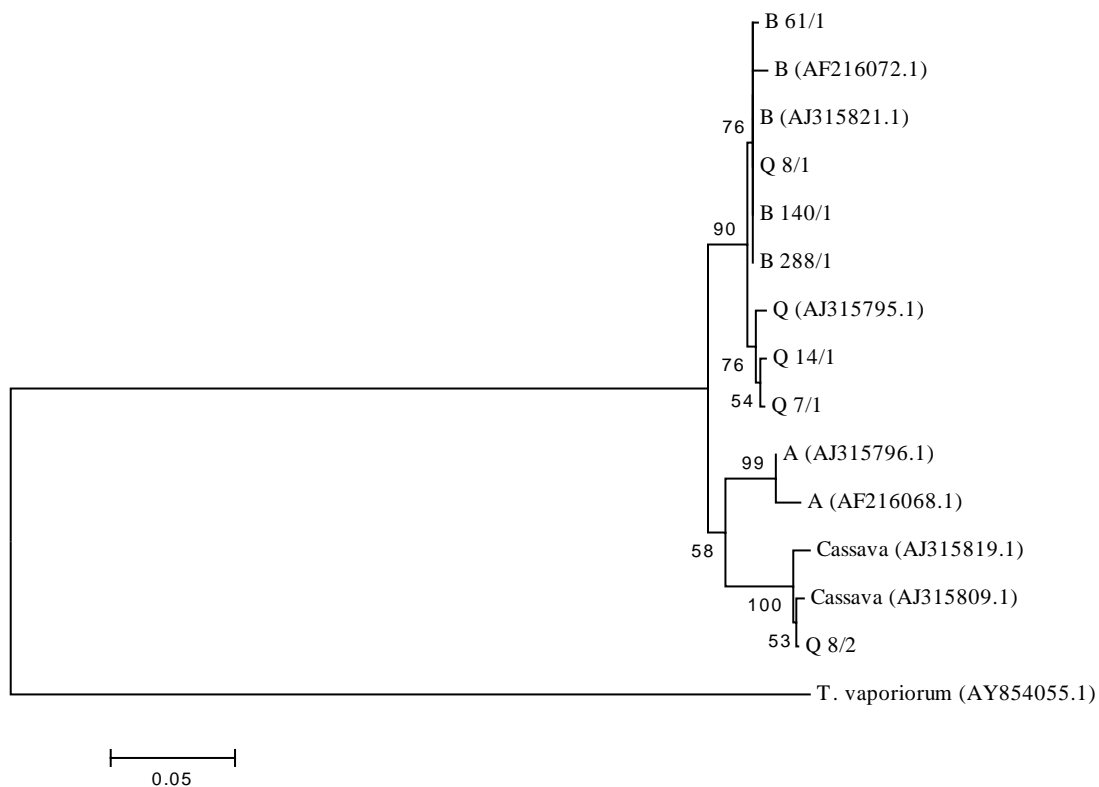
141      GGCTCGC-GGAT 542
71      GGCTCGCTGGAT 543
2881    GGCTCGC-GGAT 542
611     GGCTCGC-GGAT 542
1401    GGCTCGC-GGAT 542
81      GGCTCGC-GGAT 542
82      GGCTCGC-GGAT 548
*****

```

**Figura 3.** Alinhamento das sequências representando as populações e grupos obtidos em PCR-RFLP da região ITS1 rDNA. O símbolo \* indica bases idênticas.

Uma árvore filogenética foi também construída, incluindo seqüências da região ITS1 rDNA dos biótipos A, Q e B disponíveis no banco de dados (Tabela 1). A árvore filogenética revelou três grupos principais (Figura 4), sendo um formado pelos biótipos B do Brasil e dos Estados Unidos e Q da Espanha, Marrocos e Nigéria (indivíduo 8/1), outro formado por indivíduos do biótipo A e o terceiro formado pelo biótipo Cassava e Q da Nigéria (indivíduo 8/2). No geral os valores de *bootstrap* foram altos, na maioria superiores de 87%, indicando uma alta confiabilidade nos resultados obtidos. Resultados semelhantes foram observados por De Barro et al. (2000) ao analisar a região ITS1 rDNA de diferentes biótipos. Estes autores reportaram que as populações da América (biótipo A) formaram um grupo irmão ao do biótipo B e biótipos do norte da África.

Com base nessas informações, a análise da região ITS1 rDNA constitui um instrumento valioso e complementar ao RAPD, permitindo inferir sobre a identificação de espécies e biótipos diferentes, associados à diversidade genética. Esses marcadores são importantes métodos que auxiliam na identificação da praga de forma mais rápida e segura, permitindo ao sistema de quarentena do país, evitar a entrada de biótipos exóticos que podem causar impacto econômico, ambiental e social em importantes culturas do sistema agrícola de produção.



**Figura 4.** Relações filogenéticas entre os biótipos analisados, listados na Tabela 1. *Trialeurodes vaporariorum* foi utilizado como grupo externo.

## AGRADECIMENTOS

Agradecimentos ao Prof. Dr. Ismail Abdullahi do Departamento de Proteção de Planta e Biologia Ambiental da Universidade de Ibadan, Nigéria e ao Dr. José Luis Caris da região de Murcia, Espanha, pelo envio das amostras de *B. tabaci* biótipo Q.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALJANABI, S. M.; LOIÁCONO, M. S.; LOURENÇO, R. T.; BORGES, M.; TIGANO, M. S. RAPD analysis revealing polymorphism in egg parasitoids of soybean stink bugs (Hemiptera: Pentatomidae). **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, Jaboticabal, v. 27, p. 345-352, 1998.

ANTHONY, N. N.; BROWN, J. K.; MARKHAM, P. G.; FRENCH- CONSTANT, R. H. Molecular analysis of cyclodiene resistance- associated mutations among populations of sweetpotato whitefly *Bemisia tabaci*. **Pestic. Biochem. Physiol**, v. 51, p. 220-228, 1995.

BEDFORD, I. D.; BRIDDON, R. W.; BROWN, J. K.; ROSELL, R. C.; MARKHAM, P. G. Geminivirus transmission and biological characterisation of *Bemisia tabaci* (Gennadius) from different geographic regions. **Annals of Applied Biology**, Warwick, GB, v. 125, p. 311-325, 1994.

BEITIA, F.; MAYO, I.; ROBLES-CHILLIDA, E. M.; GUIRA, P.; CENIS, J. L. Current status of *Bemisia tabaci* (Gennadius) in Spain: the presence of biotypes of this species. In: ALBAJES, R.; CARNERO, A. (Ed.). **Integrated control in protected crops "Mediterranean climate"**. [S.l: s.n.], 1997. p. 99–106.

BELLOWS, T. S.; PERRING, T. M.; GILL, R. J.; HEADRICK, D. H. Description of a species of *Bemisia* (Homoptera: Aleyrodidae). **Annals of the Entomological Society of America**, College Park, US, v. 87, p. 195–206, 1994.

BONDAR, G. Aleyrodidos do Brasil (2ª contribuição). **Boletim do laboratório de Patologia Vegetal do Estado da Bahia**, Salvador, v. 5, p. 1-17, 1929.

BROWN, J. K.; BIRD, J. Variability within the *Bemisia tabaci* species complex and its relation to new epidemics caused by geminiviruses. **CEIBA**, Tegucigalpa, HN, v. 36, p. 73-80, 1995.

BROWN, J. K.; FROHLICH, D. R.; ROSELL, R. C. The sweetpotato silverleaf whiteflies: biotypes of *Bemisia tabaci* or a new species complex? **Annual Review of Entomology**, Stanford, US, v. 40, p. 511-534, 1995.

BURBAN, C.; FISHPOOL, L. D. C.; FAUQUET, C.; FARGETTE, D.; THOUVENEL, J. C. Host-associated biotypes within West African populations of the whitefly *Bemisia tabaci* (Genn.), (Hom., Aleyrodidae). **Journal of Applied Entomology**, Berlin, v. 113, p. 416–423, 1992.

BRUST, R. A.; BALLARD, J. W. O.; DRIVER, F.; HARTLEY, D. M.; GALWAY, N. J. Molecular systematics, morphological analysis, and hybrid crossing identify a third taxon, *Aedes (Halaedes) wardandensis* sp. nov., of the *Aedes (Halaedes) australis* species-group (Diptera: Culicidae). **Canadian Journal of Zoology**, Ottawa, CA, v. 76, p. 1236–1246, 1998.

CAMPBELL, B. C.; STEFFEN-CAMPBELL, J. D.; GILL, R. J. Evolutionary origin of whiteflies (Hemiptera: Sternorrhyncha: Aleyrodidae) inferred from 18S rDNA sequences. **Insect Molecular Biology**, Oxford, GB, v. 3, p. 73-89, 1994.

COSTA, H. S.; BROWN, J. K. Variability in biological characteristics, isozyme patterns and virus transmission among populations of *Bemisia tabaci* in Arizona. **Phytopathology**, Saint Paul, US, v. 80, p. 888-893, 1990.

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**, Dordrecht, NL, v. 61, p. 211–219, 1991.

COSTA, H. S.; JOHNSON, M. W.; ULLMAN, D. E.; OMER, A. D.; TABASHNIK, B. E. Sweetpotato whitefly (Homoptera: Aleyrodidae) analysis of biotypes and distribution in Hawaii. **Environmental Entomology**, College Park, US, v. 22, p. 16-20, 1993.

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 of Entomology**, Melbourne, Australia, v. 36, p. 149–152, 1997.

DE BARRO, P. J.; DRIVER, F.; TRUEMAN, J. W. H.; CURRAN, J. Phylogenetic Relationships of World Populations of *Bemisia tabaci* (Gennadius) using ribosomal ITS1. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, Orlando, US, v. 16, p. 29-36, 2000.

DE BARRO, P. J.; HART, P. J. Mating interactions between two biotypes of the whitefly, *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae) in Australia. **Bulletin of Entomological Research**, Farnham Royal, GB, v. 90, n. 2, p. 103-112, 2000.

DE BARRO, P. J.; LIEBREGTS, W.; CARVER, M. Distribution and identity of biotypes of *Bemisia tabaci* (Gennadius) (Hemiptera: Aleyrodidae) in member countries of the Secretariat of Pacific Community. **Australian Journal of Entomology**, v. 37, n. 3, p. 214-218, 1998.

DE BARRO, P. J.; TRUEMAN, J. W. H.; FROHLICH, D. R. *Bemisia argentifolii* is a population of *B. tabaci*: the molecular genetic differentiation of *B. tabaci* populations around the world. **CSIRO Entomology**, 2005. No prelo.

DE BARRO, P. J.; TRUEMAN, J. W. H.; FROHLICH, D. R. ***Bemisia argentifolii* is a population of *B. tabaci*: the molecular genetic differentiation of *B. tabaci* populations around the world.** [S.l: s.n., 20--?]. Artigo recebido por luzia@cenagen.embrapa.br em 04 mar. 2004.

GAWELL, N. J.; BARTLETT, A. C. Characterization of differences between whiteflies using RAPD-PCR. **Insect Molecular Biology**, Oxford, GB, v. 2, p. 33–38, 1993.

GUIRAO, P.; BEITIA, F.; CENIS, J. L. Biotype determination of Spanish populations of *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae). **Bulletin of Entomological Research**, Farnham Royal, GB, v. 87, p. 587–593, 1997.

GUNNING, R. V.; BYRNE, F. J.; DEVONSHIRE, A. L. Electrophoretic analysis of non- B and B- biotype *Bemisia tabaci* (Gennadius) (Hemiptera: Aleyrodidae) in Australia. **Australian Journal of Entomology**, Melbourne, Austrália, v. 36, p. 245-249, 1997.

HIGGINS, D.; THOMPSON, J.; GIBSON, T.; THOMPSON, J. D.; HIGGINS, D. G.; GIBSON, T. J.; CLUSTAL, W. Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. **Nucleic Acids Research**, Oxford, GB, v. 22, p. 4673-4680, 1994.

KUMAR, S.; TAMURA, K.; NEI, M. MEGA3: Integrated software for molecular evolutionary genetics analysis and sequence alignment. **Briefings in Bioinformatics**, v. 5, p. 150-163, 2004.

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.** Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 1999. Não paginado. (Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Pesquisa em Andamento, 22).

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**, Ribeirão Preto, v. 25, n. 2, p. 217-223, 2002.

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**, Ribeirao Preto, v. 23, n. 4, p. 1-5, 2000.

LIU, H. Y.; COHEN, S.; DUFFUS, J. E. The use of isozyme patterns to distinguish sweetpotato whitefly (*Bemisia tabaci*) biotypes. **Phytoparasitica**, Bet Dagan, IL, v. 20, p. 187–194, 1992.

LOURENÇÃO, A. L.; NAGAI, H. Surtos populacionais de *Bemisia tabaci* no Estado de São Paulo. **Bragantia**, Campinas, SP, v. 53, p. 53-59, 1994.

MELO, P. C. T. **Mosca-branca ameaça produção de hortaliças**. Campinas: Asgrow do Brasil Sementes, 1992. 2 p. (Asgrow-Semente. Informe Técnico, s/nº).

MOUND, L. A. Host correlated variation in *Bemisia tabaci*(Genn.) (Homoptera: Aleyrodidae). **Proceedings of the Royal Entomological Society of London, Series A**, London, v. 38, p. 171-180, 1963.

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**, Oxford, GB, v. 10, p. 891-897, 2001.

OLIVEIRA, M. R. V.; LIMA, L. H. C. Padrões isoenzimáticos de *Trialeurodes vaporariorum* e de *Bemisia tabaci* (Homoptera:Aleyrodidae). **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 32, p. 683-687, 1997.

OLIVEIRA, M. R. V.de; FARIA, M. R. de. **Mosca branca do complexo Bemisia tabaci (Gennadius) (Hemiptera, Aleyrodidae): bioecologia e medidas de controle**. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2000. 111 p. (Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Documentos, 48)

RONDA, M.; ADÁN, A.; CIFUENTES, D.; CENIS, J. L.; BEITIA, F. Laboratory evidence of interbreeding between biotypes of *Bemisia tabaci*(Homoptera: Aleyrodidae) present in Spain. In: INTERNATIONAL PLANT VIRUS EPIDEMIOLOGY SYMPOSIUM, 7., 1999, Aguadulce, Spain. **Plant virus epidemiology: current status and future prospects - abstracts**. Aguadulce: ISPP: CSIC: INITAA, 1999. p. 83-84.

ROSELL, R. C.; BEDFORD, I. D.; FROHLICH, D. R.; GILL, R. J.; BROWN, J. K.; MARKHAM, P. G. Analysis of morphological variation in distinct populations of *Bemisia tabaci* (Homoptera: Aleyrodidae). **Annals of the Entomological Society of America**, Lanham, US, v. 90, p. 575-589, 1997.

SÁNCHEZ CAMPOS, S.; NAVAS CASTILLO, J.; CAMERO, R.; SORIA, C.; DIAZ, J. A.; MORIONES, E. Displacement of tomato yellow leaf curl virus (TYLCV)-Sr by TYLCV-Is in tomato epidemics in Spain. **Phytopathology**, Pretoria, África do Sul, v. 89, p. 1038-1043, 1999.

SECKER, A. E.; BEDFORD, I. A.; MARKHAM, P. G.; WILLIAM, M. E. C. Squash, a reliable field indicator for the presence of B biotype of tabaco whitefly, *Bemisia tabaci*. **Brighton Crop Protection Conference: Pests and Diseases**, v. 3, p. 837-842, 1998.

WANG, K.; TSAI, J. H. Temperature effect on development and reproduction of silverleaf whitefly (Homoptera: Aleyrodidae). **Annals of the Entomological Society of America**, Lanham, US, v. 89, p. 375-384, 1996.