

Aplicación de la técnica RAPD-PCR a la taxonomía de moscas blancas (*Homoptera, Aleyrodidae*)

P. GUIRAO, F. BEITIA y J. L. CENIS

La técnica RAPD-PCR consiste en la amplificación enzimática de fragmentos de ADN, utilizando cebadores de secuencia arbitraria que hibridan en loci repartidos aleatoriamente en todo el genoma. Ello revela la existencia de polimorfismos que son utilizables como marcadores genéticos y taxonómicos en todo tipo de organismos, y entre ellos, insectos áfidos y dípteros. Con el objeto de conocer su utilidad en la taxonomía de Aleyrodidos, se tomaron ocho poblaciones de *Bemisia tabaci* y otras tantas de *Trialeurodes vaporariorum* de la zona costera de Murcia, y una de *B. tabaci* de Tenerife. La reacción con muestras de ADN extraídas de individuos de la misma población muestra la existencia de una pequeña variación intrapoblacional. La comparación de diferentes poblaciones, muestra que las poblaciones de *T. vaporariorum* muestreadas son altamente similares entre sí, mientras que en *B. tabaci* la población procedente de Tenerife es claramente diferente a las procedentes de Murcia. En cualquier caso, ambas especies son claramente distinguibles en base a sus pautas de ADN amplificado. También se ha empleado la técnica con objeto de detectar la presencia de parasitoides en el interior de las pupas parasitadas. Amplificando el ADN de las mismas, se observa la presencia de bandas de ADN correspondientes al parasitoides, junto con las correspondientes al huésped, permitiendo así su identificación mediante comparación con las pautas de ADN del parasitoides aislado.

P. GUIRAO y J. L. CENIS. Dept. Protección Vegetal. CIDA. Consejería de Agricultura, Ganadería y Pesca de la Región de Murcia. 30150 La Alberca (Murcia).
F. BEITIA. Dept. Protección Vegetal. CIT-INIA. Ctra. La Coruña, km 7,5. 28040 Madrid.

Palabras clave: *Bemisia tabaci*, *Trialeurodes vaporariorum*, *Encarsia* spp., *Eretmocerus* spp., Reacción en Cadena de la Polimerasa.

INTRODUCCION

Bemisia tabaci (Genn.) y *Trialeurodes vaporariorum* (West.) son dos especies de moscas blancas, plagas de un gran número de cultivos hortícolas y ornamentales. *Bemisia tabaci* ya fue citada en la Península Ibérica, en 1944 (GÓMEZ-MENOR, 1944), en distintos lugares de ésta, y recientemente en Canarias (CARNERO *et al.*, 1988). No habían existido problemas para su control hasta la última década, en que han aumentado considerablemente los daños sobre todo los derivados de su carácter de vector de virosis, causando importantes pérdidas en Europa y

América. Este aumento de los problemas se ha atribuido a la difusión de un biotipo «B» diferente de los conocidos anteriormente (BEDFORD *et al.*, 1993; COHEN *et al.*, 1992).

Un elemento importante para el control es el de realizar una correcta clasificación taxonómica, no sólo al nivel de especie sino de posibles biotipos. Las claves de clasificación actuales no son totalmente satisfactorias, pues se basan fundamentalmente en el estudio del pupario, que a su vez depende de la estructura de la hoja en la que se desarrolla. Una técnica de gran potencial para la taxonomía de insectos es la RAPD-PCR (WILLIAMS *et al.*, 1990). Esta consiste en la am-

plificación enzimática de fragmentos de ADN, mediante la realización de una reacción PCR con cebadores de secuencia arbitraria que hibridan en loci repartidos aleatoriamente en todo el genoma. Ello revela la existencia de polimorfismos, útiles como marcadores genéticos y taxonómicos. La técnica es de ejecución relativamente sencilla y rápida, permite una alta discriminación taxonómica, y requiere una cantidad mínima de material del insecto. Además, los resultados son independientes del estado de desarrollo del mismo. En el campo de la Entomología Agrícola, la técnica RAPD ha sido utilizada con éxito en la identificación de diversas especies y poblaciones de áfidos (BLACK *et al.*, 1992; CENIS *et al.*, 1993) y de dípteros (BALLINGER-CRABTREE *et al.*, 1992; KAMBHAPATI *et al.*, 1992) entre otros. En el presente trabajo se describen algunos resultados preliminares acerca de la puesta a punto de la técnica para la taxonomía de *B. tabaci* y *T. vaporariorum*. Otra aplicación de la técnica es la posibilidad de identificar la especie del parasitoide en pupas pa-

rasitadas del insecto mediante la comparación de las pautas de ADN de la pupa parasitada, las de una pupa no parasitada, y las del parasitoide adulto (BLACK *et al.*, 1992). Esta posibilidad se ha ensayado en el presente trabajo para la detección de *Encarsia* spp. y *Eretmocerus* spp.

MATERIAL Y METODOS

Origen de las poblaciones

Las muestras utilizadas proceden de colectas de campo realizadas en la zona costera de Murcia y Valencia sobre distintos cultivos y en distintos momentos entre noviembre de 1992 y septiembre de 1993 (Cuadro 1). Se emplea también una muestra de *B. tabaci* sobre *Poinsettia* procedente de Tenerife, y facilitada por el Dr. A. Carnero. Los individuos en estado de larvas, pupas y adultos, fueron congelados y conservados a -20° C hasta su utilización.

Cuadro 1.—Poblaciones de *Bemisia tabaci* y *Trialeurodes vaporariorum* utilizadas en el presente estudio

Especie	Hospedante	Localidad
1. <i>B. tabaci</i>	Tomate	Mazarrón
2. <i>B. tabaci</i>	<i>Gerbera</i>	Torrepacheco
3. <i>B. tabaci</i>	<i>Solanum muricatum</i>	Torrepacheco
4. <i>B. tabaci</i>	Calabaza	Torrepacheco
5. <i>B. tabaci</i>	Berenjena	Torrepacheco
6. <i>B. tabaci</i>	<i>Solanum muricatum</i>	Torrepacheco
7. <i>B. tabaci</i>	Tomate	Torrepacheco
8. <i>B. tabaci</i>	<i>Poinsettia</i>	Tenerife
9. <i>T. vaporariorum</i>	Tomate	Torrepacheco
11. <i>T. vaporariorum</i>	<i>Lantana</i>	Cartagena
12. <i>T. vaporariorum</i>	<i>Lantana</i>	Mazarrón
13. <i>T. vaporariorum</i>	<i>Nicotiana glauca</i>	Cartagena
14. <i>T. vaporariorum</i>	Tomate	Mazarrón
15. <i>T. vaporariorum</i>	<i>Lantana</i>	Mazarrón
16. <i>T. vaporariorum</i>	Melón	Mazarrón
17. <i>T. vaporariorum</i>	Tomate	Valencia
18. <i>T. vaporariorum</i> y <i>Encarsia</i>	<i>Nicotiana glauca</i>	Torrepacheco
19. <i>B. tabaci</i> y <i>Eretmocerus</i>	Tomate	Aguilas

Diseño experimental

Para las reacciones cuyo objetivo es conocer la variabilidad intrapoblacional se ha empleado el ADN extraído individualmente de cada insecto de la misma población. Para determinar la variabilidad intraespecífica e interespecífica se ha empleado un ADN de población obtenido a partir de la mezcla de un mismo volumen de ADN individual de cada uno de los individuos de la muestra de población.

Para la identificación de parasitoides, se han realizado extracciones de ADN de: a) pupas de *B. tabaci* parasitadas por *Eretmocerus* sp. que presentaban ojos y rudimentos alares oscuros, y los puntitos rojos de las 2 mandíbulas y 3 ocelos; b) pupas de *T. vaporariorum* parasitadas por *Encarsia* sp. de aspecto más o menos oscuro; y c) de los parasitoides adultos obtenidos de la evolución de muestras en laboratorio que, previamente a la extracción, se identificaron hasta el nivel de género, observándose en el género *Encarsia* la existencia de 3 especies distintas.

Todas las reacciones se repitieron al menos tres veces.

Extracción del ADN

Se empleó un método descrito anteriormente para áfidos (CENIS *et al.*, 1993). Brevemente, el método consiste en introducir un solo individuo, bien en estado de larva, pupa o adulto en un tubo Eppendorf de 0,5 ml, añadir 50 µl de tampón de extracción (200mM Tris-HCl pH 8,5; 250 mM NaCl; 25 mM EDTA; 0,5 % SDS) y machacar el insecto con una punta de micropipeta. A continuación se añaden 25 µl de Acetato de Sodio 3M pH 5,2 y se incuban los tubos a -20° C durante 20 minutos. Los tubos son centrifugados durante 10 minutos a 13.000 r.p.m. y el sobrenadante, que contiene los ácidos nucleicos, se transfiere a un tubo nuevo, precipitándolos a continuación

por la adición de un volumen de isopropanol y reposo a temperatura ambiente durante al menos 30 minutos. Tras 30 minutos de centrifugación a 13.000 rpm. se elimina el sobrenadante, se secan los tubos bien al aire o en vacío y se resuspende el pellet de ADN en 25 µl de tampón TE pH 8. Se almacena a 4° C para su uso frecuente o a -20° C para su almacenamiento a largo plazo.

Reacciones RAPD-PCR

Los cebadores utilizados en las distintas reacciones fueron oligonucleótidos de 10 bases de longitud y secuencia arbitraria suministrados por Operon Technologies (Alameda, CA, EE.UU.). Se utilizó el cebador OPA-01 del kit A, y los OPB-01 al OPB-15 del kit B. Las reacciones fueron realizadas en 25 µl de mezcla de reacción conteniendo 2 µl de la dilución final de la extracción de ADN, 1 unidad de ADN polimerasa Replitherm (Epicentre, Madison, WI, EE.UU.), 0,2 mM dNTPS, 0,1 % Tritón X-100, 15 ng de cebador y 1X del tampón de reacción suministrado por el fabricante de la enzima pero con la concentración de Cl⁻ incrementada a 50 mM y con la de Cl²Mg incrementada hasta 2,5 mM. La mezcla de reacción se cubrió con una gota de aceite mineral. La reacción se realizó durante 35 ciclos en un termociclador Perkin-Elmer 9600 en las siguientes condiciones: desnaturalización a 94° C durante un minuto, anillamiento a 34° C durante un minuto y extensión a 72° C durante un minuto. Al finalizar la amplificación, la mitad del producto de reacción se extrajo de cada tubo, se mezcló con tampón de carga (40 % sacarosa, 0,25 % azul de bromofenol) y se cargó en un gel de 1,4 % de agarosa. Tras una electroforesis a 5 V/cm durante 90 minutos en tampón TBE, las bandas de ADN se visualizaron mediante tinción del gel en una solución de 0,5 µg/ml de bromuro de etidio y observación en transiluminador de luz ultravioleta.

RESULTADOS

Variación intrapoblacional

Se han empleado los cebadores OPA-01 y OPB-11 para el estudio de la variabilidad de algunas de las poblaciones utilizadas en este trabajo. El conjunto de bandas obtenido con cada uno de los cebadores, revela la existencia de un bajo nivel de variabilidad. En el ejemplo de la Figura 1, si sólo se consideran las bandas que aparecen de forma más intensa, que son las que se han mostrado reproducibles en otras reacciones, se observa que todos los individuos de la muestra de población generan un patrón de bandas muy similar. Las bandas que presentan menos intensidad son más variables, pero son poco reproducibles y por tanto se han ignorado.

Variación intraespecífica

La comparación de los productos de amplificación del ADN de población, con los 15 primeros cebadores del set B de Operon Technologies, muestra diferencias muy pequeñas entre poblaciones de la misma especie, tanto en *T. vaporariorum* como en las

poblaciones de *B. tabaci* de Murcia (Figura 2). La muestra de *B. tabaci* procedente de Tenerife, se ha comparado con alguna de las muestras de Murcia, para lo cual se han empleado los cebadores OPB-7, OPB-10 y OPB-14. Todos ellos han mostrado diferencias (Figura 3). Con OPB-7, en las poblaciones de Murcia aparecen dos bandas muy próximas de 680 y 620 pares de bases (pdb), mientras que en la de Canarias únicamente aparece la de 680 pdb. Con OPB-10 es en la población de Tenerife donde aparece una doble banda de 800 y 770 pdb, mientras que en las de Murcia sólo aparece la de 800 pdb. Con OPB-14 (no mostrada) en la muestra de Tenerife no aparece una de las bandas diagnóstico de 640 pdb que muestran las de Murcia.

Variación interespecífica

Con casi todos los cebadores empleados existe una gran diferencia entre las bandas generadas por ambas especies, siendo muy pocas las comunes (Figuras 2 y 3). Este hecho revela una significativa divergencia genética entre ambas especies, siendo fácil su identificación por este medio.

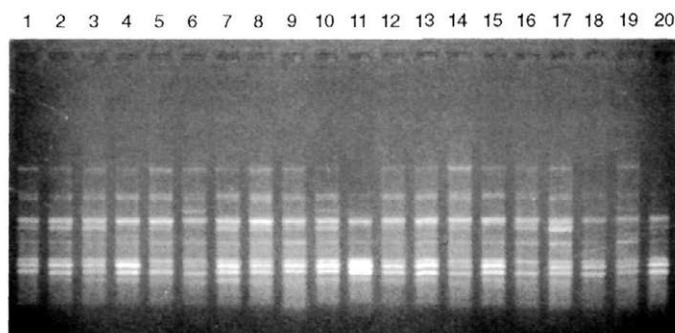


Fig. 1.—Variación intrapoblacional. Cada carril corresponde a la amplificación con el cebador OPA-11, del ADN individual de adultos de *T. vaporariorum* de una misma población.

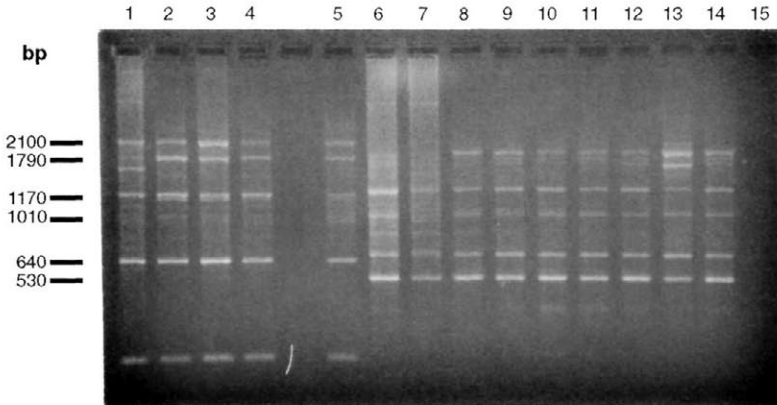


Fig. 2.—Variación intra e interespecífica de *B. tabaci* y *T. vaporariorum*. Amplificación obtenida con el cebador OPB-14 de 5 poblaciones de *B. tabaci* (Carriles 1-5), y 9 poblaciones de *T. vaporariorum* (Carriles 6-14), de la zona de Murcia. Carril 15 testigo sin ADN.

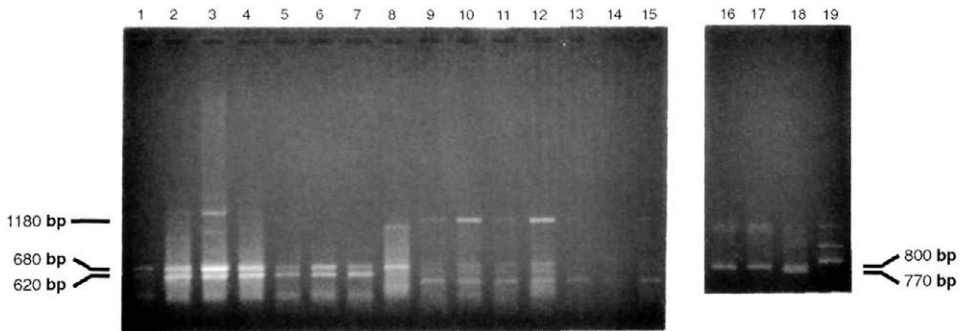


Fig. 3.—Variación intra e interespecífica de *B. tabaci* y *T. vaporariorum*. Amplificación obtenida con OPB-7 (Carriles 1-15) y con OPB-10 (Carriles 16-19). Carriles 1-7 y 16, 17, poblaciones de *B. tabaci* de Murcia. Carriles 8 y 18, población de *B. tabaci* de Tenerife. Carriles 9-15 y 19, poblaciones de *T. vaporariorum* de Murcia.

Detección e identificación de parasitoides

Los resultados de las reacciones (Figuras 4 y 5) muestran la validez del sistema de extracción de ADN para insectos más pequeños que las moscas blancas. Por otro lado, con el cebador OPB-14 se han obtenido importantes diferencias entre las

bandas generadas por los individuos de *Encarsia* de cada una de las especies detectadas al microscopio. En la Fig. 5 se aprecia cómo las bandas características de los individuos de *Eretmocerus* adultos estudiados, coinciden con bandas de pupas de *B. tabaci* parasitadas, y no presentes en las pupas no parasitadas. Ello permite por tanto su detec-

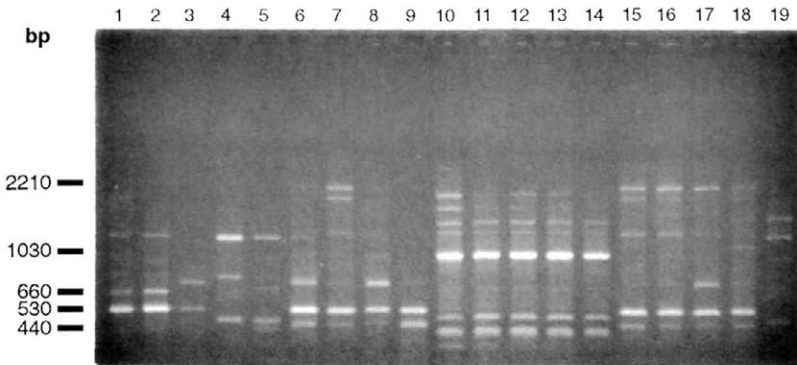


Fig. 4.—Detección de parasitoides. Productos de amplificación obtenidos con el cebador OPB-14 a partir del ADN individual de: Carril 1, *T. vaporariorum* adulto. Carril 2, *T. vaporariorum* pupa. Carriles 3-9, *T. vaporariorum* pupas parasitadas. Carriles 10-14, adultos de *Encarsia* especie 1. Carriles 15-18, adultos de *Encarsia* especie 2. Carril 19, adultos de *Encarsia* especie 3.

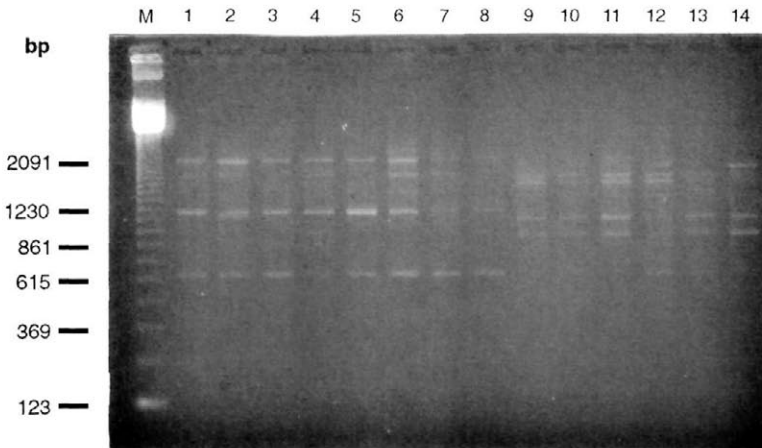


Fig. 5.—Detección de parasitoides. Productos de amplificación obtenidos con el cebador OPB-14 a partir del ADN individual de: Carriles 1 y 2: Adultos machos de *B. tabaci*. Carriles 3 y 4: Adultos hembras de *B. tabaci*. Carriles 5-8: Pupas de *B. tabaci*. Carriles 9-11: Pupas parasitadas de *B. tabaci*. Carriles 12-14: Adultos de *Eretmocerus* spp. Carril M: marcador de tamaño de bandas.

ción e identificación antes de su emergencia. Son pocos los casos donde aparecen entremezcladas las bandas del huésped, presumiblemente debido a que las pupas parasitadas utilizadas contenían al parasitoide en un avanzado estado de desarrollo con la consiguiente degradación de las células del huésped.

DISCUSION

Los datos presentados en este trabajo, ponen de manifiesto que la técnica RAPD-PCR es aplicable para el estudio de varios aspectos de la biología de las moscas blancas. Puede utilizarse para la detección de variabilidad dentro de una población, lo que a su vez permitiría testar hipótesis acerca de las pautas de selección y migración de los insectos. Sin embargo, esta aplicación está algo limitada por el hecho de que no se dispone por el momento de un modelo genético de los datos de RAPDs, por lo que no se puede expresar la variabilidad observada en términos de diversidad genética.

Es posible distinguir entre poblaciones de una especie. Ello queda demostrado por las diferencias entre la población de *B. tabaci* procedente de Tenerife y las procedentes de Murcia. Trabajos precedentes han mostrado la utilidad de la técnica en la distinción de biotipos. PERRING *et al.*, (1993), encuentran pautas de bandas RAPD muy diferentes entre una población de biotipo A y biotipo B, y utilizan este hecho como un criterio adicional para corroborar su hipótesis de que ambos biotipos son especies distintas. Sin embargo, en el presente trabajo no se dispuso de biotipos caracterizados, por lo que no se puede extraer ninguna conclusión de las diferencias observadas. No se puede determinar si estas poblaciones corresponden a diferentes biotipos, dado que ello requeriría de un experimento específico. Para la separación de biotipos, también se ha utilizado con éxito la variación electroforética de esterasas (BEDFORD *et al.*, 1993), y los

resultados obtenidos son consistentes con los obtenidos mediante RAPDs. Sin embargo, el análisis de RAPDs permite en principio una mayor resolución, dado que el número de loci que se pueden muestrear es prácticamente ilimitado, frente al relativamente reducido número de sistemas enzimáticos disponibles. Por otra parte, la dificultad operativa de ambos métodos es muy similar.

Es posible distinguir con facilidad el grupo de poblaciones de *B. tabaci* del de *T. vaporariorum*, con cualquiera de los cebadores utilizados, y en cualquiera de sus estados de desarrollo. Sin embargo, no puede llegar a establecerse por el momento una clave taxonómica con los datos obtenidos, pues sería necesario examinar más poblaciones y caracterizar su variabilidad. En el momento actual, la técnica RAPD es útil para determinar la mayor o menor similitud entre unas poblaciones y otras, pero es necesario disponer de unas poblaciones de referencia, correctamente clasificadas por los métodos morfométricos usuales.

Es posible identificar la especie de un parasitoide todavía en el interior de la pupa, mediante una reacción RAPD de la pupa parasitada y posterior comparación de las bandas obtenidas con las correspondientes a un parasitoide adulto y a una pupa no parasitada. Cuando el desarrollo del parasitoide está avanzado, todas las bandas de ADN amplificado de la pupa parasitada, corresponden al parasitoide. Este concepto no es nuevo, dado que WOOL *et al.* (1984), son capaces de distinguir pupas de *B. tabaci* parasitadas mediante las diferentes bandas de esterasas obtenidas con material parasitado. Sin embargo, los RAPD permiten una mayor resolución en este aspecto, pues mientras que en el trabajo citado no era posible distinguir *Encarsia* de *Eretmocerus*, en el presente trabajo se distinguen hasta tres especies distintas de *Encarsia*.

La reproducibilidad de las bandas de ADN obtenidas no es perfecta. Algunas bandas débilmente teñidas aparecen de forma errática, debido a variables no contro-

lables de la reacción, y por tanto han de despreciarse. Por tanto, las bandas teñidas con más intensidad son las que han de considerarse de forma preferente. En cualquier caso, es imperativo realizar varias repeticiones de la misma reacción para verificar cuáles son las bandas reproducibles.

AGRADECIMIENTOS

Nuestro agradecimiento a D. A. Carnero por facilitarnos una población de *B. tabaci* de su colección y a D. Federico García Jiménez, por su ayuda en la recolección e identificación de los insectos.

ABSTRACT

GUIRAO, P.; BEITIA, F. y CENIS, J. L., 1994: Aplicación de la técnica RAPD-PCR to the taxonomy of whiteflies (*Homoptera, Aleyrodidae*). *Bol. San. Veg. Plagas*, 20(3): 757-764.

The RAPD-PCR technique is based on the enzymatic amplification of DNA fragments, using primers of arbitrary sequence which hybridize in loci randomly distributed throughout the genome. This reveals polymorphisms which are useful as genetic and taxonomic markers. With the objective of evaluating the usefulness of the technique in the taxonomy of whiteflies, several populations of *Bemisia tabaci* and *Trialeurodes vaporariorum* from the mediterranean coast and Canary Islands were studied. The two species were easily distinguishable in all the stages of their life cycle. The different populations of each species were highly similar with the exception of the *B. tabaci* population from Canary Islands, which was easily distinguishable from the peninsular species. The technique was useful also for the detection and identification of parasitoids inside the parasitized nymphs. By comparing the pattern of amplified bands from parasitized and non parasitized nymphs, and adult parasitoids, it was possible to identify three *Encarsia* species and one *Eretmocerus* species before their emergence from the whitefly nymphs.

Key words: *Bemisia tabaci*, *Trialeurodes vaporariorum*, *Encarsia* spp., *Eretmocerus* spp., Polymerase Chain Reaction.

REFERENCIAS

- BALLINGER-CRABTREE, M. E.; BLACK, W. C. y MILLER, B. R., 1992: Use of genetic polymorphisms detected by RAPD-PCR for differentiation and identification of *Aedes aegypti* subspecies and populations. *Am. J. Tropical Med. Hyg.*, 47: 893-901.
- BEDFORD, I. D.; BRIDDON, R. W.; MARKHAM, P. G.; BROWN, J. K. y ROSELL, R. C., 1993: A new species of *Bemisia* or biotype of *Bemisia tabaci* (Genn.) as a future pest of European agriculture. Proceedings BCPC/AAB International Symposium on Plant Health and the European Single Market, Reading, Reino Unido.
- BLACK, W. C.; DUTEAU, N. M.; PUTERKA, G. J.; NICHOLS, J. R. y PETTORINI, J. M., 1992: Use of the RAPD-PCR to detect DNA polymorphisms in aphids. *Bull. Entomol. Res.*, 82(2): 151-159.
- CARNERO, A. *et al.*, 1988: Nuevas plagas de los cultivos Canarios. III Congreso Nacional de la SECH. Puerto de la Cruz (Tenerife).
- CENIS, J. L.; PÉREZ, P. y FERERES, A., 1993: Identificación of various aphid (Homoptera: Aphididae) species and clones by random amplified polymorphic DNA (RAPD-PCR). *Ann. Entomol. Soc. Am.*, 86(5): 545-550.
- COHEN, S.; DUFFUS, J. E. y LIU, H. Y., 1992: A new *Bemisia tabaci* biotype in the southwestern United States and its role in silverleaf of squash and transmission of lettuce infectious yellows virus. *Phytopathology*, 82: 86-90.
- GÓMEZ-MENOR, J., 1944: Aleirodidos de interés agrícola. *Bol. Patol. Veg. Ent. Agric.*, 13: 161-198.
- KAMBHAPATI, S.; BLACK, W. C. y RAI, K. S., 1992: A RAPD-PCR based method for the identification and differentiation of mosquito species and populations: techniques and statistical analyses. *J. Med. Entomol.*, (en prensa).
- PERRING, T. M.; COOPER, A. D.; RODRÍGUEZ, R. J.; FARRAR, C. A. y BELLOWS, T. S., 1993: Identification of a whitefly species by genomic and behavioral studies. *Science*, 259: 74-77.
- WILLIAMS, J. G. K.; KUBELIK, A. R.; LIVAK, K. J.; RAFALSKI, J. A. y TINGEY, S. V., 1990: DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nuc. Acids Res.*, 18(22): 6.531-6.535.
- WOOL, D.; GERLING, D. y COHEN, I., 1984: Electrophoretic detection of two endoparasite species, *Encarsia lutea* and *Eretmocerus mundus* in the whitefly, *Bemisia tabaci* (Genn.) (Hom., Aleyrodidae).