

**IDENTIFICAÇÃO DE *Bemisia tuberculata* EM MANDIOCA (*Manihot esculenta*) PELA ANÁLISE DO GENE MITOCONDRIAL (CITOCROMO OXIDASE I)**

*Bemisia tuberculata* identification on cassava (*Manihot esculenta*) by the analysis of the mitochondrial gene (Cytochrome oxidase, mtCOI)

Julio Massaharu MARUBAYASHI<sup>1</sup>

Fernanda Martinez PELEGRINOTTI<sup>2</sup>

Fausto Zafalon FERREIRA<sup>3</sup>

Valdir Atsushi YUKI<sup>4</sup>

Tatiana MITUTI<sup>5</sup>

Renate Krause SAKATE<sup>6</sup>

Marcelo Agenor PAVAN<sup>7</sup>.

**RESUMO**

A mandioca apresenta um papel importante na alimentação dos povos que habitam as regiões tropicais. Recentemente foram observadas altas populações de insetos conhecidos como mosca-branca e que podem ocasionar perdas decorrentes da sucção da seiva e indução de fumagina. O objetivo do experimento foi identificar espécimes de mosca branca coletadas em mandioca no município de Presidente Prudente, SP. Para a identificação utilizou-se a análise do gene mitocondrial do citochroma oxidase I (mtCOI). Este gene foi amplificado pela reação de polimerização em cadeia, analisado por restrição enzimática com as enzimas *Tru9I* e *TaqI*, e para confirmação da espécie foi realizado seqüenciamento do gene. A análise dos resultados permitiu identificar *Bemisia tuberculata* em mandioca. Esta ferramenta mostrou-se bastante útil na identificação desta espécie de mosca branca.

**Palavras-chave:** Mosca-branca, PCR, RFLP

**SUMMARY**

Cassava is considered an important food in the tropical regions. Recently high insect population of whiteflies was found on cassava and they can cause losses by sap sucking and induction of sooty mold. The objective of this work was to identify the whitefly species found on cassava in Presidente

<sup>1</sup> Universidade Estadual Paulista "Júlio de mesquita Filho" (UNESP)- FCA – Departamento de Produção vegetal/ Setor de Defesa Fitossanitária-Virologia vegetal, Rua José Barbosa de Barros, 1780-Lageado 18610-307- Botucatu-SP-Brasil- Caixa Postal 237. E-mail:Julio@fca.unesp.br

<sup>2</sup>UNESP. Email:fmpelegrinotti@fca.unesp.br

<sup>3</sup>UNESP. E-mail: fzafalon@fca.unesp.br

<sup>4</sup>AC- Departamento de Fitossanidade. E-mail:vayuki@iac.sp.gov.br

<sup>5</sup>UNESP.E-mail: mituti@fca.unesp.br

<sup>6</sup>UNESP.E-mail:renatekrause@fca.unesp.br

<sup>7</sup>UNESP.E-mail: mapavan@fca.unesp.br

Prudente, SP region. The cytochrome oxidase I gene (mtCOI) was analyzed by polymerase chain reaction, enzyme restriction with *Tru9I* and *TaqI* and by sequencing the DNA. The results permitted the identification of *Bemisia tuberculata* in cassava, and the technique can be considered efficient for the diagnosis of this specie of whitefly.

**Keywords:** Whitefly, PCR, RFLP

## INTRODUÇÃO

A mandioca é originária nas regiões neotropicais da América do Sul e o Brasil é o principal centro de diversificação (ROGGERS e APPEN, 1973 citado por OLIVEIRA e LIMA, 2006). O cultivo dessa cultura é realizado em todas as regiões do Brasil desde Roraima até o Rio Grande do Sul, sendo a mandioca empregada na alimentação humana, animal e na industrialização para processamento (MOREIRA et al., 2006)

Dentre os fatores limitantes na cultura estão as pragas de expressão econômica e quarentenária no sistema produtivo que podem ameaçar e inviabilizar a sua cadeia produtiva. Dentre elas estão as espécies de moscas-brancas, que vêm se dispersando e causando enormes danos às produções (OLIVEIRA e LIMA, 2006).

Moscas-brancas são insetos pertencentes à Ordem Hemiptera, Subordem Sternorrhyncha, superfamília Aleyrodoidea. No Brasil, foram descritas 72 espécies de moscas-brancas, sendo 15 do gênero de *Aleyrodinae* e outras 54 espécies pertencentes a 12 gêneros de *Aleurodicinae* (OLIVEIRA et al., 2005).

No Brasil a mosca branca é a causadora de grandes prejuízos, tanto diretos pela sucção de seiva, excreção de

honeydew e ação fitotóxica, como também indiretos, pela transmissão dos begomovírus, no caso da *Bemisia tabaci*. O biótipo B de *B. tabaci* é de distribuição mundial e foi introduzido no Brasil no começo de 1990, provavelmente pelo comércio de plantas ornamentais (LOURENÇÃO e NAGAI, 1994). Este biótipo está presente em todos os estados do Brasil, causando perdas em severas em diferentes culturas (LIMA et al., 2002).

No Brasil ainda não há relatos de *B. tabaci* em mandioca (COSTA e RUSSEL, 1975), ao contrário do continente africano onde tem causado sérios danos na produção pela transmissão do *African cassava mosaic virus* – ACMV (FAUQUET e FARGETTE, 1990)..

As espécies de mosca-branca mais comuns na cultura da mandioca são: *Bemisia tuberculata*, *Trialeurodes variabilis*, *Aleurothrixus aepim* e *Aleurotrachelus socialis*. Elas causam injúrias às culturas pela sucção da seiva. Em períodos prolongados e altas populações, provocam perdas no rendimento e afetam a qualidade da farinha produzida que adquire sabor amargo (SILVA et al., 2001 citado por OLIVEIRA e LIMA, 2006).

As moscas brancas são insetos morfológicamente indistinguíveis e de difícil identificação. Espécies aparentemente

inócuas têm recebido intenso tratamento químico, levando ao surgimento de espécimes resistentes aos inseticidas (OLIVEIRA e LIMA, 2006). Este caso já foi verificado para *B. tuberculata* em mandioca (LIMA et al., 2002).

A *B. tabaci* apresenta alta variabilidade biológica intra-específica e genética, e pode ser considerada como um complexo espécie (BOSCO et al., 2006). Técnicas moleculares como RAPD-PCR, PCR-RFLP e seqüenciamento tem auxiliado em estudos filogenéticos das populações de *B. tabaci* (BROWN, 2000; BOSCO et al., 2006; RABELLO et al., 2008). Um dos genes muito utilizados para caracterização de biótipos é o gene mitocondrial do cytochroma oxidase I (mtCOI) (DINSDALE et al., 2010).

Bosco et al., (2006) também desenvolveu um método que se baseia na amplificação do gene mtCOI seguido de clivagem enzimática com as enzimas *Tru9I* e *TaqI* para discriminação de biótipos de *B. tabaci*.

A identificação correta de insetos pragas ou vetores de vírus é um pré-requisito para o manejo efetivo e redução de danos em culturas agrícolas (BROWN, 2000). O conhecimento da variação genética dentro de populações de mosca-branca é necessário para o eficiente controle deste inseto (LIMA et al., 2002; RABELLO et al., 2008). Deste modo, este trabalho teve como intuito identificar a espécie de mosca branca encontrada em mandioca em Presidente Prudente, no Estado de São Paulo.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Coleta das populações de *B. tabaci* e preservação dos espécimes

Foram coletados espécimes de mosca branca em mandioca na região de Presidente Prudente. Estas amostras foram coletadas com auxílio de um sugador manual, preservadas imediatamente em etanol 95% e armazenado a -20°C, até o momento do processamento.

A coleta da espécime de mosca-branca em mandioca foi georeferenciada em S 22° 11 865 / Wo 51° 23 471 e altitude de 434m.

### Extração de DNA total

A partir do material armazenado, um indivíduo adulto de mosca branca foi macerado em 30 µl de tampão de extração (50 mM Tris-HCl, pH 7,0, 100 mM NaCl, 10 mM EDTA, 1% SDS). Cento e setenta microlitros do tampão foram adicionados ao macerado, além de 100 µl de fenol saturado em TE e 100 µl de clorofórmio: álcool isoamílico (24:1) e levados ao vortex por três minutos. Após centrifugação a 12.000 rpm por três minutos, ao sobrenadante (180 µl) foi acrescido 18 µl (0.1 volume) de acetato de sódio 3M (pH 5.2) e 540 µl (3 volumes) de etanol. O ácido nucléico foi precipitado por centrifugação (14.000 rpm, 10 minutos) a 4°C, após incubação por 20 minutos a -80°C. Os pellets foram lavados em etanol 80% e ressuspensos em 30 µl de água destilada.

Foram analisados cinco adultos por populações de mosca branca coletados.

### Análise do gene mtCOI

A porção do gene para a citocromo oxidase (mtCOI) foi amplificada com os oligonucleotídeos MA482-FW (5'-TTGATTTTTTGGTCATCCAGAAGT-3') e MA 483-RV (5'-TCCAATGCACTAATCTGCCATATTA-3') descritos por Frohlich et al., (1999). A reação de PCR foi realizada em volume final de 50 µl (concentração final MgCl<sub>2</sub> 50mM, dNTP 2,5mM, oligonucleotídeos MA482-FW e MA483-RVa 1µM) utilizando-se 0.5 unidades de Taq polymerase. A reação consistiu em 5' a 94°C (um ciclo), 30" a 94°C, 45" a 45°C e 1' a 72°C (35 ciclos) com uma extensão final de 10' a 72°C. A presença de amplicons foi visualizada em gel de eletroforese a 1% corado com brometo de etídeo. O fragmento amplificado possui em torno de 800 bases.

Cinco µl de cada produto de PCR amplificado foi clivado com a enzima *TaqI* e *Tru 9I* a 65°C por 2 h utilizando-se o tampão indicado e uma unidade de enzima em volume final de 15 µl. Os padrões foram comparados aos biótipos descritos por Bosco et al., (2006).

O fragmento de DNA foi seqüenciado e comparado com outras seqüências de moscas-brancas depositadas no GenBank, utilizando-se os programas Blast n (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>) e Clustal

W (THOMPSON et al., 1994). A análise filogenética foi realizada com o programa MEGA versão 4.0 (KUMAR et al., 2004), utilizando o método de "Neighbor-Joining", com valor de "bootstrap" 2000.

### RESULTADOS E DISCUSSÃO

Espécimes de mosca branca coletadas a partir de mandioca tiveram o gene mtCOI eficientemente amplificado (Figura 1A). Pela clivagem com a enzima foi observado um padrão distinto ao de *B. tabaci* biótipo B (Figura 1. B), indicando ocorrência de outra espécie nesta cultura (Figura 1C). Pela clivagem com a enzima *Tru9I* não foi verificada diferença no perfil eletroforético (dados não mostrados).

O seqüenciamento do gene mtCOI de moscas brancas coletadas em mandioca relevou identidade de nucleotídeos de 99% com *Bemisia tuberculata* (Tabela 1), indicando a presença desta espécie em mandioca.

Pode-se observar na árvore filogenética (Figura 2) que o espécime encontrado em mandioca está agrupado no mesmo ramo filogenético que a *B. tuberculata* (número de acesso AY057220).

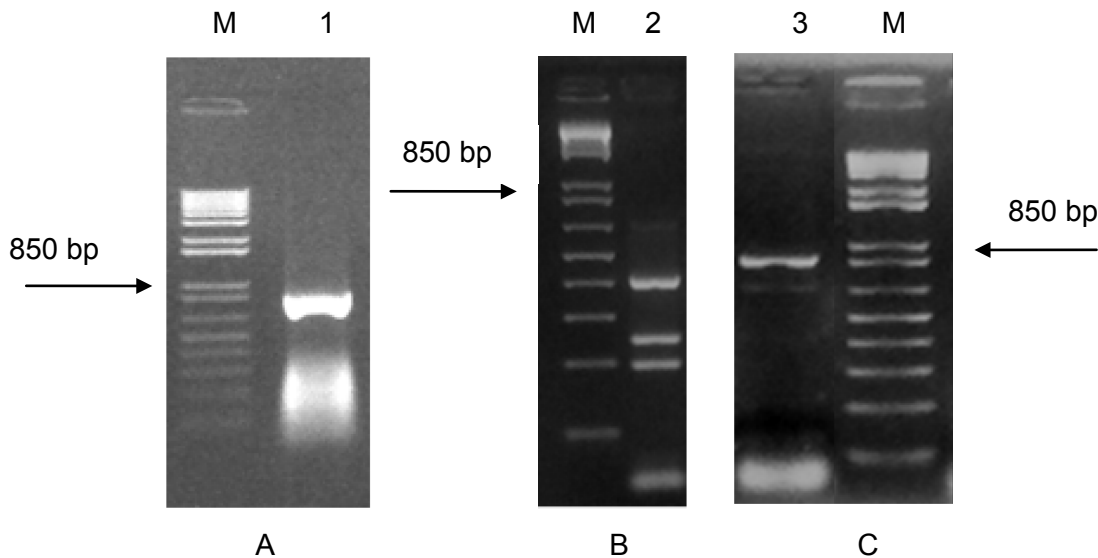


Figura 1: 1.A) Padrão eletroforético do produto de PCR amplificado pelos oligonucleotídeos MA482-FW / MA 483-RV (FROHLICH et al.,1999) para detecção do gene mtCOI. M -marcador 1Kb Plus DNA Ladder, 1.A) Amostra de mandioca de Presidente Prudente 1.B) Padrão de restrição enzimática com *Taq1* para *B. tabaci*; 1.C) Padrão de restrição enzimática com *Taq1* para o espécime coletado de mandioca de Presidente Prudente.

Tabela 1. Porcentagem de identidade entre as seqüências de nucleotídeos (nt) e aminoácidos (aa) do gene mtCOI, obtido através do Clustal W. Mandioca = Mosca branca proveniente de Presidente Prudente; *B. tuberculata* = AY057220; *B. tabaci* = AJ510075.

nt	aa	Mandioca	<i>B. tuberculata</i>	<i>B. tabaci</i>
Mandioca			97	91
<i>B. tuberculata</i>	99			88
<i>B. tabaci</i>	84	83		

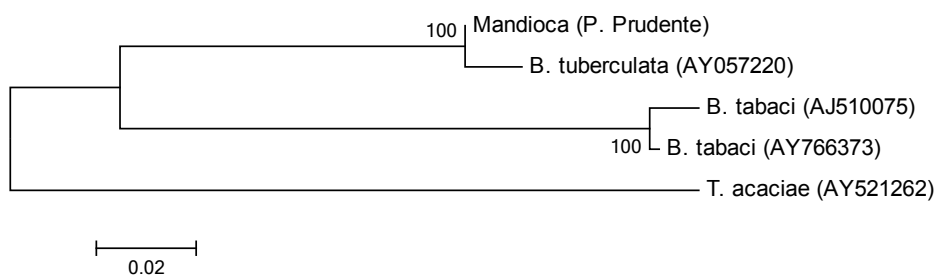


Figura 2: Árvore filogenética para espécimes de mosca branca utilizando-se a sequência do gene mitocondrial (mtCOI). Valor de Bootstrap 2000, programa Mega Versão 4.0, utilizando-se o método de Neighbor-joining.

As moscas-brancas são insetos de difícil identificação dada sua morfologia muito parecida. Por PCR-RFLP verificou-se que o espécime não se tratava de *B. tabaci* uma

vez que não possuía o mesmo padrão descrito por (BOSCO et al., 2006). Deste modo, o sequenciamento do gene mtCOI se

mostrou uma ferramenta bastante útil para identificação da espécie de mosca branca.

As moscas-brancas são consideradas uma das principais pragas em diversas culturas como leguminosas, hortaliças, frutíferas e ornamentais, a correta identificação da espécie para cada caso, é importante para diminuir as quantidades de produtos químicos, evitando a eliminação de inimigos naturais O gene mtCOI vem sendo utilizado para o agrupamento de populações de *B. tabaci* (DINSDALE et al.; 2010) e neste caso foi eficientemente utilizado para identificação de *B. tuberculata*.

## CONCLUSÃO

O seqüenciamento do gene mtCOI permitiu a identificação de *B. tuberculata* em mandioca.

## REFERÊNCIAS

- BOSCO, D.; LORIA, A.; SARTOR, C.; CENIS, J. L. PCR-RFLP. Identification of *Bemisia tabaci* Biotypes in the Mediterranean Basin. **Phytoparasitica**, v. 34, n. 3, p. 243-251, 2006.
- BROWN, J. K. Molecular markers for the identification and global tracking of whitefly vector-begomovirus complexes. **Virus Research**, v. 71, p. 233-260, 2000.
- COSTA, A. S.; RUSSELL, L. M. Failure of *Bemisia tabaci* to breed on cassava plants in Brazil (Homoptera: Aleyrodidae). **Ciência e Cultura São Paulo**, v. 27, p. 388-390, 1975.
- DINSDALE, A. Refined Global Analysis of *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Sternorrhyncha: Aleyrodoidea: Aleyrodidae) Mitochondrial Cytochrome Oxidase I to Identify Species Level Genetic Boundaries. **Annals of the Entomological Society of America**. v. 103 n. 2, p. 197-208, 2010.
- FAUQUET, C. AND FARGETTE, D. African cassava mosaic virus: etiology, epidemiology and control. **Plant Disease**, v. 74, p. 404-411, 1990.
- FROHLICH, D.; TORRES-JEREZ, I.; BEDFORD, I. D.; MARKHAM, P.G.; BROWN J.K. A phylogeographic analysis of the *Bemisia tabaci* species complex based on mitochondrial DNA markers. **Molecular Ecology**, v. 8, p. 1593-1602, 1999.
- 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.; 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, p. 217-223, 2002.
- LORENÇÃO, A. L.; NAGAI, H. Surtos populacionais de Bemisia tabaci no Estado de São Paulo. v. 53, n. 1, p. 53-59, 1994.
- MOREIRA, M. A. B. **Alternativas para o Controle da Mosca-branca, Aleurothrixus aepim na Cultura da Mandioca em**

**Sergipe.** Embrapa Comunicado técnico, 56. ISSN 1678-1937 Aracaju, SE. 2006. p.4.

OLIVEIRA, M. R. V.; LIMA, L. H. C.; MARINHO, V. L. A.; BATISTA M. F.; AMÂNICO. E.; VILARINHO, K. R.; SILVA S. F.; FARIA, M. R. Moscas-brancas no Brasil e no Mundo: identificação e expressão econômica. In: OLIVEIRA, M. R. V.; FARIA, M. R. (Eds.). **Moscas-brancas (Hemiptera: Aleyrodidae)**. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, p. 5 – 87. ISBN 85-87697-32- 3. 2005.

OLIVEIRA, M. R. V.; LIMA L. H. C. **Moscas-brancas na cultura da mandioca no Brasil**. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. ISSN 0102 0110. Brasília. 2006. p.74.

RABELLO, A. R.; QUEIROZ, P. R.; SIMÕES, K. C. C.; HIRAGI, C.O.; LIMA, L. H. C.; OLIVEIRA, M. R. V.; MEHTA, A. Diversity analysis of *Bemisia tabaci* biotypes: RAPD, PCRRFLP and sequencing of the ITS1 rDNA region. **Genetics and Molecular Biology**, v. 31, n. 2, p. 585-590, 2008.

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**, v. 22, p. 4673-4680, 1994.