

IDENTIFICAÇÃO DE ESPÉCIES DE MOSCA-BRANCA EM BATATA-DOCE (*Ipomoea batatas* (L.) Lam.) PELA ANÁLISE DO GENE MITOCONDRIAL CITOCROMO OXIDASE I

Leonardo da Fonseca Barbosa^{1,2}; Julio Massaharu Marubayashi¹; Bruno Rossitto De Marchi¹; Gabriel Madoglio Favara¹; Luís Fernando Maranhão Watanabe¹; Maria Isabel Motta Hoffmann¹; Iraíldes Pereira de Assunção²; Gaus Silvestre de Andrade Lima²; Marcelo Agenor Pavan¹; Renate Krause-Sakate¹

1 Universidade Estadual Paulista “Júlio de mesquita Filho” (UNESP)- Faculdade de Ciências Agrônômicas (FCA), 18610-307, Botucatu-SP, Brasil. E-mail: agro.leofonseca@gmail.com; julio@fca.unesp.br; bruno_dmarchi@hotmail.com; mapavan@fca.unesp.br; renatekrause@fca.unesp.br

2 Universidade Federal de Alagoas (UFAL) – Centro de Ciências Agrárias (CECA), 57100-000, Maceió-AL, Brasil. E-mail: l_assuncao@hotmail.com; gausandrade@yahoo.com.br

1 RESUMO

As moscas-brancas são insetos polívoros que apresentam mais de 700 plantas hospedeiras, dentre as quais a batata-doce, *Ipomoea batatas*. A batata-doce é frequentemente infectada por fitovírus transmitidos por diferentes espécies de moscas-brancas. Este trabalho identificou espécimes de mosca-branca coletadas em *I. batatas* no Município de Maragogi, Estado de Alagoas. Para tanto foi utilizada a análise do gene mitocondrial citocromo oxidase I (mtCOI). Este gene foi amplificado pela reação de polimerização em cadeia e, para confirmação da espécie, foi realizado sequenciamento do gene. A análise dos resultados permitiu identificar as espécies de mosca-branca: *B. tabaci*, ‘Middle East-Asia Minor 1’ – MEAM 1 (Biótipo B) e *Trialeurodes vaporariorum* (Westwood). Além disso, foram realizadas análises para identificação de endossimbiontes secundários nestes insetos, onde foi observado que a espécie MEAM1 abriga os endossimbiontes secundários *Rickettsia* e *Hamiltonella*, enquanto que *T. vaporariorum* abriga o endossimbionte secundário *Arsenophonus*.

Palavras-chave: *Bemisia tabaci* MEAM 1; *Trialeurodes vaporariorum*; mtCOI gene; endossimbiontes.

IDENTIFICATION OF SPECIES OF WHITEFLY IN SWEET POTATO (*Ipomoea batatas* (L.) Lam.) BY THE ANALYSIS OF MITOCHONDRIAL GENE CYTOCHROME OXIDASE I

2 ABSTRACT

Whiteflies are polyphagous insects that have more than 700 host plants, among them the sweet potato, *Ipomoea batatas*. Roots of sweet potato are frequently infected by plant viruses transmitted by different species of whiteflies. This study identified specimens of whiteflies collected in the county of Maragogi, Alagoas State. For this purpose we used the analysis of the gene mitochondrial cytochrome oxidase I (mtCOI). The gene was amplified by polymerase chain reaction and then sequenced. The results allowed us to identify two different species of whiteflies, *B. tabaci*, 'Middle East-Asia Minor 1' – MEAM 1 (B biotype) and *Trialeurodes vaporariorum*. In addition, analysis for identification of secondary endosymbionts were held in these insects, where it was observed that the species MEAM 1 harbors the secondary endosymbionts *Rickettsia* and *Hamiltonella*, while *T. vaporariorum* harbors the secondary endosymbiont *Arsenophonus*.

Keywords: *Bemisia tabaci* MEAM 1; *Trialeurodes vaporariorum*; mtCOI gene; endosymbionts.

3 INTRODUÇÃO

Originária da América tropical a batata-doce (*Ipomoea batatas* L. Lam.) é uma hortaliça tuberosa da família Convolvulaceae muito popular e cultivada em todo território brasileiro. É uma planta rústica de ampla adaptação e de fácil cultivo (HUAMAN, 1992; MIRANDA et al., 1995).

A batata-doce é uma cultura em que geralmente os insetos não lhe causam grandes prejuízos devido a sua alta resistência. Contudo, alguns insetos-praga quando presentes em níveis populacionais elevados podem causar sérios danos na plantação (SILVA; LOPES, 1995).

A mosca-branca é um inseto cosmopolita, sugador de floema, e que vive predominantemente em plantas herbáceas, podendo causar danos diretos através da sua alimentação e, indiretos por ser vetora de vírus de plantas (JONES, 2003; DE BARRO et al., 2011). Estima-se que exista no mundo cerca de 1560 espécies de moscas-brancas distribuídas em 161 gêneros. Destas destacam-se: *Trialeurodes vaporariorum* (Westwood), e as espécies pertencentes ao complexo *Bemisia tabaci* (Gennadius) (VAN LENTEREN; NOLDUS, 1990; DE BARRO et al., 2011).

A mosca-branca, *Bemisia tabaci* Genn. (Hemiptera: Aleyrodidae), é uma das mais importantes pragas do século 20, sendo polífaga. Em adição aos danos diretamente causados pela sucção do floema e excreção de “honeydew”, que serve como substrato para infecções de fungos (Jones et al., 2008), as moscas-brancas são conhecidas principalmente como vetores de vírus do gênero *Begomovirus* (família *Geminiviridae*). Os vírus do gênero

Begomovirus são de grande impacto econômico para várias hortaliças e reconhecidos como os mais importantes vírus de plantas emergentes em regiões tropicais e sub-tropicais (BROWN, 2000).

Este inseto apresenta alta variabilidade biológica intra-específica e genética e, pode ser considerado como um complexo de espécies (BOSCO et al., 2006). O complexo *B. tabaci* é constituído de populações morfologicamente idênticas mas que exibem variabilidade biológica quanto aos hospedeiros preferencialmente colonizados, polimorfismo genético, fecundidade, composição de procariotas endosimbiontes e capacidade de transmissão das diferentes espécies de begomovírus (BROWN et al., 1995; FROHLICH et al., 1999).

Atualmente o complexo *B. tabaci* está dividido em 11 grupos genéticos contendo 36 espécies (DINSDALE et al., 2010; DE BARRO et al., 2011). Neste contexto o biótipo B altamente polífago e encontrado mundialmente pertence à espécie 'Middle East-Asia Minor 1'; o biótipo Q, predominantemente encontrado na região do Mediterrâneo, pertence à espécie 'Mediterranean' e, os diferentes biótipos encontrados no continente americano (A, C, D, F, *Jatropha*, N, R, *Sida*) pertencem à espécie 'New World' (DINSDALE et al., 2010; DE BARRO et al., 2011). Para classificação de moscas-brancas utilizando o sistema proposto por Dinsdale et al. (2010) e De Barro et al. (2011) realiza-se o seqüenciamento do gene mtCOI seguido de análise e comparação com as sequencias consensus descritas para as diferentes espécies, utilizando o critério de 3.5% de divergência de identidade de nucleotídeos para classificação entre as espécies e 11% de divergência para classificação nos diferentes grupos genéticos.

Deste modo, o objetivo principal deste trabalho foi analisar e identificar populações de mosca-branca coletadas em batata-doce no município de Maragogi, Estado de Alagoas.

4 MATERIAL E MÉTODOS

Foram coletados espécimes de mosca-branca em batata-doce na região de Maragogi, Estado de Alagoas. Estas amostras foram coletadas com auxílio de um sugador manual, preservadas imediatamente em etanol 90% e armazenadas a -20°C até o momento do processamento. A localidade da coleta foi georreferenciada em S 9° 2' 47,47"/ W 35° 14' 21,47" e altitude de 21 m.

Para a identificação molecular dos adultos de mosca-branca o DNA total de cada inseto foi extraído utilizando o protocolo Chelex 100, descrito por Walsh et al. (1991). O DNA foi usado na reação de PCR com primers específicos para *B. tabaci*, C1-J-2195 e L2-N-3014 (SIMON et al., 1994) e *T. vaporariorum*, T_{vap}F e W_{Frev} (SCOTT et al., 2007). O fragmento de DNA foi sequenciado comparado com sequências consensus de espécies do

complexo *B. tabaci* e comparado com outras sequências 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.

A presença de endosimbiontes na mosca-branca também foi determinada utilizando primers específicos para *Portiera aleyrodidarum* (MUYZER et al., 1996), *Rickettsia* 16S rDNA gene (GOTTLIEB et al., 2006), *Hamiltonella* 16S rDNA gene (ZCHORI-FEIN; BROWN, 2002), *Wolbachia* 16S rDNA gene (HEDDI et al., 1999), *Arsenophonus* 23S rDNA gene (THAO; BAUMANN, 2004), *Cardinium* 16S rDNA gene (WEEKS; BREEUWER, 2003), *Fritschea* 23S rDNA gene (EVERETT et al., 2005). PCR foi realizado tal como descrito por Chiel et al. 2007.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

As moscas-brancas são insetos de difícil identificação dada sua morfologia muito parecida. O critério estabelecido por Dinsdale et al. (2010) e De Barro et al. (2011) estabelece que as sequências do gene mtCOI devem ser analisadas com sequências consensus pré-definidas para cada grupo genético e espécies descritas. Para que sejam consideradas da mesma espécie as sequências mtCOI comparadas precisam ter porcentagens de identidade superiores a 96,5% com uma sequência consensus pré-estabelecida para as diferentes espécies (limiar de 3,5% de divergência). Utilizando-se este critério, a sequência mtCOI de batata-doce (*I. batatas*) apresentou identidade superior a 96,5% com a sequência consensus para a espécie MEAM 1, indicando tratar-se desta espécie. Além disto, pela análise filogenética (Figura 1) pode-se observar o agrupamento desta amostra com a sequência consensus mtCOI da espécie de *B. tabaci* MEAM1. Já as sequências de *T. vaporariorum* apresentaram cerca de 99% de identidade com outras sequências de *T. vaporariorum* e também agruparam com outras sequências de *T. vaporariorum*, conforme apresentado na Figura 1.

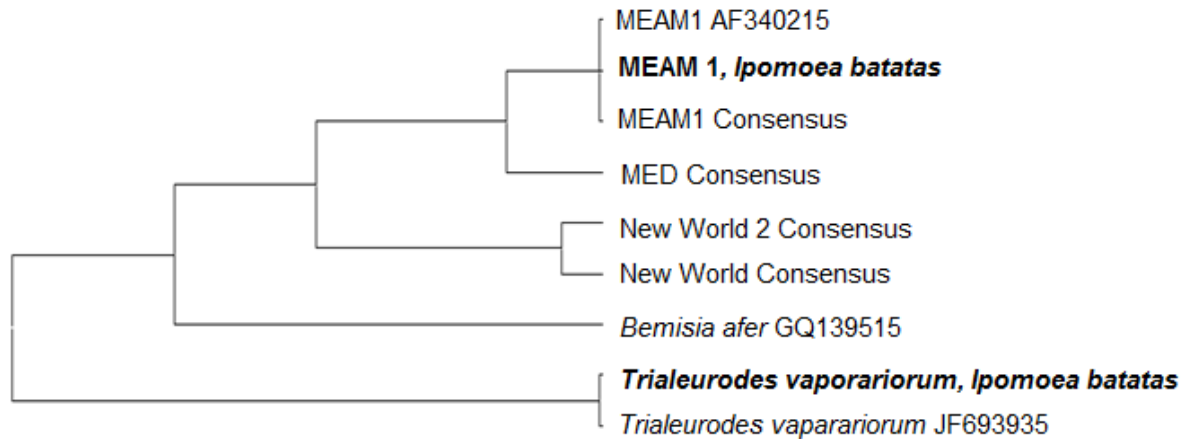


Figura 1. Árvore filogenética utilizando a sequência do gene mitocondrial (mtCOI) de espécies de *Bemisia tabaci* e *Trialeurodes vaporariorum* coletadas em batata-doce (*I. batatas*), sequência consensus para espécie MEAM1, New World e New World 2. Sequências retiradas do GenBank: MEAM1 AF340215, *Bemisia afer* GQ139515 e *Trialeurodes vaporariorum* JF693935. Valor de Bootstrap 2000, programa Mega Versão 5.0, utilizando o método de Neighbor-joining.

A espécie MEAM 1, coletada em *I. batatas*, abriga os endossimbiontes secundários *Rickettsia* e *Hamiltonella*. Enquanto que *T. vaporariorum* abriga *Arsenophonus*. Estes resultados correspondem ao que já é descrito no mundo para estas espécies. Alguns destes endossimbiontes são mutualistas e essenciais para a sobrevivência dos insetos (MORAN et al., 1993). Infecção de MEAM 1 com *Rickettsia* e *Hamiltonella* são descritos frequentemente em diferentes regiões do mundo, como Israel (Chiel et al, 2007.), China (Pan et al, 2012; Bing et al, 2013), Tunísia (Gorsane et al, 2011), EUA (Thao et al, 2003) e sudeste do Brasil (Marubayashi et al, 2014).

A batata-doce é frequentemente infectada por fitovirose transmitidas por diferentes espécies de moscas-brancas (Valverde et al., 2007; Cuellar et al, 2011; Trenado et al., 2011). O conhecimento e identificação do inseto vetor destas fitovirose, neste caso a mosca-branca, tem papel importante para adoção de medidas de manejo, visando controle do inseto vetor, e conseqüente diminuição das perdas na produção. Sobretudo, agora que no Brasil, a espécie invasiva de *B. tabaci*, Mediterranean (biótipo Q) foi identificada no Estado do Rio Grande do Sul em cultivos de batata-doce e pimentão. Esta espécie requer maior atenção por apresentar resistência a inseticidas, como os neonicotinoides (Barbosa et al., 2014).

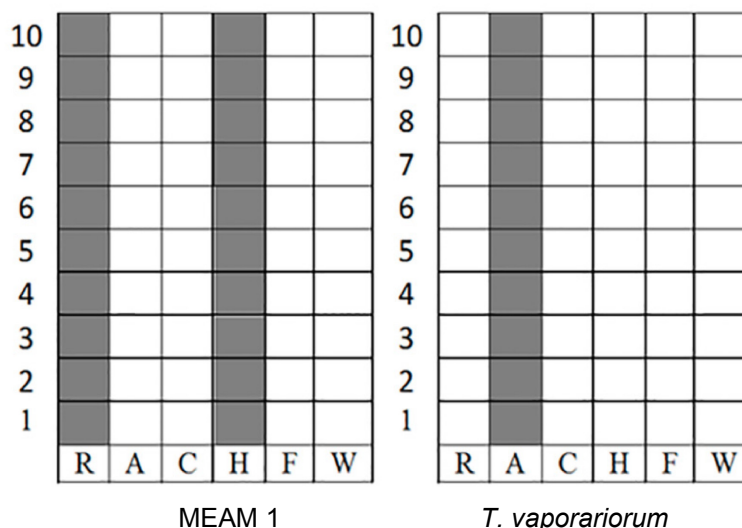


Figura 2. Infecção individual e mista de endossimbiontes secundários observadas em *Bemisia tabaci*, MEAM 1 e *Trialeurodes vaporariorum*, coletados em plantas de *Ipomoea batatas*. R: *Rickettsia*, H: *Hamiltonella*, W: *Wolbachia*, A: *Arsenophonus*, C: *Cardinium*, F: *Fritschea*.

6 CONCLUSÕES

As moscas-brancas *Bemisia tabaci* MEAM 1 (biótipo B) e *Trialeurodes vaporariorum* foram identificadas colonizando *Ipomoea batatas*;

Na espécie MEAM 1 foram identificados os endossimbiontes secundários *Rickettsia* e *Hamiltonella*. Em *T. vaporariorum* foi identificado o endossimbionte secundário *Arsenophonus*.

7 AGRADECIMENTOS

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP).

8 REFERÊNCIAS

ALEMANDRI, V.; DE BARRO, P.; BEJERMAN, N.; ARGÜELLO CARO, E. B.; DUMÓN, A. D.; MATTIO, M. F.; RODRIGUEZ, S. M.; TRUOLI, G. Species Within the *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae) Complex in Soybean and Bean Crops in Argentina, **Journal of Economic Entomology Molecular Entomology**. v. 105, n. 1, p. 48-53, 2012.

BARBOSA, L. F.; YUKI, V. A.; MARUBAYASHI, J. M.; DE MARCHI, B. R.; PERINI, F. L.; PAVAN, M. A.; BARROS, D. R.; GHANIM, M.; MORIONES, E.; NAVAS-CASTILLO, J.;

KRAUSE-SAKATE, R. First report of *Bemisia tabaci* Mediterranean (Q biotype) species in Brazil. **Pest Management Science**, 2014.

BING, X.; RUAN, Y. M.; RAO, Q.; WANG, X. W.; LIU, S. S. Diversity of secondary endosymbionts among different putative species of the whitefly *Bemisia tabaci*. **Insect Science**, v. 20, n. 2, p. 194-206, 2013.

BROWN, J. K. Molecular markers for the identification and global tracking of whitefly vector-begomovirus complexes. **Virus Research**, v. 71, p. 233-260, 2000.

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

CHIEL, E.; GOTTLIEB, Y.; ZCHORI-FEIN, E. Biotype-dependent secondary symbiont communities in sympatric populations of *Bemisia tabaci*. **Bulletin of Entomological Research**, v. 97, p. 407-413, 2007.

CUELLAR, W. J.; DE SOUZA, J.; BARRANTES, I.; FUENTES, S.; KREUZE, J. F. Distinct cavemoviruses interact synergistically with sweet potato chlorotic stunt virus (genus: *Crinivirus*) in cultivated sweet potato. **Journal of General Virology**, v. 92, p. 1233-1243, 2011.

DE BARRO, P.; LIU, S. S.; BOYKIN, L. M.; DINSDALE, A. B. *Bemisia tabaci*: a statement of species status. **Annual Review of Entomology**, v. 56, p. 1-19, 2011.

DINSDALE, A.; COOK, L.; RIGINOS, C.; BUCKLEY, Y. M.; DE BARRO, P. 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, p. 197-208, 2010.

FAUQUET, C.; FARGETTE, D. *African cassava mosaic virus*: etiology, epidemiology and control. **Plant Disease**, v. 74, p. 404-411, 1990.

FROLICH, 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.

GORSANE, F.; BEN HALIMA, A.; BEN KHALIFA, M.; BEL-KADHI, M. S.; FAKHFAKH H. Molecular Characterization of *Bemisia tabaci* Populations in Tunisia: Genetic Structure and Evidence for Multiple Acquisition of Secondary Symbionts. **Environmental Entomology**, v. 40, n. 4, p. 809-817, 2011.

GOTTLIEB, Y.; GHANIM, M.; CHIEL, E.; GERLING, D.; PORTNOY, V.; STEINBERG, S.; TZURI, G.; HOROWITZ, A.R.; BELAUSOV, E.; MOZES-DAUBE, N.; KONTSEDALOV, S.; GERSHON, M.; GAL, S.; KATZIR, N.; ZCHORI-FEIN E. Identification and localization of a *Rickettsia* sp in *Bemisia tabaci* (Homoptera : Aleyrodidae). **Applied and Environmental Microbiology**, v. 72, n. 5, p. 3646-3652, 2006.

HEDDI, A.; GRENIER, A. M.; KHATCHADOURIAN, C.; CHARLES, H.; NARDON, P. Four intracellular genomes direct weevil biology: Nuclear, mitochondrial, principal endosymbiont, and *Wolbachia*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 96, n. 12, p. 6814-6819, 1999.

HUAMAN, Z. **Systematic botany and morphology of the sweet potato plant**. Lima: International Potato Center, 1992. 22p. (Technical Information, 25).

HULL, J.; DE BARRO, P.; ZHAO, H.; WANG, J.; NARDIA, F.; LIU, S. S. An extensive field survey combined with a phylogenetic analysis reveals rapid and widespread invasion of two alien whiteflies in China. **PLoS ONE**, 6, e 16061, 2011.

JONES, D. Plant viruses transmitted by whiteflies. **European Journal of Plant Pathology**, v. 109, n. 3, p. 195-219, 2003.

JONES, C. M.; GORMAN, K.; DENHOLM, I.; WILLIAMSON, M. S. Highthroughput allelic discrimination of B and Q biotypes of the whitefly, *Bemisia tabaci*, using TaqMan allele-selective PCR. **Pest Management Science**, v. 64, p. 12-15, 2008.

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.

MARUBAYASHI, J. M.; KLIOT, A.; REZENDE, J. A. M.; KRAUSE-SAKATE, R.; PAVAN, M. A.; GHANIM, M. Diversity and Localization of Bacterial Endosymbionts from Whitefly Species Collected in Brazil. **PLoS ONE**, 2014.

MIRANDA, J. E. C. de; FRANCA, F. H.; CARRIJO, O. A.; SOUZA, A. F.; PEREIRA, W. **A cultura da batata doce**. Brasília: EMBRAPA. 1995, 94p. (coleção plantar).

MORAN, N. A.; MUNSON, M. A.; BAUMANN, P.; ISHIKAWA, H. A molecular clock in endosymbiotic bacteria is calibrated using the insect hosts. **Proceedings of the Royal Society B-Biological Sciences**, v. 253, n. 1337, p. 167-171, 1993.

MUYZER, G.; HOTTENTRAGER, S.; TESKE, A.; WAWER, C. 1996. Denaturing gradient gel electrophoresis of PCR amplified 16s rDNA-a new molecular approach to analyze the genetic diversity of mixed microbial communities, p. 1-23. In A. D. L. Akkermans, J. D. van Elsas, and F. J. de Bruijn (ed.), *Molecular microbial ecology manual* 3.4.4. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands

PAN, H.; XIANCHUN, L.; DAQING, G.; SHAOLI, W.; QINGJUN, W.; WEN, X.; XIAOGUO, J.; DONG, C.; BAIMING, L.; BAOYUN, X.; ZHANG, Y. Factors Affecting Population Dynamics of Maternally Transmitted Endosymbionts in *Bemisia tabaci*. **Plos One**, v. 7, n. 2, 2012.

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.

SILVA, J. B. C.; LOPES, C. A. **Cultivo da batata-doce**. 3 ed. Brasília: EMBRAPA. 1995.18p. (instruções técnicas de CNPHortaliças-7).

SIMON, C.; FRATI, F.; BECKENBACH, A.; CRESPI, B.; LIU, H.; FLOOK, P. Evolution, weighting, and phylogenetic utility of mitochondrial gene sequences and a compilation of conserved polymerase chain reaction primers. **Annals of the Entomological Society of America**, v. 87, p. 651-701, 1994.

THAO, M.; BAUMANN, P. Evidence for multiple acquisition of *Arsenophonus* by whitefly species (Sternorrhyncha : Aleyrodidae). **Current Microbiology**, v. 48, n. 2, p. 140-144, 2004.

THAO, M.; BAUMANN, L.; HESS, J. M.; FALK, B. W.; NG, J. C. K.; GULLAN, P. J.; BAUMANN, P. Phylogenetic evidence for two new insect-associated chlamydia of the family Simkaniaceae. **Current Microbiology**, v. 47, n. 1, p. 46-50, 2003.

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.

TRENADO, H. P.; ORÍLIO, A. F.; MÁRQUEZ-MARTÍN, B.; MORIONES, E.; NAVAS-CASTILLO, J. Sweepviruses cause disease in sweet potato and related *Ipomoea* spp.: Fulfilling Koch's postulates for a divergent group in the genus Begomovirus. **PLoS ONE**, v. 6, 2011.

VALVERDE, R. A.; CLARK, C. A.; VALKONEN, J. P. Viruses and virus disease complexes of sweetpotato. **Plant Viruses**, v. 1, p. 116–126. 2007.

VAN LENTEREN, J. C.; NOLDUS, L. P. J. J. Whitefly-plant relationships: behavioral and ecological aspects. In: GERLING, D. Whiteflies: their bionomics, pest status and management. Andover: Intercept, 1990. p. 47-90.

WALSH P, METZGER D, HIGUCHI R. Chelex-100 as a medium for simple extraction of DNA for pcr-based typing from forensic material. **Biotechniques**, v. 10, p. 506-513. 1991.

WEEKS, A. R; BREEUWER, J. A. J. A new bacterium from the Cytophaga-Flavobacterium-Bacteroides phylum that causes sex ratio distortion. **Insect Symbiosis II**, p. 165-176, 2003.

ZCHORI-FEIN, E.; BROWN, J. Diversity of prokaryotes associated with *Bemisia tabaci* (Gennadius) (Hemiptera : Aleyrodidae). **Annals of the Entomological Society of America**, v. 95, n. 6, p. 711-718, 2002.