

## IDENTIFICAÇÃO DAS COCHONILHAS, *Planococcus citri* e *Planococcus minor* MEDIANTE ESTUDOS MORFOMETRICOS E MOLECULARES

Ernesto Prado<sup>2</sup>; Thibaut Malaussa<sup>3</sup>; Flávia V. S. Cecília<sup>4</sup>; Brígida Souza<sup>5</sup>; Lenira V. Costa Santa-Cecília<sup>6</sup>

<sup>1</sup> Pesquisa financiada pelo Consórcio Brasileiro de Pesquisa e Desenvolvimento do Café CBP&D-Café

<sup>2</sup> Pesquisador Visitante, D.Sc., EPAMIG/FAPEMIG, Lavras-MG, [epradoster@gmail.com](mailto:epradoster@gmail.com)

<sup>3</sup> Institute de Recherche Agronomique (INRA-Sophie Antipolis) de França, [thibaut.malausa@sophia.inra.fr](mailto:thibaut.malausa@sophia.inra.fr)

<sup>4</sup> Mestranda, UNIFAL-MG, Alfenas-MG, [flascecilia@hotmail.com](mailto:flascecilia@hotmail.com)

<sup>5</sup> Professora, D.Sc., Departamento de Entomologia, UFLA, Lavras-MG; [brgsouza@ufla.br](mailto:brgsouza@ufla.br)

<sup>6</sup> Pesquisadora, D.Sc., IMA/EPAMIG-URESM-EcoCentro, Lavras-MG, Bolsista FAPEMIG; [scecilia@epamig.ufla.br](mailto:scecilia@epamig.ufla.br)

**RESUMO:** As cochonilhas *Planococcus citri* e *Planococcus minor* têm sido relatadas no Brasil, atacando as rosetas do cafeeiro, *Coffea* spp. São espécies crípticas, ocorrem na mesma planta hospedeira e causam danos similares, o que dificulta sua separação. Estudos de morfometria e moleculares fazem-se necessários neste caso, para determinar as diferenças entre as espécies, tendo em vista que a identificação específica é importante ao implementar um programa de controle biológico. Para os estudos morfométricos utilizou-se o índice de Cox & Freeston, que considera a atribuição de pesos à diversos caracteres morfológicos. Constatou-se que *P. citri* pode ocorrer em citros, videira e cafeeiro e *P. minor* em cafeeiro e cacau. Contudo, alguns caracteres morfológicos da população de *P. minor* proveniente de cacau extrapolaram a amplitude para a espécie, havendo sobreposição com *P. citri*. Dessa forma, essas constatações não possibilitaram a separação das espécies por meio de estudos morfométricos, o que levou a realização de estudos moleculares. Exemplares de *Planococcus* foram analisados por PCR-RFLP (Polymerase Chain Reaction Restriction, Fragment Length Polymorphism) com o gene mitocondrial COI e o gene do endossimbionte 16S. Posteriormente os fragmentos de ADN amplificados e seqüenciados. Os resultados mostraram alguns padrões polimórficos para a separação de ambas espécies.

**Palavras-Chave:** *Planococcus citri*, *P. minor*, Pseudococcidae, *Coffea* spp., sequencição, DNA.

## IDENTIFICATION OF MEALYBUGS, *Planococcus citri* AND *Planococcus minor* BY MORPHOMETRIC AND MOLECULAR STUDIES

**ABSTRACT:** The mealybugs *Planococcus citri* e *Planococcus minor* have been reported in Brazil, attacking cherries of coffee plants, *Coffea* spp. Both species are cryptic, occurring on the same hosts, causing similar damages, and by consequence difficult to separate. Morphometric and molecular studies are necessary to determine the differences between species. The correct identification is useful to any biological control program due to the specificity of many parasitoids. Morphometric studies used several anatomical characters, each with a ponderated score, that it is known as Cox and Freeston Score. Only a final score gives a good approximation to identify the species, however, a superposition zone occurs where is impossible to take a decision. *P. minor* was found in cacao and coffee, while *P. citri* was found in citrus, coffee and grapes. *Planococcus* specimens were also analyzed by PCR-RFLP (Polymerase Chain Reaction Restriction, Fragment Length Polymorphism) with the mitochondrial gene COI and the endosymbiont gen 16S. The fragments were amplified and sequenced. The PCR amplification of both gens produced polymorphic patterns that distinguished both species.

**Key words:** *Planococcus citri*, *P. minor*, Pseudococcidae, *Coffea* spp., sequencing, DNA.

## INTRODUÇÃO

A identificação de algumas espécies de cochonilhas-farinhentas (Pseudococcidae) apresenta dificuldades devido à considerável variação intraespecífica e pode ser difícil estabelecer os limites desta variação. Assim, muitas espécies podem ser na realidade um complexo representando uma ou mais espécies (Cox, 1983). Nesses casos, estudos biológicos e ecológicos fazem-se necessários, para se determinar as diferenças, haja vista a importância da identificação específica ao se implementar um programa de controle biológico, pois muitos parasitoides de cochonilhas são olfagatos ou monófagos, e podem discriminar espécies próximas.

As cochonilhas *Planococcus citri* e *Planococcus minor* têm sido relatadas no Brasil, atacando as rosetas do cafeeiro, *Coffea* spp. (Santa-Cecília et al., 2002). Além de apresentarem comportamentos biológico e ecológico similares, compartilham muitos hospedeiros e somente um estudo morfométrico pode separá-las (Cox & Freeston, 1985). Os estudos com *P. citri* são abundantes, porém pouco se conhece sobre *P. minor*. Outra espécie, *Planococcus ficus*, também é considerada parte do complexo, porém, tem sido relatada somente para *Ficus* sp. no Brasil (Williams & Granara, 1992).

Todas as características anatômicas, i.e. número de ductos tubulares, comprimento de fêmur e tibia, razão entre eles, etc., estão dentro da variação de cada espécie, daí a complexidade na identificação. Somente uma nota atribuída ao total de caracteres pode dar uma aproximação para separar as espécies, mesmo assim, pode existir uma zona de sobreposição onde não é possível tomar uma decisão. Nesses casos, justifica-se a realização de estudos moleculares.

Rung et al. (2008) separaram essas espécies usando o gene COI e o gene nuclear 'fator de alongação' EF-1 $\alpha$ , correlacionando com o índice de Cox & Freeston (1985). Constatou-se que as amostras de diferentes localidades mostraram uma alta correlação, com exceção de uma população proveniente do Espírito Santo, onde os estudos moleculares indicaram *P. minor*, porém pelo índice de Cox & Freeston correspondeu a *P. citri*.

Assim, este trabalho objetivou separar as espécies *P. citri* e *P. minor* coletadas em diferentes regiões e hospedeiros mediante estudos de morfometria e moleculares visando encontrar marcadores para as duas espécies.

## MATERIAL E MÉTODOS

Para a realização dos estudos de morfometria foram coletadas cochonilhas em lavouras de cafeeiros das localidades de Jaguaré e Itapemirim/ES, em cacauzeiros no município de Lavras/MG e em videira da região de Copiapó, Chile, sendo esses últimos identificados nos Estados Unidos como *P. citri*, pelo especialista Douglas Miller. Os caracteres estudados correspondem a número de ductus tubulares ventrais na cabeça, número de ductus tubulares entre o 2° e 3° cerário da cabeça, número de ductus tubulares ventrais no cerário 8, número de poros multiloculares atrás da coxa anterior, razão entre comprimento da tibia posterior + tarso vs. comprimento do trocanter + fêmur, razão entre comprimento da tibia posterior + tarso vs. comprimento do trocanter + fêmur, fileiras de poros multiloculares na margem posterior do segmento abdominal VI. O somatório dos pesos dos caracteres gera uma nota final que, nos intervalos entre 0-35 corresponde a *P. minor* e entre 35-120, a *P. citri*.

Para os estudos moleculares foram usadas seqüências de dois genes, o gene mitocondrial Cytochrome Oxidase I (COI) e o fragmento 16 S do endossimbionte. O estudo de seqüenciação de DNA foi realizado no Instituto de Recherche Agronomique (INRA-Sophie Antipolis) de França pela equipe do Dr. Thibaut Malaussa. Exemplares de *Planococcus* coletados em cacau e citros foram mantidos em álcool 96% e -20°C e enviados para INRA-França Sophie-Antipolis, para os estudos moleculares. As espécies foram analisadas por PCR-RFLP (Polymerase Chain Reaction Restriction, Fragment Length Polymorphism). Posteriormente os fragmentos de ADN amplificados foram seqüenciados. Populações de *P. citri* de cafeeiro, *P. minor* de cacau do Brasil foram comparadas com populações francesas de *P. citri* e com a seqüenciação de *P. citri* e *P. ficus* publicadas no Banco de genes (Genbank).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os estudos morfométricos utilizando o índice de Cox & Freeston (1985), indicaram que, populações provenientes de cafeeiro corresponderam às espécies, *P. citri* e *P. minor*, e aquelas oriundas de cacau referiram-se à *P. minor*. Contudo, a população em cacau apresentou alguns valores além da amplitude da espécie, com uma sobreposição com *P. citri*, o que indica sua variabilidade morfométrica. De acordo com a nota final, os insetos coletados em videira no Chile corresponderam a *P. citri*. (Figura 1).

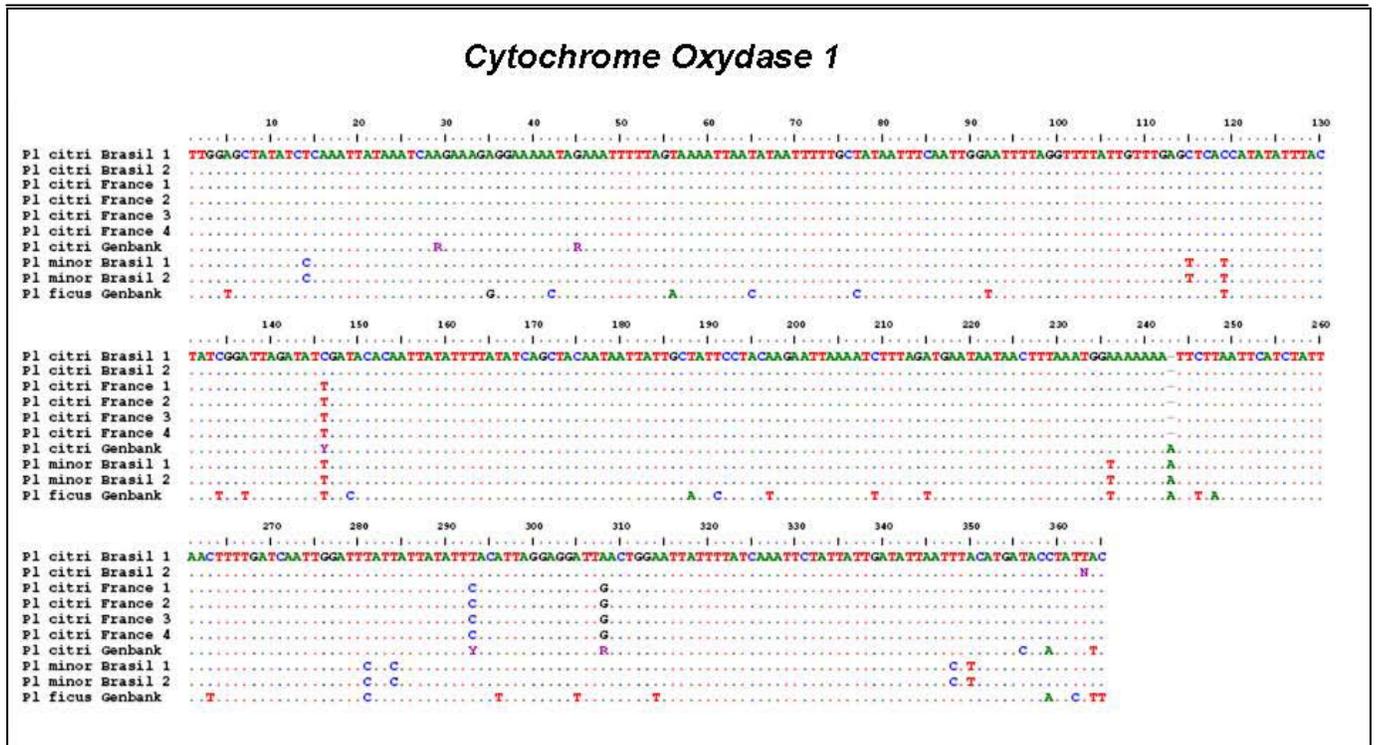
A maioria dos caracteres morfométricos estudados mostrou sobreposição dentro de uma mesma população e entre populações, e nenhum deles, independentemente, possibilitou a determinação confiável da espécie, seja o número de ductus na cabeça, o número de ductus adjacentes ao cerário 8, ou a razão entre os comprimentos do trocanter + fêmur versus tibia + tarso. O número de poros multiloculares presentes atrás das coxas anteriores mostrou uma amplitude de 0 a 4 em cacau; 0 a 3 em cafeeiro de Itapemirim; 0 a 5 em cafeeiro de Jaguaré; e de 0 a 3 em videira do Chile, não sendo portanto, um caracter determinante. O número de fileiras de poros multiloculares na margem posterior do sexto segmento abdominal mostrou-se também muito variável e subjetivo.

Nos sítios 16S' dos endossimbiontes associados às cochonilhas e no gen mitocondrial Cytochrome oxidase I (COI) os resultados mostraram grande similaridades entre as espécies, com algumas particularidades para cada uma. No fragmento 16 S dos endossimbiontes as diferenças entre *P. citri* (populações do Brasil e França) e *P. minor* (Brasil) se encontraram somente nas bases dos sítios 66 e 907 9 (Figuras 2 e 3).

A comparação entre as populações de *P. citri* do Brasil e França no fragmento COI mostraram-se também muito similares com diferenças apenas nas bases dos sítios 146 e 254. As diferenças em *P. minor* são encontradas nas bases dos sítios 14, 115, 119, 236, 282, 285, 348 e 350 do fragmento estudado. Já com *P. ficus* as diferenças foram mais numerosas, apesar da similaridade. A seqüenciação de *P. citri* entre os sítios 177 e 209 mostrou-se idêntica àquela estudada na África do Sul no mesmo gen COI, para esta espécie (Saccaggi et al., 2008).

Para a obtenção de um protocolo de identificação dessas espécies serão necessárias coletas adicionais de ambas as espécies, de outras localidades e países, e outros hospedeiros.





**Figura 3** - Análise molecular do gen COI de cochonilhas de diferentes localidades.

## CONCLUSÕES

Os estudos morfométricos permitem uma aproximação para diferenciar *P. minor* de *P. citri*. A técnica de PCR, utilizando o gene 16S do endossimbionte e o gene mitocondrial COI da cochonilha mostra padrões polimórficos que possibilitam a diferenciação das espécies.

## AGRADECIMENTOS

Ao CBP&D/Café pelo financiamento da pesquisa e a FAPEMIG pela concessão das bolsas.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- COX, J. An experimental study of morphological variation in mealybugs (Homoptera: Coccoidea: Pseudococcidae). **Systematic Entomology**, Davis, v. 8, p. 361-82. 1983.
- COX, J.M.; FREESTON, A.C. Identification of mealybugs of the genus *Planococcus* (Homoptera: Pseudococcidae) occurring on cacao throughout the world. **Journal of Natural History**, London, v. 19, p. 719-728. 1985.
- RUNG, A.; SCHEFFER, S.J.; EVANS, G.; MILLER, D. Molecular identification of two closely related species of mealybugs of the genus *Planococcus* (Homoptera: Pseudococcidae). **Annals of the Entomological Society of America**, Lanham, v. 101, n. 3. p. 525-532. 2008.
- SACCAGGI, D.L.; KRÜGER, K.; PIETERSEN, G. A multiplex PCR assay for the simultaneous identification of three mealybug species (Hemiptera: Pseudococcidae). **Bulletin of Entomological Research**, Cambridge, v. 98, p. 27-33. 2008.
- SANTA-CECÍLIA, L.V.C.; REIS, P.R.; SOUZA, J.C. Sobre a nomenclatura das espécies de cochonilhas-farinhas do cafeeiro nos Estados de Minas Gerais e Espírito Santo. **Neotropical Entomology**, Londrina, v. 31, n. 2, p. 333-334. 2002.
- WILLIAMS, D.J.; GRANARA DE WILLINK, M.C. **Mealybugs of Central and South America**. CAB International, University Press, Cambridge, UK. 635p. 1992.