

**FENÓTIPOS DE A-ESTERASE EM INDIVÍDUOS DE *Leucoptera coffeella* (LEPIDOPTERA: LYONETIIDAE) DE UMA POPULAÇÃO DO MUNICÍPIO DE GARÇA-SP**

Carlos Eduardo Martini da Silveira BUENO  
Faculdade de Agronomia e Engenharia Florestal/ Garça  
Carlos Eduardo Mendonça OTOBONI  
Faculdade de Agronomia e Engenharia Florestal/ Garça  
Jaime Maia dos SANTOS  
Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias/UNESP – Campus de Jaboticabal  
Francisco Jorge CIVIDANES  
Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias/UNESP – Campus de Jaboticabal

**RESUMO**

A produção de café no Brasil sofre sérios prejuízos pela desfolha que o bicho-mineiro causa nos cafeeiros, sendo o controle econômico dependente do conhecimento efetivo da praga. Neste sentido, foi objetivo deste trabalho verificar a variabilidade genética em uma população do bicho-mineiro com base nos fenótipos isoenzimáticos de a-esterase, nas fases de desenvolvimento do inseto. As lagartas, crisálidas e adultos foram obtidos pela criação do inseto em gaiolas e estes foram utilizadas individualmente para o preparo das amostras que foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida a 6%. Os dados foram analisados conforme os polipeptídios formados para as aloenzimas e os fenótipos foram comparados por estudos filogenéticos entre e dentro de cada fase do inseto. Cinco locos enzimáticos foram observados para a expressão da isoenzima (Est-1, Est-2, Est-3, Est-4 e Est-5), gerando fenótipos de 6 a 12 bandas e enzimas monoméricas, diméricas e triméricas. Isto indicou grande variabilidade genética dentro da população estudada. Na análise genética os fenótipos dos machos mostraram-se menos variáveis e o maior número de aloenzimas foi observado na fase de crisálida sendo, portanto, a fase de maior atividade da isoenzima.

**Palavras chave:** isoenzimas, genética, bicho-mineiro, cafeeiro

**SUMMARY**

**PHENOTYPES OF a-ESTERASE IN INDIVIDUAL OF A POPULATION OF *Leucoptera coffeella* (LEPIDOPTERA: LYONETIIDAE) FROM GARÇA-SP**

The coffee leaf miner (*Leucoptera coffeella*) causes severe early falling of leaves and consequent losses in the coffee crop in Brazil. The approach for the economic and ecological management of this pest depends on the knowledge in depth of the insect, including its infra-specific variability. The objective of this study was to measure the genetic variability of a population of the coffee leaf miner based on the esterase phenotypes of the different phases of the insect during its life cycle. Laboratory-reared caterpillar, pupa and adults were utilized in the study. Eight individual specimens of each stage

were submitted to electrophoresis in 6% polyacrylamide gels. The data were analyzed according to the polypeptides formed to the allozymes and the phenotypes were compared by genetic relationships among and inside each phase of the insect. Five loci were observed to the isozyme expression, named Est-1 to Est-5, generating phenotypes with 6 to 12 bands and monomeric, dimeric and trimeric enzymes. This indicated a great genetic variability for the studied population of the insect. In the genetic analysis the adult male phenotype patterns were less variable than the others stages. Also, the greater number of allozymes was observed in the pupa phase, being this, therefore, the phase of major isozyme activity.

Keywords: isozyme, genetics, coffee leaf miner, coffee

## 1. INTRODUÇÃO

No Brasil, o bicho mineiro do cafeeiro, *Leucoptera coffeella* (Guérin-Méneville & Perrottet, 1842) (Lepidoptera: Lyonetiidae), tornou-se a principal praga da cultura causando prejuízos consideráveis ao cafeeiro, ocorrendo perdas de até 50 % na produção (SOUZA & REIS, 1992). A adoção de estratégias racionais de manejo da praga requer o conhecimento de biologia e genética das populações, que podem ser obtidos com auxílio da biologia molecular, empregando-se várias técnicas, incluindo a eletroforese de isoenzimas (WHITTEN, 1989). O ponto básico para a distinção de populações de diferentes espécies, ao se utilizar dados isoenzimáticos, é que diferenças na mobilidade de isoenzimas, em um campo elétrico, são resultantes de diferenças a nível de seqüências de DNA que codificam essas enzimas. O controle genético das isoenzimas ocorre através de genes que podem ser alelos de um mesmo loco, ou estar situados em diferentes locos (FERREIRA & GRATTAPAGLIA, 1995).

O objetivo deste trabalho foi caracterizar bioquimicamente as diferentes fases do ciclo de vida do bicho-mineiro do cafeeiro em uma população do Município de Garça-SP, bem como estudar o polimorfismo do fenótipo isoenzimático de a-esterase.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

O estudo foi efetuado em uma população de *L. coffeella* existente no Colégio Agrícola de Garça-SP. Folhas com crisálidas foram colocadas em mudas sadias de cafeeiro mantidas em gaiolas (NANTES & PARRA, 1977).

Foram preparados oito indivíduos por fase, procurando-se manter a máxima uniformidade entre os indivíduos de cada estágio. Cada indivíduo foi macerado em 15 mL da solução extratora constituída de sacarose a 0,74 M, Triton X-100 a 1,26% e azul de bromofenol 0,01% (ESBENSHADE & TRIANTAPHYLLOU, 1990).

Foi utilizado o método contínuo de eletroforese em géis de poliácridamida a 6% no sistema "Mini Protean II Electrophoresis Cell" (Bio Rad). O tampão dos eletrodos da cuba eletrolítica, foi preparado com Tris-HCl (pH=8,8) a 12,3 mM e glicina a 94,5 mM e a eletroforese foi conduzida a 200 V constante.

Os géis foram revelados para a-esterase (EST) com uma solução tampão de fosfato de sódio a 0,1M e pH 6,2, Fast Blue RR a 0,2 mM e acetato de a-naftil a 0,3 mM, previamente dissolvido em 1 mL de acetona. Os géis foram mantidos na solução reveladora por cerca de 45 minutos a 39 °C, no escuro.

Os resultados foram analisados conforme a expressão dos polipeptídios, locos e alelos (ALFENAS, 1991), comparando-se o polimorfismo obtido entre e dentro das fases de desenvolvimento do inseto na população.

#### 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram observados diferentes fenótipos de a-esterase para *L. coffeella* nas diferentes fases do desenvolvimento do inseto, com ocorrência de polimorfismo entre e dentro das fases e com fenótipos variando de 6 bandas (polipeptídios), ilustrado na Figura 1 – 1' até 12 bandas (Figura 1 – 2'). Em lagartas ocorreram fenótipos com 6 a 9 bandas (Figura 1A). Em crisálidas ocorreram fenótipos com 7 a 12 bandas (Figura 1B). Em fêmeas ocorreram fenótipos com 6 a 11 bandas (Figura 1C) e em machos com 7 a 12 bandas (Figura 1D). Estas evidências indicam que na fase de crisálida ocorrem maior número de polipeptídios por indivíduo, coincidindo com a fase de metamorfose do inseto.

Observou-se também, que cinco locos gênicos estão envolvidos na expressão do fenótipo de a-esterase em *L. coffeella*, denominados no presente trabalho de Est-1 a Est-5 e identificados na Figura 1A. Estes locos apresentaram dois ou três alelos com enzimas monoméricas (Figura 1 – I), diméricas (Figura 1 – II) e triméricas (Figura 1 – III). As bandas geradas pelos locos Est-3 e Est-4 foram menos freqüentes no inseto, enquanto que as geradas pelos locos Est-1, Est-2 e Est-5 foram mais evidentes, gerando bandas com maior atividade. Os locos Est-4 e Est-5 foram monoméricos, sendo que o loco Est-5 foi dialélico e o loco Est-4 apresentou três alelos codominantes, gerando polipeptídios independentes, tendo-se 1 a 3 bandas para o loco.

O loco Est-3 apresentou produto dimérico nos fenótipos das fases de crisálida, fêmea e macho (Figura 1 – IV), ou então monomérico (Figura 1 – V), notadamente na fase de lagarta do inseto. O loco Est-1 apresentou também, em sua grande maioria, fenótipos monoméricos. Fenótipos diméricos foram observados na fase de crisálida (Figura 1B) e de fêmea (Figura 1C).

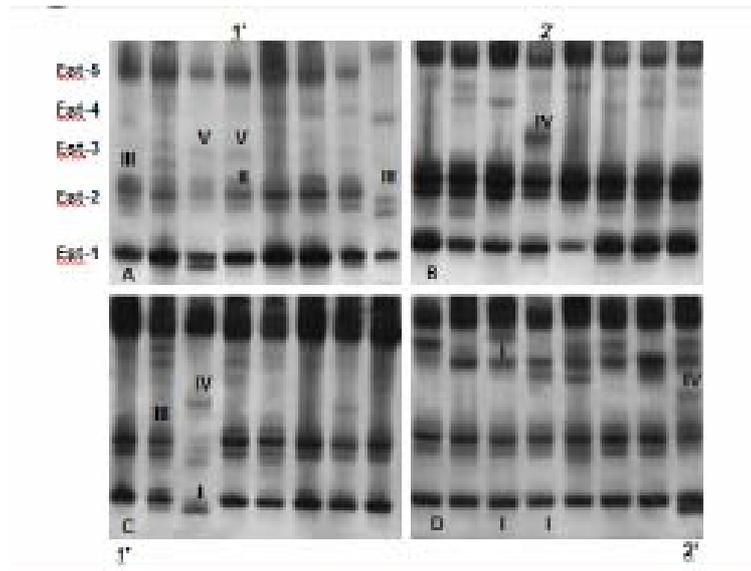


Figura 1. Polimorfismo do fenótipo isoenzimático para a-esterase de uma população do bicho mineiro do cafeeiro, *Leucoptera coffeella*, de Garça-SP, em géis de poliacrilamida a 6%. A) Fenótipos de larvas. B) Fenótipos da fase de crisálida. C) Fenótipos de fêmeas. D) Fenótipos de machos. 1' = fenótipo com o menor número de bandas observado (6 bandas); 2' = fenótipo com o maior número de bandas observado (12 bandas); I = enzima monomérica; II = enzima dimérica; III = enzima trimérica; IV = fenótipo dimérico do loco Est-3; V = fenótipo monomérico do loco Est-3.

O loco Est-2 foi o mais variável na expressão dos polipeptídeos, gerando fenótipos diméricos e triméricos de indivíduos heterozigotos quanto aos alelos envolvidos, o que corrobora com a reprodução do tipo sexuada (anfimítica) do inseto. Fenótipos triméricos foram observados nas lagartas (Figura 1A) e fêmeas (Figura 1C). Em crisálidas e machos foram observadas apenas enzimas diméricas. Isto mostra que a expressão da enzima varia com o desenvolvimento do inseto.

Em todos os indivíduos da fase de crisálida o loco Est-2 e seus três alelos mostraram intensa atividade, indicando que tais aloenzimas são ativadas principalmente nesta fase de desenvolvimento. Em lagartas predominou a expressão dos polipeptídios Est-1 e Est-2 que foi semelhante em fêmeas e crisálidas. Já para os machos os locos Est-3 e Est-4 foram os mais expressivos. Estes resultados indicam que o loco Est-4 pode servir como distinguidor das fases sexuais do inseto, uma vez que a amostragem em lagartas e crisálidas foi aleatória quanto ao sexo.

Tal fato, e pelos resultados observados neste estudo, levam a hipótese de que a população do inseto apresenta duas ou três bases genéticas diferenciadas quanto à expressão de a-esterase, sendo que a variabilidade genética do inseto em uma única população representa dificuldades de controle principalmente na seleção de resistência genética em cafeeiros ou até mesmo a problemas com resistência da praga a inseticidas.

#### 4. CONCLUSÕES

1. Existe grande variabilidade genética entre e dentro de cada do ciclo de vida do *L. coffeella*.
2. Cinco locos gênicos (Est-1 a Est-5) estão envolvidos na expressão de a-esterase no inseto.
3. Nos fenótipos obtidos foram expressas enzimas monoméricas, diméricas e triméricas.
4. A isoenzima apresentou maior atividade na fase de crisálida.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALFENAS, A. C. et al. *Eletroforese de proteínas e isoenzimas de fungos e essências florestais*. Viçosa: SIF, 1991. 242p.

ESBENSHADE, P. R.; TRIANTAPHYLLOU, A. C. *Isozyme phenotypes for the identification of Meloidagyne species*. *J. Nematol.*, v.22, p.10-15, 1990.

FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. *Introdução ao uso de marcadores RAPD e RFLP em análise genética*. Brasília: EMBRAPA-CENARGEN, 1995. 220p.

NANTES, J. F. D.; PARRA, J. R. P. Avaliação de danos causados por *Perileucoptera coffeella* (Guérin-Mèneville, 1842) (Lepidoptera-Lyonetiidae), em três variedades de café (*Coffea sp.*). *Solo*, v. 69, p.26-29, 1977.

SOUZA, J. C.; REIS, P. R. Bicho mineiro: biologia danos e manejo integrado. Belo Horizonte: EPAMIG, 1992. 28p. (Boletim Técnico, 37)

WHITTEN, M. J. The relevance of molecular biology to pure and applied Entomology. *Entomol. Exp. Appl.*, Dordrecht, v. 53, p. 1-16, 1989.