

LAURA MARIA PANTOJA GOMEZ

**FILOGEOGRAFIA MOLECULAR DE POPULAÇÕES BRASILEIRAS E
COLOMBIANAS DO BICHO MINEIRO DO CAFEIRO**

Dissertação apresentada à
Universidade Federal de Viçosa,
como parte das exigências do
Programa de Pós-Graduação
em Entomologia, para obtenção
do título de *Magister Scientiae*.

VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL
2015

Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Câmpus Viçosa

T

P198f
2015 Pantoja Gomez, Laura Maria, 1992-
Filogeografia molecular de populações brasileiras e
colombianas do bicho mineiro do cafeeiro / Laura Maria Pantoja
Gomez. – Viçosa, MG, 2015.

vii, 22f. : il. ; 29 cm.

Orientador: Raul Narciso Carvalho Guedes.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.
Referências bibliográficas: f.19-22.

1. Bicho-mineiro. 2. Diversidade genética.
3. Filogeografia . I. Universidade Federal de Viçosa.
Departamento de Entomologia. Programa de Pós-graduação em
Entomologia. II. Título.

CDD 22. ed. 595.78

LAURA MARIA PANTOJA GOMEZ

**FILOGEOGRAFIA MOLECULAR DE POPULAÇÕES BRASILEIRAS E
COLOMBIANAS DO BICHO MINEIRO DO CAFEEIRO**

Dissertação apresentada à
Universidade Federal de Viçosa,
como parte das exigências do
Programa de Pós-Graduação
em Entomologia, para obtenção
do título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 11 de agosto de 2015.

Luiz Orlando de Oliveira
(Coorientador)

Mateus Ribeiro de Campos

Raul Narciso Carvalho Guedes
(Orientador)

**A os meus pais, meu irmão e minha avó,
a luz do meu caminho.**

Dedico.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Viçosa e ao Programa de Pós-graduação em Entomologia, por se converter no meu segundo lar.

Ao professor Dr. Raul Narciso C. Guedes, pela orientação, apoio e ajuda durante este tempo, por todos seus ensinamentos ficarei por sempre agradecida.

Ao professor Dr. Luiz Orlando de Oliveira, pela coorientação, pela paciência e todas suas ideias para melhorar este trabalho.

Ao professor Dr. Alberto Soares Correa, sua ajuda e inestimável, por me guiar durante a realização deste trabalho, pela motivação e pela confiança.

À Dr. Gislaine Carvalho, por todas as coisas que me ensino, por acreditar em mim, por sua amizade.

A minha família, pelo apoio, motivação e confiança. Obrigada pelas muitas horas no Skype, longe más nunca sozinha.

A os meus amigo do laboratório de Ecofisiologia e Ecotoxicologia, meus irmãos na Entomologia, especialmente a Juliana, pela ajuda.

A os meus amigos do laboratório de Biologia Molecular e Filogeografia.

A os meus amigos colombianos e latinos, por ser minha família em Viçosa.

Ao professor Dr. Titto Bacca, pela ajuda na busca do material de trabalho e por seu apoio sempre.

A os meus amigos de sempre e a os novos amigos a aqueles com os que compartilhe momentos de trabalho, de aula o alguma vivencia.

A CAPES, CNPq, FAPEMIG, pela bolsa e pelo apoio econômico na minha pesquisa.

A todas as pessoas que contribuíram na coleta e envio de insetos para o desenvolvimento deste trabalho.

A todos aqueles que contribuíram com o desenvolvimento deste trabalho.

SUMÁRIO

RESUMO	vi
ABSTRACT	vii
INTRODUÇÃO.....	1
MATERIAL E MÉTODOS	4
Populações de <i>Leucoptera coffeella</i>	4
Extração do DNA.....	4
Sequenciamento dos genes mitocondriais e nuclear	6
Análises dos genes mitocondriais e nuclear.....	8
RESULTADOS	8
DISCUSSÃO	16
CONSIDERAÇÕES FINAIS	18
REFERÊNCIAS	19

RESUMO

PANTOJA GOMEZ, Laura Maria, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, agosto de 2015. **Filogeografia Molecular de Populações Brasileiras e Colombianas do Bicho Mineiro do Cafeeiro**. Orientador: Raul Narciso Carvalho Guedes. Coorientadores: Luiz Orlando de Oliveira, Alberto Soares Correa e Gislaine Carvalho.

Com o objetivo de comparar a diversidade genética de *Leucoptera coffeella* em 21 populações de origem brasileira e colombiana foram sequenciados os genes citocromo B, COI e ITS. Os genes mitocôndrias foram concatenados e a análise gerou oito haplótipos, dos quais um apresentou uma ampla distribuição nos dois países. O gene ITS apresentou cinco haplótipos, a maior variabilidade foi encontrada na Colômbia. As análises da variância molecular entre e dentro de populações e entre e dentro de países refletiu uma maior variabilidade dentro das populações e dentro dos países. Sugerindo assim que o bicho mineiro tem o mesmo local de origem, mas foi introduzido nos dois países em momentos diferentes e sem troca de materiais entre eles.

ABSTRACT

PANTOJA GOMEZ, Laura Maria, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, August, 2015. **Molecular phylogeography of Brazilian and Colombian populations of coffee leaf miner.** Adviser: Raul Narciso Carvalho Guedes. Co-advisers: Luiz Orlando de Oliveira, Alberto Soares Correa and Gislaine Carvalho.

In order to compare the genetic diversity of *Leucoptera coffeella*, in 21 populations of Brazil and Colombia the genes cytochrome, COI and ITS were sequenced. The mitochondrial genes were concatenated and the analysis generated eight haplotypes, of which one had a wide distribution in both countries. The ITS gene presented five haplotypes, the highest variability was found in Colombia. The analysis of molecular variance among and within populations and among and within countries reflected greater variability within populations and within countries. Suggesting that the coffee leaf miner has the same origin, but has been introduced in both countries at different moments and there was no exchange of material between them

INTRODUÇÃO

Beber uma boa xícara de café quente pela manhã já se tornou um hábito para muitas pessoas no mundo. Mas de onde provêm aquele café, qual é seu principal produtor e qual nos oferece uma melhor qualidade são ainda questões desconhecidas. Além disso, normalmente não se tem ideia das lutas diárias dos produtores para fazer com que este seja de uma ótima qualidade.

Na América Latina existem dois importantes países produtores de café, Brasil e Colômbia (Assis, *et al.*, 2012). O Brasil é considerado o maior produtor a nível mundial (Guerreiro, 2006), enquanto a Colômbia figura como o país com o café de melhor qualidade no mundo e o quarto maior produtor mundial (Puerta-Quintero, 2003; Statística, 2015).

Os registros indicam que o café que ingressou no Brasil em 1727 (Guerreiro, 2006), saiu da Etiópia, foi levado primeiramente para Amsterdã, depois para França de onde enviaram para América Central, e posteriormente para a Guiana Francesa, de onde finalmente foi levado para o sul do país (Pendergrast, 2010; Ukers, 1922). Além disso, na década de 50, foram registradas várias importações de material da África, entre elas uma em 1852 de um material vegetal conhecido como “Bourbon Vermelho”, procedente da Ilha de Reunião. Este genótipo, mediante cruzamentos posteriores com a variedade Sumatra, deu origem ao cultivar “Mundo Novo”, que através de cruzamentos artificiais com variedade “caterra amarelo” em 1949 resultou no lançamento da cultivar “Catuai” (Carvalho, 2008), uma das mais importantes variedades até o momento.

Na Colômbia o café ingressou quando o país ainda pertencia à “Nueva Granada” no início do século 18, provavelmente através da Venezuela proveniente das Guianas (Gumilla, 1730) e da Ilha de Martinica, localizada na América Central. Existem também relatos de que grande quantidade do material cultivado na Colômbia é descendente de

plantas que foram levadas em 1952 provenientes do Brasil (Moreno e Alvarado, 2000).

O bicho mineiro do cafeeiro, *Leucoptera coffeella* (Guérin-Mèneville & Perrottet, 1842) (Lepidoptera: Lyonetiidae), é um inseto-praga de grande importância econômica (Reis e Souza, 1996). Seu dano acontece quando a lagarta se alimenta do parênquima paliçádico (Ramiro *et al.*, 2004), ingressando pela superfície da folha fazendo rotas conhecidas como minas as quais, com o tempo, vão secando e ocasionando a morte parcial do tecido (Constantino *et al.*, 2011). Posteriormente, estas lesões necrosam e secam tornando-se de cor marrom, o qual termina com o desfolhamento da planta, diminuindo a área fotossintética e causando perdas na produção final (Walker e Quintana, 1969; Reis e Souza, 1996; Nantes e Parra, 1977). No Brasil são reportadas perdas até de 80% quando não são tomadas medidas de controle apropriadas (Pereira *et al.*, 2007).

Múltiplas alternativas para seu controle eficiente têm sido estudadas e aplicadas, passando pelo uso de inseticidas (Fragoso, *et al.*, 2003), armadilhas de feromônio (Bacca, *et al.*, 2012) e inimigos naturais (Constantino, *et al.*, 2011), mas ainda essas alternativas são deficientes e falhas sistemáticas de controle são frequentemente reportadas. Uma das estratégias para a busca de métodos eficientes de controle é o reconhecimento e a avaliação de interações interespecíficas de coevolução entre o inseto-praga e o meio abiótico e biótico (Sakay, *et al.*, 2001; Oliveira, *et al.*, 2013).

Investigações da(s) região (ões) de origem geográfica e genealógica do bicho mineiro e as possíveis rotas de dispersão deste espécie-praga têm se tornado um problema tão difícil quanto seu controle. Várias hipóteses têm sido testadas, mas ainda não existe uma alternativa validada pela comunidade científica. Estudos anteriores sugerem à Ilha de Reunião na África como o centro de origem geográfico do bicho mineiro (Green, 1984; Veja e Posada, 2006) com posterior dispersão para outras

regiões do planeta (Von Ihering, 1912; Guerreiro, 2006). O bicho mineiro possui um tamanho de aproximadamente 3,5 mm de comprimento e 6,5 de envergadura alar (Souza *et al.*, 1998), formas morfológicas que dificultam seu voo a longas distancias, sendo sua principal forma de dispersão mediada pelo homem no transporte e comércio de mudas de café.

No passado, considerava-se que os insetos minadores do café distribuídos na África e na América eram pertencentes à mesma espécie (Bradley, 1958; Green, 1984), mas estudos posteriores revelaram que os insetos da África eram diferentes espécies, incluindo *Leucoptera meyricki* Ghesquiere (1940), *Leucoptera coffeina* Washbourn (1940) e *Leucoptera coma* Ghesquiere (1940) (Bradley, 1958; Constantino, 2011). Em contraste, na América encontra-se documentado somente *L. coffeella*, entretanto precisa-se de mais estudos sobre sua origem genealógica e geográfica, que persiste desconhecida, assim como ocorreram os eventos de dispersão no continente americano.

Acredita-se que este inseto chegou à América pela primeira vez nas Ilhas centro-americanas de Guadalupe e Martinica em 1842 (Cantor e Cardenas, 2001). No Brasil, o primeiro registro é do ano de 1851, introduzido provavelmente através de plantas provenientes das ilhas das Antilhas e Bourbon (Von Ihering, 1912; Souza *et al.*, 1998; Fragoso, *et al.*, 2002). Já na Colômbia não existem informações quanto ao ingresso da espécie.

Com o uso de ferramentas moleculares e o estudo de diferentes tipos de genes neutrais, mitocondriais e nuclear, buscou-se avaliar a demografia do bicho mineiro e a diversidade genética deste entre as populações de cada país, sugerindo três hipóteses iniciais sobre a chegada e as possíveis rotas de dispersão do inseto:

- O inseto chegou a um dos dois países e foi levado posteriormente ao outro.
- O inseto chegou aos dois países de diferentes fontes.
- O inseto ingressou em momentos diferentes, sem troca de materiais entre os países, provenientes de um mesmo local.

MATERIAL E MÉTODOS

Populações de *Leucoptera coffeella*

Foram coletadas a campo 21 populações de *L. coffeella* (larvas, pupas e adultos) de diferentes regiões do Brasil e da Colômbia em fins de 2014 (Tabela1). Estes insetos foram armazenados em frascos de vidro, devidamente etiquetados, com álcool 95% (etanol) em freezer a -20° C até o momento da extração. Este procedimento foi efetuado com o propósito de conservar a integridade do DNA por um maior período de tempo.

Extração do DNA

O DNA foi extraído seguindo o método adaptado de Clark *et al.* (2001). Os insetos foram macerados individualmente com nitrogênio líquido e adicionou-se 500 µL de tampão CTAB (100 mM de Tris-HCl, pH 8,0; 1,4 M de NaCl; 0,02M de EDTA, pH 8,0; CTAB (2%) e β-mercaptoetanol 0,2% (adicionado separado dos demais componentes do tampão)). Posteriormente foram incubados por 30 min a 65° C. Decorrido este tempo foram adicionados 13 µL de proteinase K (25 mg/mL) e incubados em banho-maria por 1,5 h a 37° C, homogeneizando em vortex a cada 20 min. A seguir, foram adicionados 70 µL de RNase (10 mg/mL) e se incubaram a 37° C por 3 horas homogeneizando-se as amostras a cada 30 min. Posteriormente, as amostras foram centrifugadas por 5 minutos a 12.500 rpm e o sobrenadante foi transferido para um novo tubo. Ao sobrenadante foram adicionados 500 µL de clorofórmio e álcool

isoamílico (24:1 v/v) e centrifugou-se novamente a 12.500 rpm por 15 minutos. O sobrenadante novamente foi transferido para um tubo novo e foram adicionados 500 µL de isopropanol. Os tubos ficaram a 4° C, por toda a noite. Após a incubação, as amostras foram centrifugadas por 15 minutos à 12.500 rpm e o sobrenadante foi descartado. Os pellets foram sujeitos a duas lavagens com 600 µL de álcool 90%, secos em temperatura ambiente, resuspendidos em 50 µL de tampão TE 0,1 M (10mM Tris-HCl; 1mM EDTA, pH 8,0), e deixados a 4° C por toda a noite. Posteriormente os DNAs foram armazenados a -20° C.

Tabela 1: Locais de amostragem de populações do bicho mineiro do cafeeiro (*Leucoptera coffeella*).

Local de Origem	Nº.	Latitude	Longitude
Colômbia:			
El Tarso (ANT)	1	05°52'15,14"N	75°50'19,30"W
Santa Barbara (ANT)	2	05°51'58,32"N	74°48'35,12"W
Consaca (NAR)	3	01°11'49,10"N	77°27'59,13"W
Matituy (NAR)	4	01°20'52,24"N	77°19'58,15"W
Buesaco (NAR)	5	01°23'35,05"N	77°09'07,69"W
Brasil:			
Porto Velho (RO)	6	08°43'45,26"S	63°53'29,43"W
Ouro Preto (RO)	7	10°37'22,05"S	62°18'17,39"W
Cacoal (RO)	8	11°26'10,60"S	61°27'22,14"W
Luis Eduardo Magalhães (BA)	9	12°05'45,46"S	45°46'49,00"W
Elói Mendes (MG)	10	21°36'19,36"S	45°34'23,75"W
São Roque (ES)	11	19°44'19,25"S	40°39'34,00"W
Lavras (MG)	12	21°13'45,76"S	44°58'39,26"W
Monte Carmelo (MG)	13	18°54'59,06"S	47°24'12,00"W
Paraguaçu (MG)	14	21°33'08,35"S	45°45'33,62"W
Piracicaba (SP)	15	22°42'42,61"S	47°38'08,29"W
Paulínia (SP)	16	22°45'06,25"S	47°08'37,71"W
Santa Maria de Jetibá (ES)	17	20°01'32,32"S	40°44'38,47"W
Serra do Salitre (MG)	18	19°06'27,80"S	46°36'19,00"W
Santa Teresa (ES)	19	19°56'15,53"S	40°35'54,41"W
Três Corações (MG)	20	21°39'16,21"S	45°18'36,52"W
Viçosa (MG)	21	20°45'22,32"S	42°52'21,12"W

Sequenciamento dos genes mitocondriais e nuclear

Para realização do estudo, foram utilizados dois fragmentos de genes mitocondriais: Citocromo C Oxidase Subunidade I (COI) e Citocromo B (Cytb). Também foi utilizado um fragmento da região do DNA nuclear ribossomal (rnDNA) correspondente ao espaçador interno transcrito – ITS (que compreende o ITS1, 5,8S ITS2). Os primers

utilizados no sequenciamento de COI foram construídos com base em regiões conservadas das sequencias pertencentes à outras espécies do gênero *Leucoptera* depositadas no GenBank (*L. malifoliella*, *L. laburnella*, *L. spartifoliella*), utilizando o aplicativo Primer 3 v.0.4.0. (Rozen & Skaletsky, 2000). Os primers para Cytb foram elaborados usando como referência os primers de Simon *et al.* (1994) e adaptado para aperfeiçoar o sequenciamento do fragmento de estudo. Para o sequenciamento de ITS foram utilizados os primers CAS18SF1 e CAS28sB1d (Ji *et al.*, 2003) (Tabela 2).

Tabela 2: Primers utilizados com o nome do fragmento que amplificam, sequência e a temperatura de anelamento (Ta)

Primer	Gene	Sequência 5'-3'	Ta (°C)
LCOF-F4	COI	CTGGAGGAGGAGATCCAATTCT	57
LCOF-R4		TGAATATCGACGAGGTATTCCAG	
LcCYTB-F1	Cytb	TTCTGGTTTAATATGAGCAGGAG	58
LcCYTB-R1		ATCATTTTGGAGGGGCAACAG	
CAS18SF1	ITS	TACACACCGCCCGTCGCTACTA	58
CAS28sB1d		TTCTTTTCCTCCSCTTAYTRATATGCTTA	

As condições de amplificação via PCR foram realizadas em um total de 25 µL, contendo 3 µL de DNA total, 2,5 µL de tampão IB 10X (Phoneutria, Belo Horizonte, MG, Brazil), 2,5 µL de Mg (Phoneutria, Belo Horizonte, MG, Brazil), 0,7 µL de dNTP (2,5mM), 2 µL de cada primer (R e F) (10pmol/µL) (Exxtend Biotecnologia Ltda, Campinas, SP) e 0,2 µL de TaqDNA Polimerase (Phoneutria, Belo Horizonte, MG, Brazil). Os ciclos de PCR para os três conjuntos de primers foram iniciados com uma desnaturação de 5 min a 94° C seguidos por 35 ciclos de 94° C por 30 s, temperatura de anelamento de acordo com cada par de primers (Tabela 2) por 45 s e 72° C por 1,5 min, e uma extensão final a 72° C por 10 min usando termociclador modelo Vapo Protect (Eppendorf, Hamburg, Germany). Foi aplicado 5 µl do produto da PCR em gel de agarose (1,0

%) e visualizado sob luz ultravioleta. As imagens foram digitalizadas em um sistema de captura de imagens (Eagle Eye, Stratagene, La Jolla, CA, USA). Posteriormente o processo de purificação foi realizado com enzima *ExoSap* (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) na proporção de 2,0 µL para cada de 10 µL de produto de PCR e o sequenciamento das amostras foi realizado pela empresa MACROGEN INC., (Seul, Coreia do Sul).

Os dados do sequenciamento foram alinhados e editados manualmente no aplicativo Sequencher 4.8 (Gene Codes Corp. Ann Harbor, MI, USA). Para as análises posteriores foram concatenados os dois genes de origem mitocondrial (Cytb -COI). Ambiguidades foram esclarecidas manualmente no aplicativo Sequencher.

Análises dos genes mitocondriais e nuclear

O número de haplótipos (H), a diversidade haplotípica (Hd) e a diversidade nucleotídica (pi) foram estimados através do aplicativo computacional DnaSP v5 (Librado & Rozas, 2009). As conexões genéticas entre haplótipos foram estabelecidas mediante a estatística de “*Median Joining*” (Bandelt et al., 1999) utilizando o aplicativo computacional NETWORK 4.5.0.2 (Fluxus Technology, Sudbury, UK). Foram realizados mapas de acordo com os locais de coleta no aplicativo computacional GPS trackmarker (Geo Studio Tecnologia Ltda). No Programa Arlequin ver 3.5.1.2 foi estimada a AMOVA (Excoffier et al., 1992), a porcentagem de variação entre todas as populações e a porcentagem de variação entre as populações dentro de cada país.

RESULTADOS

As sequencias para os genes Cytb, COI e ITS possuem tamanhos de 299 pb, 575 pb e 902 pb, respectivamente. Foram sequenciados 68 indivíduos para cada um dos genes mitocondriais e 58 indivíduos para o gene nuclear. O alinhamento das sequencias informa a existência de polimorfismos nos três genes estudados. A diversidade haplotípica foi de 0,284 (Cytb), 0,355 (COI) e 0,6086 (ITS).

As sequencias dos genes mitocôndrias concatenados (Cytb_COI) apresentaram oito sítios variáveis gerando assim oito haplótipos diferentes (Tabela 3). As frequências dos haplótipos foi bastante variável, em quanto o haplótipo 4 apareceu 42 vezes os haplótipos 5, 7 e 8 só uma vez, são do tipo singletons.

Nas relações entre os haplótipos dos genes mitocondriais concatenados (Figura 1), aparecem quatro haplótipos ligados ao haplótipo mais frequente (4), o haplótipo 3 esta ligado ao haplótipo 1 pelos haplótipos 7, 2 e 6.

Tabela 3: Representação dos haplótipos de cada gene de *L. coffeella*. H:Haplotipo, N: Número total de sequencias por haplotipo

Gene Cytb_COI			Gene ITS		
Cytb COI					
H	N	56112366	H	N	267
		74895707			518
		699721			345
1	5	CCTACCTA	A	34	GTA
2	3	CTTGTTCA	B	7	TTA
3	5	CTTGCTCTG	C	11	GCG
4	47	CCTACCTG	D	1	TTG
5	1	TCTACCTG	E	5	GCA
6	5	CCTACTCA			
7	1	CTTGTCCTG			
8	1	CCCACCTG			

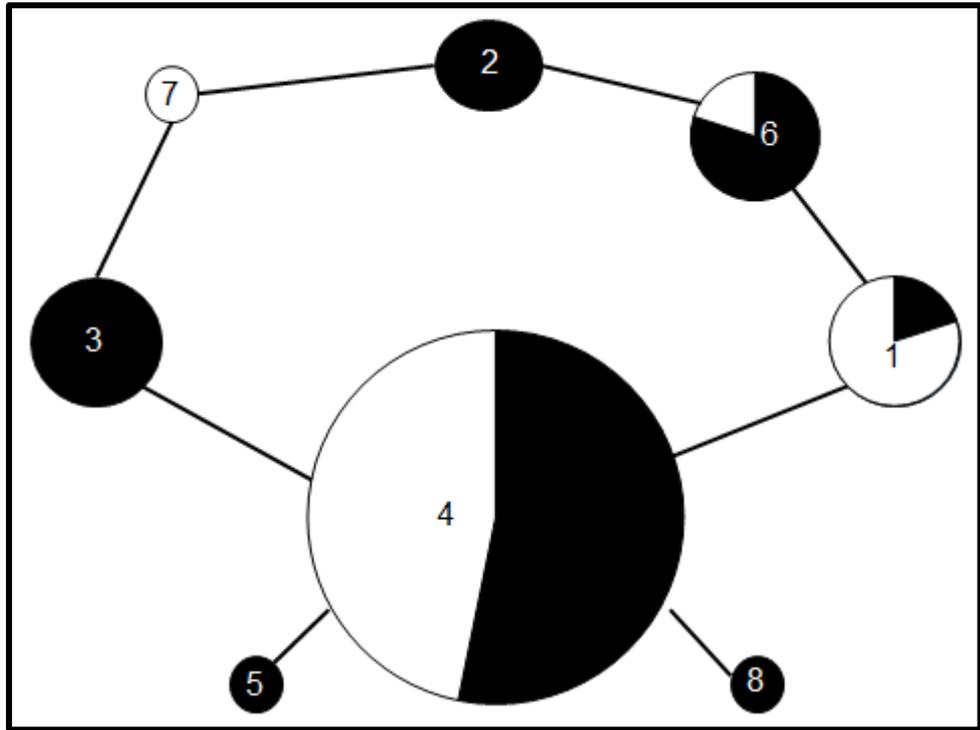


Figura 1: Rede de haplótipos dos genes Cytb e COI (concatenados) de *L. coffeella*. Os números descritos referem-se aos haplótipos das sequências descritas na Tabela 3; a cor preta corresponde à proporção de indivíduos brasileiros e a branca a os colombianos presentes dentro de cada haplótipo; os tamanhos dos círculos são proporcionais à frequência deles.

Na distribuição geográfica dos haplótipos, o haplótipo 4 está presente nos dois países, em quase todas as localidades de coleta (figura 2). Os haplótipos 1 e 6 aparecem numa única população da Colômbia e em uma única população do Brasil. Os haplótipos 5 e 7 são encontrados somente no Brasil e o haplótipo 8 somente na Colômbia.

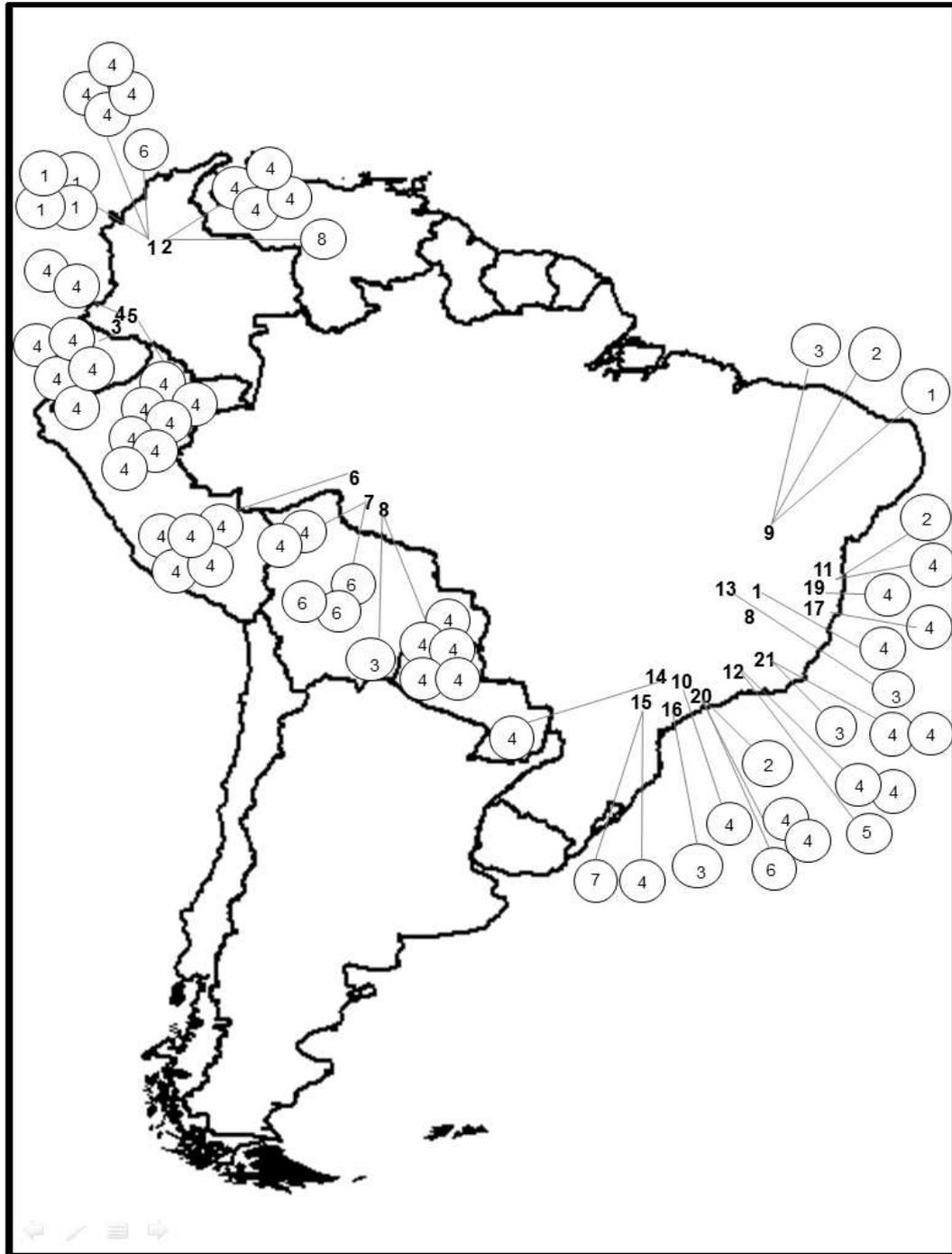


Figura 2: Distribuições geográficas dos haplótipos resultantes da concatenação de Cytb e COI. Os números no mapa correspondem as localidades onde foram realizadas as coletas (conforme descritos na Tabela 1); cada numero dentro do circulo denota um haplótipo.

Existem cinco haplótipos de ITS (Tabela 3). As frequências dos haplótipos são variáveis o mais abundante é o A, seguido pelo C, B, E e D que conta com só uma sequencia na rede de haplótipos (Figura 3). Quanto à distribuição geográfica (Figura 4), o haplótipo A se encontra distribuído nos dois países, o B se encontra na região norte de Colômbia e na população de Ouro Preto no Brasil. Os haplótipos C, D e E só se encontram presentes na Colômbia.

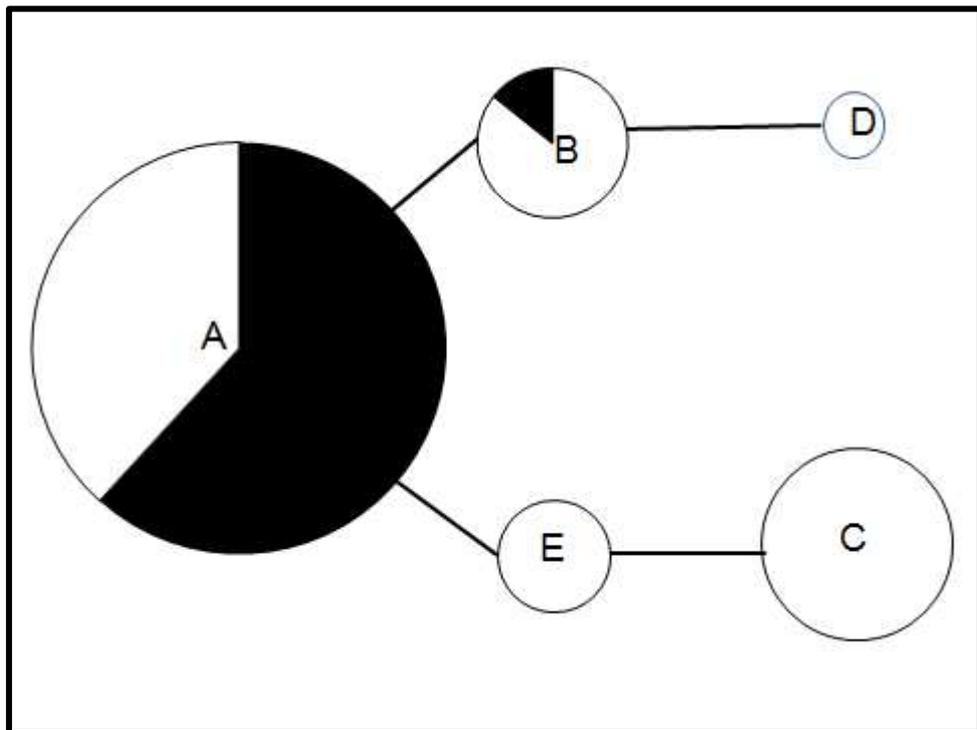


Figura 3: Rede de haplótipos do gene ITS de *L. coffeella*. Os números descritos referem-se aos haplótipos das sequencias descritas na Tabela 3; a cor preta corresponde à proporção de indivíduos brasileiros e a branca a os colombianos presentes dentro de cada haplótipo; os tamanhos dos círculos são proporcionais à frequência deles.



Figura 4: Distribuições geográficas dos haplótipos do ITS. Os números no mapa correspondem as localidades onde foram realizadas as coletas (conforme descritos na Tabela 1); cada numero dentro do circulo denota um haplótipo

A análise de variância molecular (AMOVA) comparando as variações entre e dentro das populações nos genes mitocôndrias e nuclear (Tabela 4) reflete uma porcentagem de variação maior dentro das populações que entre elas, sendo este valor maior na análise usando as sequencias do gene ITS. Na AMOVA comparando a variação dos países (Tabela 5) a maior porcentagem de variação foi encontrada dentro de cada país sendo de 90,2% quando analisado com as sequencias dos genes Cytb e COI, e de 73,64 % para o ITS. Determinou-se assim, que a variabilidade de indivíduos quando se comparam os dois países é baixa e é possível encontrar quase as mesmas sequencias nos indivíduos colombianos e brasileiros.

Tabela 4: Análise da variância molecular (AMOVA) para a estrutura genética das populações de *L. coffeella* usando o sequenciamento dos genes Cytb _COI e ITS.

Fonte de Variação	Graus de liberdade	Somatória de quadrados	Componentes de variação	Porcentagem de variação	FST
Cytb –COI					
Entre Populações	20	23,066	0,17437	22,45	
Dento de Populações	47	28,317	0,60248	77,55	
Total	67	51,382	0,77685		0,22446
ITS					
Entre Populações	16	8,110	0,00683	1,39	
Dento de Populações	41	19,890	0,48513	98,61	
Total	57	28	0,49197		0,01389

Tabela 5: Análise da variância molecular (AMOVA) para a estrutura genética das populações de *L. coffeella* no Brasil e na Colômbia, usando o sequenciamento dos genes Cytb_COI e ITS.

Fonte de Variação	Graus de liberdade	Somatória de quadrados	Componentes de variação	Porcentagem de variação	FST
Cytb –COI					
Entre Países	1	3,332	0,07906	9,8	
Dento de cada País	66	48,05	0,72803	90,2	
Total	67	51,382	0,80709		0,09796
ITS					
Entre Países	1	4,518	0,15007	26,36	
Dento de cada País	56	23,482	0,41933	73,64	
Total	57	28	0,56939		0,26355

DISCUSSÃO

As populações brasileiras e colombianas de bicho mineiro apresentam poucas diferenças nas sequências dos três genes estudados. Pela condição de inseto-praga introduzido e com os dados obtidos pode-se sugerir que a população é de recente invasão ou ainda se encontra em um processo de expansão já que existe um haplótipo predominante em cada uma das redes, rodeado por haplótipos de menor frequência, esta expansão pode estar acontecendo pela busca de estratégias para aumentar a colonização assim como para diminuir o efeito do controle que sofre por ser praga.

A hipótese mais adequada de acordo com os dados obtidos é aquela que propõe o ingresso do inseto em momentos diferentes, sem troca de materiais entre os países, e a uniformidade presente nos materiais é devido ao fato de serem provenientes de um mesmo local. Esta ausência de troca de materiais se encontra respaldada pela distribuição geográfica dos haplótipos do gene ITS que apresenta uma maior variabilidade na Colômbia a qual não seria possível se o inseto tivesse sido levado do Brasil.

Nos primeiros relatos na América, o inseto foi classificado erroneamente, confundindo com outras espécies de *Leucoptera*, que ocorrem apenas na África, o que sugere uma separação dentro de *Leucoptera* antes de migração do inseto, mas mais estudos filogenéticos são necessários para testar esta hipótese. Dentro de *Leucoptera* encontram-se 64 espécies diferentes das quais quatro atacam diretamente o café. As demais têm hábitos alimentares semelhantes, mas seus estudos ainda são escassos.

Sequências de *L. malifoliella*, *L. laburnella* e *L. spartifoliella* encontram-se disponibilizadas no Genbank, mas a identidade entre elas com as sequências gênicas de *L. coffeella* é baixa. Este fato pode ser reflexo de uma classificação errada ou taxas de mutação diferentes

depois da separação das espécies dentro do gênero. Provavelmente, a baixa variabilidade genética pode ser devido ao fenômeno de deriva genética, pela introdução dos espécimes em um novo continente (efeito fundador) ou pela seleção de organismos mais adaptados (gargalho genético).

Para poder determinar melhor as adaptações e história evolutiva de *L. coffeella* são necessários estudos de filogenia explorando as espécies africanas e americanas de *Leucoptera* que colonizam o café e para concluir melhor sobre a estrutura populacional podem ser efetuados análises com um número maior de marcadores ou com microssatélites.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Nos genes Cytb, COI e ITS, *Leucoptera coffeella* apresentou cinco, três e oito sítios de mutação respectivamente dentro de suas sequencias, gerando um total de 8 haplótipos para os genes mitocondriais e 5 para o ITS.

Os resultados obtidos sugerem que a hipóteses mais adequada para explicar os padrões de diversidade é a que propõe o ingresso dos materiais em momentos diferentes, sem trocas entre os países más com um mesmo local de origem.

REFERÊNCIAS

Assis, G.; Assis, F.; Scalco, M.; Toloza, F.; Fidelis, I.; Campos, J. e Guimarães, J. 2012. Pesquisa Agropecuária Brasileira. 47: 157-162.

Bacca, T.; Saraiva, V. e Lima, E. 2012. Captura de *Leucoptera coffeella* (Lepidoptera: Lyonetiidae) en trampas con feromona sexual y su intensidad de daño. Revista Colombiana de Entomología. 38(1): 42 -49.

Bandelt, H.J.; Forster, P.; Rohl, A. 1999. Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. Molecular Biology and Evolution. 16: 37–48.

Bradley, J.D. 1958. Taxonomic notes of *Leucoptera meyricki* Ghesq. and *Leucoptera coffella* (Guerin-Meneville) (Lepidoptera: Lyonetiidae). Bulletin of Entomological Research. 49: 417-419.

Cantor, F. e Cárdenas, R. 2001. Aclaraciones sobre el nombre científico del miador del café. Revista Colombiana de Entomología. 27:87-88.

Carvalho, C.H.S. d. 2008. Cultivares de café, origem, características e recomendações. Empresa Brasileira de Pesquisa agropecuária. 27-33.

Clark, T.; Meinke, L. e Foster, J. 2001. Molecular phylogeny of Diabrotica beetles (Coleoptera: Chrysomelidae) inferred from analysis of combined mitochondrial and nuclear DNA sequences. Insect Molecular Biology. 10: 303-314.

Constantino, L; Florez, J; Benavides, P; Bacca, T. 2011. Minador de las hojas del cafeto. Una plaga potencial por efectos Del cambio climático. Avances técnicos Cenicafe – Colombia.

Excoffier L, Smouse P, Quattro J. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: Application to human mitochondrial DNA restriction data. Genetics 131, 479–491, 1992.

Fragoso, D.; Guedes, R.N.C.; Picanço, M. e Zambolin, L. 2002. Insecticide use and organophosphate resistance in coffee leafminer *Leucoptera coffeella* (Lepidoptera: Lyonetiidae). Bulletin of Entomological Research 92: 203–212.

Fragoso, D.; Guedes, R.N.C. e Ladeira, J. 2003. Seleção na evolução da resistência a organofosforados em *Leucoptera coffeella* (Guérin-Méneville) (Lepidoptera: Lyonetiidae). *Neotropical Entomology*. 32: 329–339.

Green, D. 1984. A proposed origin of the Coffee leaf-miner, *Leucoptera coffeella* (Guérin-Méneville) (Lepidoptera: Lyonetiidae). *Bulletin of the Entomological Society of America*. 30: 30-31.

Guerreiro, O. 2006. Coffee leaf miner resistance. *Journal of Plant Physiology*. 18:109-117.

Gumilla, J. 1730. *El Orinoco Ilustrado*.

Ji, Y-J.; Zhang, D-X. e He, L-J. 2003. Evolutionary conservation and versatility of a new set of primers for amplifying the ribosomal internal transcribed spacer regions in insects and other invertebrates. *Molecular Ecology Notes*. 3:581-585.

Librado, P. e Rozas, J. 2009. DnaSP v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics*. 25: 1451-1452.

Magalhães, S.T.V., Guedes, R.N.C, Demuner, A. J. e Lima, E.R. 2008. Effect of coffee alkaloids and phenolics on egg-laying by the coffee leaf miner *Leucoptera coffeella*. *Bulletin of Entomological Research*. 98: 483-489.

Moreno, G e Alvarado, G. 2000. *La variedad Colombia: Veinte años de adopción y comportamiento frente a nuevas razas de la roya del cafeto*. Publicaciones Cenicafe: 1-31.

Nantes, J. e Parra, J. 1977. Avaliação de danos causados por *Pereleucoptera coffeella* (Guerin - Méneville, 19442) (Lepidoptera-Lyonetiidae), em tres variedades de café (*Coffea* spp.) *O Solo*. 69:26-29

Oliveira, M.R.C.; Corrêa, A.S.; Souza, G.A.d.; Guedes, R.N.C. e Oliveira, L.O.d. 2013. Mesoamerican Origin and Pre- and Post-Columbian Expansions of the Ranges of *Acanthoscelides obtectus* Say, a Cosmopolitan Insect Pest of the Common Bean. *PLoS ONE* 8:7: e70039.

Pendergrast, M. 2010. Uncommon Grounds: The History of Coffee and How It Transformed Our World. 12-38.

Pereira, E.J.G.; Picanço, M.C.; Bacci, L.; Crespo, A.L.B. e Guedes, R.N.C. 2007. Seasonal mortality factors of the coffee leafminer, *Leucoptera coffeella*. Bulletin of Entomological Research. 97: 424-432.

Pereira, S.G.; Padilha, L.; Von Pinho, E.V.R.; Texeira, R.S.; Carvalho, C.H.S.d.; Maful, M.P. e Carvalho, B.L. 2011. Microsatellite markers in analysis of resistance to coffee leaf miner in Arabica coffee. Pesquisa Agropecuária Brasileira. 46: 1650-1656.

Puerta-Quintero, G. 2003. Especificaciones de origen y buena calidad del café de Colombia. Avances Técnicos Cenicafe. 316

Purseglove, J. 1968. Tropical crops. Dicotyledons. John Wilwy e Sons, New York. 718p.

Ramiro, D., Guerreiro-Filho, O., Queiroz-Voltan, R. e Matthiesen, S. 2004. Caracterização anatômica de folhas de cafeeiros resistentes e suscetíveis ao bicho-mineiro. Bragantia. 63: 363-372.

Reis, P. e Souza, J. 1986. Pragas do Cafeeiro. Cultura do Cafeeiro, fatores que afetam a produtividade. Piracicaba. 447p.

Reis, P. e Souza, J. 1996. Manejo integrado do bicho mineiro *Perileucoptera coffeella* (Guérin-Méneville, 1842) (Lepidoptera: Lyonetiidae), e seu reflexo na produção de café. Anais da Sociedade Entomológica do Brasil. 25:77-82.

Rozen, S. e Skaletsky, H.J. 2000. Primer 3 on the WWW for general users and for biologist programmers. Methods in Molecular Biology. 132:365-386.

Sakai, A.K.; Allendorf, F.W.; Holt, J.S.; Lodge, D.M.; Molofsky, J.; With, K.A.; Baughman, S.; Cabin, R.J.; Cohen, J.E.; Ellstrand, N.C.; McCauley, D.E.; O'Neil, P.; Parker, I.M.; Thompson, J.N. e Weller, S.G. 2001. The population biology of invasive species. Annu Rev of Ecol Syst, 32: 305–332.

Simon, C.; Frati, F.; Beckenbach, A.; Crespi, B.; Liu, H. e Flook, P. 1994. 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*. 87: 651–702.

Souza, J.; Reis, P., e Rigitano, O. 1998. Bicho mineiro: Biologia, danos e manejo integrado. Empresa de Pesquisa Agropecuria de Minas Gerais. Belo Horizonte, Brasil.

Statistica. 2015. Global top 10 coffee producing countries from 2012 to 2014. The Statistics Portal. <https://www.statista.com/statistics/277137/world-coffee-production-by-leading-countries/> [acesso 23 de julho de 2015]

Ukers, W. 1922. All about coffee. New York: The Tea and Coffee Trade Journal Company. 25-130.

Veja, F e Posada, F. 2006. Coffee Insects: Ecology and Control. *Encyclopedia of Pest Management*. 1-4.

Von Inhering R. 1912. Nossos cafezais. *Chácaras e Quintais*. 6:1-7.

Walker, D. e Quintana, V. 1969. Mating and oviposition behavior of the coffee leaf miner, *Leucoptera coffeella* (Lepidoptera - Lyonetiidae). *Proceedings of the Entomological Society of Washington* 71:88-90.