

**ZULMA NANCY GIL PALACIO**

**ANÁLISE DA VARIABILIDADE GENÉTICA DA BROCA-DO-CAFÉ,  
*Hypothenemus hampei* NO BRASIL E AVALIAÇÃO DA DISPERSÃO  
LOCAL COM USO DE MARCADOR MOLECULAR**

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

**VIÇOSA  
MINAS GERAIS – BRASIL  
2012**

**Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e  
Classificação da Biblioteca Central da UFV**

T

G463a  
2012

Gil Palacio, Zulma Nancy, 1971-  
Análise da variabilidade genética da broca-do-café,  
*Hypothenemus hampei* no Brasil e avaliação da dispersão  
local com uso de marcador molecular / Zulma Nancy Gil  
Palacio. – Viçosa, MG, 2012.  
x, 67f. : il. (algumas col.) ; 29cm.

Inclui anexos.

Texto em português e inglês.

Orientador: Eraldo Rodrigues de Lima

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.

Inclui bibliografia.

1. *Hypothenemus hampei*. 2. Polimorfismo (Genética).  
3. Diversidade genética. 4. Broca-do-café. I. Universidade  
Federal de Viçosa. II. Título.


CDD 22. ed. 595.768

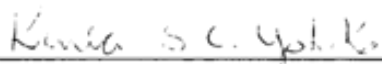
ZULMA NANCY GIL PALACIO

**ANÁLISE DA VARIABILIDADE GENÉTICA DA BROCA-DO-CAFÉ,  
*Hypothenemus hampei* NO BRASIL E AVALIAÇÃO DA DISPERSÃO  
LOCAL COM USO DE MARCADOR MOLECULAR**

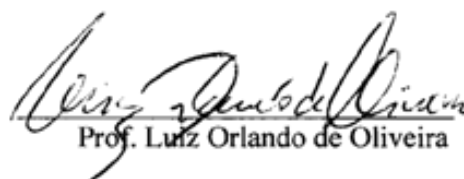
Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Entomologia, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

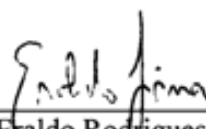
APROVADA: 20 de julho de 2012.

  
Prof. Eliseu José Guedes Pereira

  
Prof. Karla Suemy Clemente Yotoko

  
Dr. Pablo Benavides Machado  
(Co-orientador)

  
Prof. Luiz Orlando de Oliveira

  
Prof. Eraldo Rodrigues de Lima  
(Orientador)

Este trabalho foi realizado em convênio entre o “Centro Nacional de Investigaciones de Café - Cenicafé” (Colômbia), e a Universidade Federal de Viçosa (Brasil).

No Cenicafé, o trabalho foi aprovado sob o código GEN-3411, na qual recebeu o apoio financeiro do Ministério de Agricultura y Desarrollo Rural da Colômbia.

*Ao meu filho Juan Camilo porque, como o próprio Deus me faz conhecer, através do amor, o sentido da vida.*

*A meu esposo Alonso, pelo amor, apoio, compreensão e paciência.*

*Aos meus pais, Efrén (em memória) e Bertha por me mostrarem na vida o valor maior de “ser” e “conhecer”, antes de “ter”. E, em particular, por me ensinar “o que é certo e o que é errado”.*

*Aos meus irmãos e minha inteira família pelo apoio e confiança*

**DEDICO**

## AGRADECIMENTOS

*“À Deus que, compreende a dimensão das minhas conquistas e do meu crescimento através dessa experiência”.*

No término deste trabalho gostaria de manifestar o meu sincero e profundo agradecimento a todas as pessoas que, com o seu apoio, sabedoria, colaboração, palavras de encorajamento, críticas e sugestões contribuíram na sua construção e sem os quais a concretização do presente trabalho e o esforço nele investido teria sido inglório. A todos o meu convicto agradecimento.

Os citados aqui são pela constância e importância pessoal, principalmente na trajetória final desta tese.

Ao Centro Nacional de Investigaciones de café, Cenicafé - Colômbia, instituição onde trabalho, por me conceder a oportunidade de continuar minha formação como entomóloga.

À COLCIENCIAS (El Departamento Administrativo de Ciencia, Tecnología e Innovación) pela concessão da bolsa de estudos.

À Universidade Federal de Viçosa e ao programa de Pós-graduação em Entomologia, pela oportunidade da realização deste curso.

Ao meu orientador, Prof. Eraldo Lima, pela sábia orientação que me facultou e no qual soube escutar com muita atenção e compreensão minhas dúvidas, por sua disponibilidade, sua postura perante a vida, sua simpatia, pelas palavras de incentivo nos momentos “difíceis” e ao seu imenso respeito para com meu ritmo de trabalho.

Ao meu primeiro co-orientador Dr. Pablo Benavides Machado, um dos grandes responsáveis por esta tese, pela participação na minha formação, orientação e amizade ao longo desses anos de convívio.

Ao meu segundo co-orientador, Prof. Og Francisco Fonseca de Souza, pelas críticas e sugestões feitas.

A todos os componentes da banca, pela disponibilidade e paciência em ler e avaliar esta tese.

Ao Dr. Gabriel Cadena Gómez, ex- diretor do Centro Nacional de Investigaciones de Café, Cenicafé – Colômbia, por acreditar em mim e me apoiar para iniciar meus estudos.

Ao Prof. Everaldo Conçalves de Barros (Laboratório de Biologia molecular, da UFV) e Dra. Esther Cecilia Montoya (Biometria, Cenicafé), pela presteza e orientações extras oficiais.

Aos amigos do Laboratório de Feromônios e Comportamento de Insetos da UFV, pela colaboração e amizade.

As estagiárias: Daniela Fontes Gomide e Mariela López pela ajuda na coleta dos dados de laboratório.

Aos pesquisadores e colaboradores do laboratório de BIOCAFÉ da (UFV), pela presteza e apoio para a obtenção dos dados moleculares.

Os colegas e amigos que fizeram parte do meu percurso. Entretanto, expresso meus agradecimentos especiais a eles: Vivian Eliana Sandoval, Kátia Nogueira Pestaña e Leonardo Correa Dasilva da (UFV). Esses agradecimentos são igualmente estendidos aos demais, Carlos Hernán Barrera, Flor Edith Acevedo, Hernando Alfonso Cortina, Fernando García, Juan Vicente Romero, Diego Fabian Montoya, Ricardo Grisales, Stiven Torres e Hernando García.

Á minha maravilhosa Família, aos meus pais Efrén (*em memória*) e Bertha, que tornaram possível meu estudo, com esforço, dificuldades e muito amor. Aos meus irmãos, Gladis, Cenelia, Amilvia, Osvaldo e Wilson, pela união e pela alegria que compartilham comigo a cada conquista, pelo carinho e estímulo fraternal apesar da distância. Aos meus sobrinhos Lina Marcela, Valentina, Juan Esteban, David Leandro, Jhon Hader e Alejandro pela inigualável alegria que sempre me proporcionam.

E finalmente, àqueles que, direta ou indiretamente, contribuíram para a execução deste trabalho, os meus sinceros agradecimentos.

## SUMÁRIO

<b>RESUMO</b> .....	vii
<b>ABSTRACT</b> .....	ix
<b>INTRODUÇÃO GERAL</b> .....	1
<b>OBJETIVO GERAL</b> .....	8
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	9
<b>CAPÍTULO I.</b> Analysis of the variability and genetic structure of populations of the coffee berry borer <i>Hypothenemus hampei</i> (Ferrari) in Brazil using AFLP markers.	
Abstract.....	13
Introduction.....	14
Materials and Methods.....	17
Results.....	20
Discussion.....	26
References.....	31
<b>CAPÍTULO II.</b> Método com uso de marcador molecular para avaliar o movimento da broca-do-café, <i>Hypothenemus hampei</i> (Ferrari).	
Resumo.....	37
Abstract.....	39
Introdução.....	40
Material e Métodos.....	42
Resultados.....	48
Discussão.....	55
Referências bibliográficas.....	59
<b>CONCLUSÕES GERAIS</b> .....	62
<b>ANEXOS</b> .....	63



## RESUMO

GIL PALACIO, Zulma Nancy. D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, julho de 2012. **Análise da variabilidade genética da broca-do-café, *Hypothenemus hampei* no Brasil e avaliação da dispersão local com uso de marcador molecular.** Orientador: Eraldo Rodrigues de Lima. Coorientadores: Everaldo Gonçalves de Barros e Og Francisco Fonseca de Souza.

O estudo do movimento dos insetos em seu hábitat natural é essencial para a compreensão de sua biologia básica, demografia e etologia, além disso, fornece informação importante sobre os mecanismos da dispersão das espécies e sua interação com fatores ambientais. Esse tipo de estudo também auxilia na otimização de programas de manejo integrado e no planejamento de experimentos no campo. Assim, o objetivo geral desta tese foi desenvolver uma metodologia de fácil aplicação para estudar o movimento da broca-do-café, *Hypothenemus hampei* (Ferrari), (Coleoptera: Curculionidae) nas suas condições naturais, para tanto determinamos (i) a variabilidade e estrutura genética das populações da broca-do-café no Brasil, com o objetivo de identificar marcadores moleculares, (ii) desenvolvemos um método para avaliar o movimento de *H. hampei*, com uso de marcador molecular e (iii) estimamos a distância de vôo de esse inseto. O estudo foi conduzido no Brasil e na Colômbia; no Brasil, avaliamos a variabilidade e estrutura genética das populações da broca-do-café usando a técnica AFLP (análise de polimorfismos de comprimento de fragmentos amplificados), os resultados mostraram uma baixa variabilidade genética e pouca diferenciação com as populações colombianas. Portanto, para os estudos do movimento de *H. hampei*, usamos um marcador molecular desenhado previamente em populações etíopes e avaliado nas populações da Colômbia. O desenvolvimento do método para estimar o movimento da broca-do-café, foi realizado em uma lavoura da região central cafeeira colombiana, nos meses de outubro de 2011 a fevereiro de 2012, em uma área experimental de 2353 plantas de (*Coffea arabica* var. Colômbia), distribuídas em 6644 m<sup>2</sup> aproximadamente. As recapturas foram obtidas utilizando os grãos de café como armadilhas. Os resultados mostraram que o marcador molecular microssatélite HHK. 1.6 como método de marcação permitiu realizar avaliações confiáveis do movimento das populações da broca-do-café ao longo do tempo e por várias gerações do inseto. A

maior recaptura ocorreu num raio inferior a 40 m de distância do ponto central da liberação, a distância máxima que se deslocou a broca-do-café foi de 65 m e a função que melhor descreve esta relação, número médio de brocas recapturadas por árvore em função da distância é  $\hat{Y} = \alpha\beta^{x_i}$  onde  $Y$  é número médio de brocas recapturadas por árvore e  $x$  é distância da recaptura em metros. A aplicação desta metodologia para estudar o movimento de *H. hampei* em diferentes condições ecológicas e agrônômicas da cultura do café deve ser viável e contribuirá para predizer o comportamento deste inseto face as variações climáticas e ecológicas.

## ABSTRACT

GIL PALACIO, Zulma Nancy. D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, July, 2012. **Analysis of the variability genetic the coffee berry borer *Hypothenemus hampei* in Brazil and evaluation of local dispersion with use of molecular marker.** Adviser: Eraldo Rodrigues de Lima. Co-Advisers: Everaldo Gonçalves de Barros and Og Francisco Fonseca de Souza.

The study of the movement of insects in their natural habitat is essential to understand its basic biology, demography and ethology, moreover, provides important information on the mechanisms of dispersal of species and their interaction with environmental factors. This type of study also helps in optimization of integrated management programs and planning of field experiments. The objective of this thesis was to develop an easily applicable methodology for studying the movement of the coffee berry borer under natural conditions, was determined for both (i) the variability and genetic structure of populations of the coffee berry borer in Brazil, with the aim of identifying molecular markers, (ii) developed a method to evaluate the movement of *H. hampei*, using molecular marker and (iii) estimated the distance of flight of this insect. The study was conducted in Brazil and Colombia, in Brazil, we evaluated the variability and genetic structure of populations of the coffee berry borer using AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism,), the results showed a low genetic variability and little differentiation with the Colombian population. Therefore, studies for the movement of *H. hampei*, we used molecular markers designed previously and Ethiopian populations evaluated in the populations of Colombia. The development of the method to estimate the movement of the coffee berry borer, was held on a farm in the central Colombian coffee, from October 2011 to February 2012, in an experimental area of 2353 plants of (*Coffea arabica* var. Colombia), distributed in approximately 6644 m<sup>2</sup>. The recaptures were obtained using coffee beans as traps. The results showed that the microsatellite molecular marker HHK. 1.6 allowed reliable assessments of the movement of populations in the coffee berry borer through time and across generations of the insect. The largest recaptures occurred within a radius of less than 40 m away from the central point of release, the maximum distance traveled to coffee berry borer was 65 m and the function that best describes this

relationship, recaptured average number of borer per tree depending on the distance is  $\hat{Y} = \alpha\beta^{X_i}$  where  $Y$  is the average of borers per tree recaptured and  $X$  the distance expressed in meters. Application of this methodology for studying the movement of *H. hampei* in different ecological and agronomic conditions of the crop must be viable and help to predict the behavior of this insect.

## 1- INTRODUÇÃO GERAL

O café, *Coffea arabica* Linneaus, é uma das maiores matérias primas no mundo depois do petróleo, e, além disso, é a bebida mais popular do globo. O café é endêmico da Etiópia e sua cultura aumenta atualmente, sobretudo nos países em via de desenvolvimento da África, Ásia, América, e nas Ilhas Caribenhas. Estima-se que o sustento de aproximadamente 25 milhões de famílias depende totalmente da produção do café (Benavides 2003).

A indústria do café atualmente faz frente à ameaça de um inseto de grande importância econômica, *Hypothenemus hampei* (Ferrari) (Coleoptera: Curculionidae) (Le Pelley 1968). Este inseto é endêmico da África Central e foi descrito por Ferrari em 1867 (Baker 1999). O dano econômico causado é manifestado pela diminuição da produção, perda do valor comercial do grão e incrementos nos custos da produção (Benavides & Arévalo 2002, Benavides *et al.* 2002).

*H. hampei* foi introduzido no continente americano em 1913, importado em sementes do Congo ou de Java ao Brasil (Bergamin 1946). Em meados dos anos 50, este inseto dispersou-se na maioria dos países produtores de café na América do Sul. Foi introduzido na Colômbia em 1988, provavelmente do Equador (Bustillo *et al.* 1998) e atualmente está presente em todas as regiões produtoras de café de aquele país.

Devido á sua importância econômica e ao surgimento de resistência ao endossulfan, têm-se buscado alternativas para seu combate, como o desenvolvimento de um programa de manejo integrado da broca (MIB), que inclui o controle biológico e cultural além de estudos da dinâmica populacional do inseto incluindo genética de populações.

Para o desenvolvimento de um programa de manejo integrado é indispensável o conhecimento dos aspectos biológicos e ecológicos do inseto, como o ciclo de vida, hábitos, comportamento reprodutivo, dinâmica populacional, relação com os diferentes componentes climáticos e o movimento dos indivíduos no espaço e no tempo, entre outros. Desta forma, a integração deste conhecimento deve gerar estratégias para um controle mais efetivo.

Para quantificar o movimento dos insetos, existem diferentes métodos (Southwood 2000), os quais se agrupam em estudos de laboratório e ou de campo com insetos marcados ou com populações não marcadas. Segundo Hagler & Jackson (2001), a técnica de marcação-liberação-recaptura é usada em grupos de indivíduos para conhecer populações, realizar estudos de dispersão, determinar a dinâmica populacional, territorialidade, nível de interações tróficas e outros aspectos ecológicos dos insetos. Para isso, uma ampla variedade de marcadores podem ser utilizados (pinturas, tintas, pó, radioisótopos, mutilação física, rotulagem e marcadores moleculares).

Os marcadores moleculares são sequências de DNA que podem ser ferramentas valiosas para a detecção e uso da diversidade genética, para estudos da biologia, ecologia, genética de populações e manejo de pragas (Rocha 2003, Hoy 2003). Uma ampla gama de marcadores moleculares encontra-se disponíveis para pesquisas entomológicas (RFLPs, RAPDs, AFLPs, microssatélites, entre outros) e podemos desenvolver e empregar facilmente inclusive em insetos pequenos como afídeos, tripes, vespas parasitoides, entre outros, os quais facilitam o estudo das diversas áreas da biologia e ecologia (Loxdale & Lushai 1998).

O movimento da broca-do-café em seu hábitat natural ainda não foi avaliado, assim, é de importância conhecer este comportamento do inseto nas diferentes condições ecológicas e agronômicas da cultura do café e face as variações climáticas e ecológicas. Diante do exposto, o objetivo geral desta tese foi desenvolver uma metodologia de fácil aplicação para estudar o movimento de *H. hampei* nas suas condições naturais.

### **1.1. A broca-do-café**

A broca-do-café *Hypothenemus hampei* tem sido descrita como uma das pragas mais importantes da cultura cafeeira no mundo (Baker *et al.* 1992, Murphy & More 1990). Este inseto causa sérias perdas na produção e na qualidade do café ao infestar os grãos em desenvolvimento, os quais fornecem à broca um lugar para criar sua progênie, acasalar-se e proteger-se de predadores e condições climáticas pouco favoráveis (Le Pelley 1968).

A broca-do-café passa a maior parte de seu ciclo de vida dentro do fruto, a exceção do curto período de tempo em que as fêmeas voam a procura de novos grãos para infestar. As fêmeas adultas emergem dos grãos infestados e colonizam outros frutos novos onde ocorre a oviposição. Cada fêmea coloca uma média de 74 ovos. O ciclo de vida total é de aproximadamente 30 dias (24,5°C) e as fêmeas vivem até 150 dias (Bergamin 1943). O comportamento reprodutivo de *H. hampei* assegura um alto nível de endogamia. A razão sexual estimada é de 10:1 a favor das fêmeas (Bergamin 1943). As fêmeas acasalam dentro do grão com seus irmãos que não têm a capacidade de voar, de modo que deixam o grão já fertilizadas.

A amplitude de hospedeiros da broca-do-café está limitada às espécies do gênero *Coffea* e seu ciclo biológico é estritamente dependente da planta de café. Estudos feitos por Mathieu *et al.* (1997) evidenciaram que a dinâmica das populações da broca ao longo do ano pode ser dividida em três fases: (i) fase de estabelecimento, caracterizada pelo movimento do inseto de grãos da safra anterior para os primeiros grãos que começam amadurecer na safra seguinte; (ii) fase de multiplicação; e (iii) fase inter-estações, caracterizada como período pós-colheita, em que a maioria dos grãos que ficam na cultura estão secos, embora apareçam alguns grãos verdes na planta.

Este último período é crucial para a dinâmica subsequente das populações de *H. hampei*, porque as populações em grãos secos constituem um refúgio através do qual ocorre a re-infestação, e os grãos verdes, embora não forneçam um substrato adequado para a oviposição, representam a única fonte de nutrição disponível para as fêmeas. Durante esta terceira fase, a sobrevivência da broca depende da sua capacidade de localizar um lugar adequado o quanto mais rápido possível.

## **1.2. Distribuição e dispersão da broca-do-café**

*Hypothenemus hampei* tem invadido a maioria dos países produtores de café no mundo inteiro. Segundo Benavides *et al.* (2006), a espécie *H. hampei* foi observada pela primeira vez em 1901 nas sementes transportadas do Congo para a França, ainda que este inseto fosse reportado na República Democrática do Congo

em 1903 (Leplae 1928). Entre 1902-1904, foi reportada na África Central, e depois em 1908 foi encontrada causando danos graves em colheitas de café na Uganda (Bustillo *et al.* 1998).

No continente americano a broca foi introduzida no Brasil no ano de 1913 e reportada só no ano de 1922, acredita-se que a origem desta introdução tenha sido a Java (Indonésia) e Congo (África) (Bergamin 1946). A dispersão da broca pelo resto da América começou em 1960 quando foi detectada no Suriname e no Peru (Amaral 1963, Bustillo *et al.* 1998), o período mais dinâmico desta dispersão ocorreu entre 1970 e 1988 quando a broca invadiu 60% do território de todos os países americanos produtores de café que nessa data tinham sido invadidos (El Cafe de Nicaragua 1978, Hernandez & Sanchez 1978, El Café de Nicaragua 1979, Reid 1983, Decazy 1987, Bustillo 1990, Romero 1990, Monterrey 1991, Ruales 1997, Bustillo *et al.* 1998).

Segundo Benavides *et al.* (2005), a dimensão da dispersão da broca não foi ainda avaliada, mas existem relatos sobre estudos que envolvem parâmetros da dispersão. A broca voa pouco e o modo de transporte mais comum é sobre as roupas e ferramentas dos trabalhadores em plantações infestadas. No entanto, existe uma proporção de adultos que voa e se dispersa causando infestações nas culturas adjacentes (Bustillo 2002). O vôo inicial das fêmeas é ascendente ao encontro de correntes de ar que as deslocam a outros lugares afastados até 500 m; constituindo-se uma evidência de que a broca emigra e causa infestação severa em áreas circundantes onde se encontra agregadamente (Ruiz 1996). Desta maneira, a broca é um inseto que tem capacidade de vôo, e precisa desta capacidade para encontrar novos grãos para sua alimentação e oviposição (Alonzo 1984). Esta dispersão é diretamente afetada por fatores bióticos e abióticos, entre estes últimos, os mais limitantes são a umidade e a temperatura.

### **1.3. Dispersão da broca-do-café no Brasil**

Segundo Bergamin (1958), o ataque iniciou-se em Campinas, supostamente pela introdução de 1913 de sementes importadas de Java (Indonésia), do Congo (África) ou das duas regiões ao mesmo tempo. De Campinas, estendeu-se a zonas concêntricas do estado de São Paulo. Até o ano



1930, o avanço foi lento devido às medidas de controle. Posteriormente a broca avançou para quase todos os municípios paulistas e penetrou na região de Minas de Gerais (MG).

Em 1939, a broca atingiu os municípios paranaenses de Jacarezinho e Ribeirão Claro; um pouco mais tarde, começou a avançar por quase todo o norte do Paraná. Os municípios fluminenses e do sul de Minas de Gerais foram severamente infestados de Vassouras-Valença até S. Fidelis-Itaperuma, alcançando a infestação também os municípios de Muriaé, Carangola e outros. Pouco mais tarde a praga alcançou o sul do Espírito Santo (ES) os municípios de Itabapoana e Mimoso. Entre 1944-1945 foi encontrada no Vale do Rio Doce, em Baixo Guandu (ES) e Aimoré (MG). Em 1946-1947 foi encontrada na Bahia (BA) na região de Jequié e no ano de 1957 foi registrada em Serra do Baturité, Ceará e Guaramiranga (Fortaleza).

#### **1.4. Diversidade genética da broca-do-café**

O uso de técnicas moleculares permite obter avanços significativos no entendimento dos aspectos básicos da biologia da broca; no entanto, a genética deste inseto não tem sido amplamente estudada. Alguns autores têm desenvolvido pesquisas com o objetivo de detectar mutações relacionadas com o desenvolvimento da resistência ao inseticida endossulfan (Brun *et al.* 1989, French-Constant *et al.* 1994) e o mecanismo da dispersão deste gene (Brun *et al.* 1995). Além disso, vários autores relataram algumas medidas de variabilidade genética das populações da broca usando técnicas moleculares para detectar diferenças em locus individuais (Borsa & Gingerich 1995, Gingerich *et al.* 1996, Andreev *et al.* 1998).

Benavides *et al.* (2005) avaliaram, mediante a técnica AFLP (Amplified Length Fragment Polymorphism), a diversidade genética e biogeografia da broca-do-café a partir de uma coleção de 101 amostras de brocas coletadas em 17 países da África, Ásia, e América. Seis combinações de primers *EcoRI/MseI* foram selecionados com base em estudos preliminares contendo 73 amostras de 12 países (Benavides 2003), o que permitiu detectar diferenças genéticas de apenas  $2,8 \pm 3,6\%$  de média por país, mas 22,4% de diferenças entre todas as combinações de iniciadores em todos os países.

A maior variação foi observada nas amostras provenientes do leste da África, onde acreditam é o centro de origem deste inseto. As duas combinações de iniciadores mais informativas foram em seguida usadas para identificar a variabilidade genética da totalidade das amostras. Somente 26 impressões digitais foram descobertas. Uma análise de variação molecular (AMOVA) evidenciou que a broca se reproduz em linhagens maternas, sugerindo assim que sua capacidade genética a resistir medida eficiente de controle poderia ser limitada.

Segundo Benavides (2003), o grande número de linhagens descobertas em duas propriedades do Brasil, evidencia que este país é o local onde a broca foi introduzida pela primeira vez nas Américas. A dispersão de *H. hampei* do Brasil para o resto da América Latina pode ser evidenciada pela presença das linhagens FP06 (presente em 16 amostras) e FP15 (presente em 13 amostras) que compreendem amostras do Brasil e outros países americanos.

A linhagem FP06 não foi detectada na América Central e outras linhagens que foram achadas em outros países americanos não foram descobertas no Brasil. Por exemplo, FP12 (presente em oito amostras) que foi achado só no Peru e na Colômbia e FP01 (presente em 18 amostras) que foi detectada no México e na Costa Rica.

Para explicar a razão pela qual estas linhagens não estiveram presentes no Brasil, se deve levar em conta o baixo tamanho das amostras analisadas neste país. No entanto, a possibilidade de introduções separadas não pode ser eliminada destas análises baseadas só na distribuição de linhagem de *H. hampei* (Benavides *et al.* 2006).

Após se avaliar a variabilidade genética da broca-do-café a partir de amostras provenientes de vários países do mundo, um novo trabalho foi desenvolvido para confirmar a natureza das introduções múltiplas de diferentes linhagens na Colômbia. Para isso, a variabilidade genética da broca foi avaliada na Colômbia por meio de perfis genéticos de 66 amostras de DNA da broca provenientes de 16 regiões cafeeiras com a técnica AFLP (Benavides *et al.* 2006), usando as duas combinações seletivas que mostraram os resultados mais polimórficos em estudos prévios realizados por Benavides (2003).

Os resultados revelaram uma baixa variabilidade genética nas amostras colombianas (11.7%), mas com suficientes polimorfismos para realizar

comparações entre regiões. Destes resultados deduziu-se que a broca invadiu a Colômbia provavelmente a partir de introduções múltiplas provenientes do Peru, Equador e Brasil. Encontrou-se ademais uma linhagem da broca predominante em todos os estados biológicos avaliados, a qual pode ter-se dispersado como adultos ou em sementes infestadas transportadas pelos colhedores de café durante as safras.

As populações da broca das diferentes regiões cafeeiras do Brasil aonde chegou inicialmente a broca são a base para realizar estudos da variabilidade genética em *Hypothenemus hampei* e procura de marcadores moleculares neste país, como ferramenta para desenvolver os estudos do movimento deste inseto.

### **1.5. Técnicas para quantificar o movimento dos insetos**

Vários métodos são usados para quantificar o movimento das populações de insetos: (i) técnica de marcação-liberação-recaptura; (ii) captura de espécimes marcados naturalmente; (iii) captura durante o movimento progressivo; e (iv) presença de indivíduos que podem não ser da localidade (Reynolds *et al.* 1997).

Pelas características da broca-do-café (tamanho e hábitos) o método mais apropriado é marcação-liberação-recaptura; no qual os insetos são coletados no campo ou criados em laboratório, marcados e liberados. Logo as populações são amostradas em vários períodos de tempo após da liberação. A vantagem deste método é que se conhece o tempo da liberação e o número de indivíduos marcados, ao conhecer ambos os parâmetros pode-se ter acesso a modelos de movimento (Southwood 2000).

Segundo Reynolds *et al.* (1997) o marcador a empregar não deve afetar a população, ser seguro ao meio ambiente, de fácil identificação e aplicação, de baixo custo e durável para o experimento. A seleção do marcador depende do inseto, do meio ambiente e da natureza do experimento.

Os grupos de insetos podem ser marcados com pinturas, tintas, pós, radioisótopos, mutilação física, rotulado e com uso de marcadores moleculares. Os estudos tradicionais realizados com marcadores físicos como pós ou tintas só permitem monitoramento dos espécimes por uma geração, e sua utilização se

dificulta em espécies muito pequenas. Uma alternativa nestes casos tem sido o desenvolvimento de marcadores moleculares, os quais podem ser utilizados em espécies microscópicas e por várias gerações (Acevedo *et al.* 2009).

Segundo Robledo & González (2009) os marcadores moleculares são ferramentas úteis para o estudo do movimento nos diferentes níveis ecológicos. Usa-se com frequência a modo de etiquetas de identificação individual ou 'códigos de barras', permitem estabelecer relações de parentesco entre indivíduos, determinar a origem das populações emigrantes e caracterizar o padrão espacial da dispersão dos organismos. Além disso, proporcionam informação histórica sobre as taxas de migração entre populações; em ecologia evolutiva, são importantes para estudar o padrão e a dinâmica espacial dos genes e sua interação com os fatores ambientais.

Uma ampla variedade de marcadores moleculares encontra-se disponíveis para pesquisas entomológicas (RAPD, RFLP, AFLP, minissatélite, microssatélites e outros). Estes marcadores se diferenciam na qualidade e quantidade de variabilidade que expressam, na aptidão para cada estudo em particular, na facilidade, e custo para sua aplicação (Robledo & González 2009).

As características do comportamento e hábitos de *H. hampei* tornam difícil a escolha de uma técnica adequada de marcação para os estudos de movimentação neste inseto. Segundo Acevedo *et al.* (2009) o uso de marcadores moleculares permitiram realizar avaliações confiáveis do movimento das populações da broca-do-café através do tempo e por várias gerações.

Diante do exposto, esta tese teve como objetivo geral desenvolver uma metodologia de fácil aplicação para estudar o movimento da broca-do-café nas suas condições naturais. Os objetivos específicos correspondem a cada capítulo da tese: Capítulo I; analisar a variabilidade e estrutura genética das populações da broca-do-café no Brasil e buscar marcadores moleculares para avaliar seu movimento. Capítulo II; descrever uma metodologia para avaliar o movimento da broca-do-café, com uso de marcador molecular.

A formatação da tese encontra-se organizada sob a forma de capítulos, como disposto no item 1.2 das normas para a redação de teses dessa instituição.

## 2. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Acevedo B., F.E.; Gil P., Z.N.; Bustillo P., A.E.; Montoya R., E.C.; Benavides M., P. 2009.** Evaluación de marcadores físicos y moleculares como herramientas para el estudio de la dispersión de *Hypothenemus hampei*. *Cenicafé* 60 (1): 72-85.
- Alonzo P, F. R. 1984.** Aspectos ecológicos de la broca *Hypothenemus hampei* (Coleoptera: Scolytidae). En: El problema de la broca (*Hypothenemus hampei*, Ferr.) (Coleoptera: Scolytidae) y la caficultura: Aspectos relacionados con importancia, daño, identificación, biología, ecología y control. Programa regional de mejoramiento de la caficultura. San José (Costa Rica), IICA PROMECAFE, 71-136.
- Amaral, S. F. 1963.** El gorgojo de la cereza del café “Broca” y su combate. *Café Peruano*, 1, 8-20.
- Andreev, D.; Breilid, H.; Kirkendall, L.; Brun, L. O.; Ffrench-Constant, R. H. 1998.** Lack of nucleotide variability in a beetle pest with extreme inbreeding. *Insect Molecular Biology*, 7, (2), May, 197-200.
- Baker, P. S.; Ley, C.; Balbuena, R.; Barrera, J.F. 1992.** Factors affecting the emergence of *Hypothenemus hampei* (Coleoptera: Scolytidae) from coffee berries, Mexico, *Bulletin Entomological Research*, 82, 145-150.
- Baker, P.S. 1999.** The coffee berry borer in Colombia; final report of the DFID – Cenicafé – CABI Bioscience IPM for coffee project (CNTR 93/1536A). Cenicafé, Chinchiná, Colombia.
- Benavides, P.; Arévalo, H. 2002.** Manejo Integrado: una estrategia para el control de la broca del café en Colombia. *Cenicafé* (Colombia), 53, 50-59.
- Benavides, P.; Bustillo, A.E.; Montoya, E.C.; Cárdenas, R.; Mejía, G. 2002.** Evaluación de los métodos de control cultural, químico y biológico en el manejo integrado de la broca del café. *Revista Colombiana de Entomología* (Colombia), 28, 247-253.
- Benavides, P. 2003.** Genetic Variation and global distribution of a highly inbred insect-pest of coffee, the coffee berry borer, *Hypothenemus hampei* (Coleoptera: Scolytidae). West Lafayette (Estados Unidos), 95p. Thesis (Doctor in Philosophy). Purdue University.

- Benavides M., P.; Vega, F.E.; Romero S., J.; Bustillo P., A.E.; Stuart, J. 2005.** Biodiversity and biogeography of an important inbred pest of coffee, coffee berry borer (Coleoptera: Curculionidae: Scolytinae). *Annals of the Entomological Society of America* (Estados Unidos), 98(3), 359-366.
- Benavides M., P.; Stuart, J.; Vega, F.E.; Romero S., J.; Bustillo P., A.E.; Navarro E., L.; Constantino C., L.M.; Acevedo B., F.E. 2006.** Genetic variability of *Hypothenemus hampei* in Colombia and design of molecular markers. In: COLLOQUE Scientifique International sur le Café, 21. Montpellier (Francia), Septiembre 11-15, Paris (Francia), ASIC, p165.
- Bergamin, J. 1943.** Contribuição para o conhecimento da biologia da broca do café *Hypothenemus hampei* (Ferrari, 1867) (Col. Ipidae). *Arquivos do Instituto Biológico, Brasil*, 14, 31-72.
- Bergamin, J. 1946.** A broca do café no Brasil. *Boletim da Superintendência dos Serviços do Café, Brasil*, 33, 21-22.
- Bergamin, J. 1958.** A broca do Café no Brasil. *Boletim da Superintendência dos Serviços do Café* 33: 382, 21-22.
- Bustillo P., A.E. 1990.** Perspectivas de manejo integrado de la broca del café en Colombia. *Seminário Sobre la Broca del Café. Sociedad Colombiana de Entomología- SOCOLEN, Medellin, Colombia*, 106-118.
- Bustillo P., A.E.; Cárdenas, R.; Villalba, D.; Benavides, P.; Orozco, J.; Posada, F.J. 1998.** Manejo integrado de la broca del café *Hypothenemus hampei* (Ferrari) en Colombia. *Cenicafé, Chinchiná, Colombia*.
- Bustillo P., A.E. 2002.** El manejo de cafetales y su relación con el control de la broca del café en Colombia. *Boletín Técnico Cenicafé, Chinchiná (Colombia)*. No. 24, 40p.
- Borsa, P.; Gingerich, D. P. 1995.** Allozyme variation and an estimate of the inbreeding coefficient in the coffee berry borer, *Hypothenemus hampei* (Coleoptera: Scolytidae). *Bulletin of Entomological Research*, 85, 21-28.
- Brun, L.O.; Marcillaud, C.; Gaudichon, V.; Suckling, D.M. 1989.** Endosulfan resistance in coffee berry borer *Hypothenemus hampei* (Coleoptera: Scolytidae) in New Caledonia. *Journal of Economic Entomology*, 82, 1311-1316.

- Brun, L.O.; Stuart, J.; Gaudichon, V.; Aronstein, K.; Ffrench-Constant, R. H. 1995.** Functional haplodiploidy: A mechanism for the spread of insecticide resistance in an important international insect pest. Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 92, 9861-9865, October.
- Decazy, B. 1987.** Control de la Broca del fruto del cafeto *Hypothenemus hampei* Congreso Sobre el Cultivo del Café. ISIC-AIDE, San Salvador, El Salvador.
- El Café de Nicaragua, Alarma en México. 1978.** Aparece la broca del café. El Café de Nicaragua, Nicaragua, p 14.
- El Café de Nicaragua. 1979.** Insectos y ácaros del follaje. El Café de Nicaragua (Nicaragua), 4-10.
- Ffrench-Constant, R.H.; Steichen, J.C.; Brun, L.O. 1994.** A molecular diagnostic for endosulfan insecticide resistance in the coffee berry borer *Hypothenemus hampei* (Coleoptera: Scolytidae). Bulletin of Entomological Research, 84, 11-16.
- Gingerich, D.P.; Borsa, P.; Suckling, M.; Brun, L.O. 1996.** Inbreeding in the coffee berry borer, *Hypothenemus hampei* (Coleoptera: Scolytidae) estimated from endosulfan resistance phenotype frequencies. Bull. Entomol. Res., 86, 667-674.
- Gauthier N.; Rasplus, J.Y. 2004.** Polymorphic microsatellite loci in the Coffee Berry Borer, *Hypothenemus hampei* (Coleoptera, Scolytidae). *Molecular Ecology Notes* 4 294–296.
- Hagler, J. ; Jackson, G. 2001.** Methods for marking insects: Current techniques and future prospects. Annual Review of Entomology, 46, 511-543.
- Hernández, P.; Sánchez, L. 1978.** La broca del fruto del café. Guatemala. Revista Cafetalera (Guatemala), 174, 11-26.
- Hoy, M.A. 2003.** Insect molecular genetics; an introduction to principles and applications. 2. ed. Amsterdam (Holanda), Academic Press, 544 p.
- Le Pelley, R.H. 1968.** Pests of Coffee. Longmans, Green & Co., Ltd., London.
- Lepiae, E. 1928.** Le scolyte des baies du caféier (*Stephanoderes*). Bulletin Agricole du Congo Belge, 19, 271-276.
- Loxdale, H. D.; Lushai, G. 1998.** Molecular markers in entomology. Bulletin of Entomological Research, Wallingford, 88, (6), (Oct.-Dec.), 577–600.

- Mathieu, F.; Brun, L. O.; Frérot, B. 1997.** Factors related with native host abandon by the coffee berry borer. *Journal of Applied Entomology*, Berlin, 121, 3, 175-180.
- Monterrey, J. 1991.** La broca del café en Nicaragua I Reunión Intercontinental sobre Broca del Café, Tapachula, Chiapas, México, 28-30.
- Murphy, S.T.; Moore, D. 1990.** Biological control of the coffee berry borer, *Hypothenemus hampei* (Ferrari) (Coleoptera:Scolytidae): previous programmes and possibilities for the future. *Biocontrol News and Information*, 11, 107–117.
- Reid, J.C. 1983.** Distribution of the coffee berry borer *Hypothenemus hampei* within Jamaica, following its discovery in 1978. *Trop. Pest Manage*, 29, 224-23.
- Reynolds, D. R.; Riley, J. R.; Armes, N. J.; Cooter, R.J.;Tucker, M.R.;Colvin, J. 1997.** Techniques for Quantifying Insect Migration. *Methods in Ecological and Agricultural Entomology*. CAB International. Wallingford (Inglaterra), 11-133.
- Robledo A., J.J.; González M., S.C. 2009.** Marcadores moleculares y ecología del Movimiento. *Ecosistemas* 18 (1): 44-51.
- Rocha S, P. J. 2003.** Marcadores moleculares, una herramienta útil para la selección genética de palma de aceite. *Revista palmas*, 2 (24).
- Romero, H. 1990.** La broca del café. Guía técnica. Proyecto agroyungas ad/bol/84/405, 25.
- Ruales, C. 1997.** Aspectos generales sobre la broca del café en Ecuador. *Café y Cacao: Noticias (Ecuador)*, 2, 7-11.
- Ruiz C., R. 1996.** Efecto de la fenología del fruto del café sobre los parámetros de la tabla de vida de la broca del café; *Hypothenemus hampei* (Ferrari). Tesis (Ingeniero Agrónomo) Universidad de Caldas, Facultad de Ciencias Agropecuarias, programa de Agronomía. Manizales (Colombia), 87p.
- Southwood T.R.E.; Henderson P.A. 2000:** *Ecological Methods* (3rd Edition). Blackwell Science, Oxford. 575 pp.



## CAPÍTULO I

### **Analysis of the variability and genetic structure of populations of the coffee berry borer *Hypothenemus hampei* (Ferrari) in Brazil using AFLP markers**

**Zulma Nancy Gil P.<sup>1</sup>, Eric Hernández H.<sup>2</sup>, Pablo Benavides Machado<sup>2</sup>, Kátia Nogueira Pestana<sup>3</sup>, Daniela Fontes Gomide<sup>1</sup>, Eraldo Lima<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Departamento de Entomologia, Universidade Federal de Viçosa. Minas Gerais, Brasil, CEP 36571-000, [zulma.gil@cafedecolombia.com](mailto:zulma.gil@cafedecolombia.com), <sup>2</sup>Disciplina de Entomología, Centro Nacional de Investigaciones de Café – Cenicafé, Chinchiná, Caldas, Colombia, <sup>3</sup>Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento, Universidade Federal de Viçosa. Minas Gerais, Brasil, CEP 36571-000.

#### **Abstract**

The genetic variability of the coffee berry borer *Hypothenemus hampei* (Ferrari) (Coleoptera: Curculionidae) was evaluated in populations from Brazil using amplified fragment length polymorphism (AFLP). DNA samples from 15 coffee sites in Brazil were evaluated. Low genetic variability was observed, but enough polymorphisms to determine the genetic structure of *H. hampei* populations in Brazil. The results of this investigation allow the classification of populations of *H. hampei* in Brazil into three genetic branches, with a marginal value of directional gene flow of 6% between groups one and two and the absence of migrants from groups two and three. Of the total genetic variation of the coffee berry borer in Brazil, 96% is within populations. The total population differentiation values ( $F_{ST} = 0.1679$ ) were high; however, heterogeneity was observed in the  $F_{ST}$  values when performing pairwise comparisons of populations. The average percentage of polymorphic loci was 16.89% among all of the populations, and the highest values were observed in the Uberlândia region (36.36%), which also harbored the highest number of unique AFLPs fingerprints (seven). The coffee berry borer of this region could serve in the development of

molecular markers for studies of the ecology and biology of the coffee berry borer in Brazil.

Key words: Bayesian analysis, Coffee pest, Genetic structure, Molecular markers.

## INTRODUCTION

The coffee berry borer, *Hypothenemus hampei* (Ferrari) (Coleoptera: Curculionidae), is one of the most significant pests in coffee cultivation worldwide (Baker *et al.* 1992; Murphy and Moore 1990). *H. hampei* causes severe losses in coffee production and quality by infesting developing berries, which provide a suitable place for the coffee berry borer to reproduce, rear offspring and seek protection from predators and adverse weather conditions (Le Pelley 1968).

Similarly to coffee itself, *H. hampei* originated in Africa and has extended its range as cultivation has expanded; the coffee berry borer is now prevalent in more than 59 countries that produce this commodity, with the exceptions of Nepal and Papua New Guinea (Vega *et al.* 2009). The most recent introduction of *H. hampei* was documented in 2010 on several farms in the Kona region of Hawaii (García 2010).

The mating system of the coffee berry borer meets assumptions for to be considered a local mate competition (LMC) species; briefly, after colonization by only a foundress female, the progeny is shaped by female-biased sex brood where brothers compete for mating opportunities resulting in selection for a female-biased sex ratio within local groups. This reproductive system result in a combination of full-sib mating and pseudo-arrhenotoky where beetles complete total development inside host like a gregarious group from eggs to adults that strongly suggests that *H. hampei* reproduces in strict matrilineal lines. Additionally, males do not fly outside of his ecological patch, and mates occurs like pre-dispersal events which promotes homozygosity and causes low genotypic variability (Borsa and Gingerich 1995). This characteristic is accentuated by the potential mechanism of "functional haplodiploidy" in which both males and

females are diploid, but the latter fail to express and transmit paternal chromosomes (Brun *et al.* 1995).

The genetics of *H. hampei* have not been studied extensively. Studies on the variability and genetic structure of this species were conducted by Borsa and Gingerich (1995), who used allozymes to find variations in the coffee berry borer populations of New Caledonia and the Ivory Coast at two loci, Mdh-2 and Mpi, in 88 and 21 insects of seven and four populations, respectively. These authors also reported a high level of inbreeding ( $F_{IS} = 0.298$ ) and an average genetic variability of  $H = 0.080$ . These results were confirmed in Africa by Gauthier and Rasplus (2004), who isolated seven polymorphic microsatellites from *H. hampei* and evaluated them in coffee berry borer populations collected in Nairobi, Kenya and Jima, Ethiopia. A low genetic diversity per locus was observed, with between two and five alleles in 39 individual samples, a deficit of heterozygosity in the population averaging  $H_O = 0.10/H_E = 0.50$  and a high inbreeding coefficient ( $F_{IS} = 0.70-1.00$ ).

Using the amplified fragment length polymorphism (AFLP) technique, Benavides *et al.* (2005) studied the diversity and biogeography of *H. hampei* in coffee berry borer samples in 17 countries (within Africa, Asia and America) and found a low genetic variability of this insect (10% average polymorphism per sample), confirming the findings of Borsa and Gingerich (1995), Gingerich *et al.* (1996), Andreev *et al.* (1998) and Damon (2000). In the same study, Benavides *et al.* (2005) reported the introduction of three genetic lineages onto the American continent, either through independent introductions of several lineages or a single introduction of multiple lineages, and at least two lineages were first introduced to Brazil and subsequently dispersed throughout the Americas.

The results of Benavides *et al.* (2005) are consistent with the colonization history of the pest in Brazil (Bergamin, 1945) and support the hypothesis that Brazil is the origin of this insect in the Americas. This model is substantiated by Gauthier (2010), who analyzed microsatellite markers in 683 individuals collected from 37 locations in 18 countries and identified four genetic populations, K1 to K4. The samples from Brazil are the basis of the K3 (American) group, comprising Central

American (except Jamaica) and South American countries (Colombia and Brazil). In group K3, two subpopulations were identified, in which all of the individuals in Brazil were assigned to subgroup K3a, and those belonging to other countries were assigned to subgroup K3b.

Previous reports support the conclusion that the introduction of *H. hampei* from Africa to the Americas occurred in Brazil and Jamaica and that Brazil is the origin of the American coffee berry borer, although coffee berry borer AFLP DNA fingerprints reported elsewhere in the Americas have not been found in Brazil, which may be due to the low number of samples tested. Therefore, including a larger number of samples from this country in further studies of the genetic diversity of the coffee berry borer will be useful in the search for polymorphisms for the development of markers as tools for molecular biological, ecological (studies of dispersion) and genetic research on this insect.

A range of techniques and markers has been developed to estimate genetic diversity, but there is no universal standard, and the choice of technique depends on the type of study to be performed (Ulrich and Wolfenbarger 1999). Because the coffee berry borer is highly inbred and has very low genetic variability, sensitive techniques, such as the analysis of AFLP markers, are required, which allow the evaluation or determination of the percentages of polymorphisms of dominant loci throughout the genome and are useful for establishing the relationships between genomic DNA samples and for finding genetic markers (Vos *et al.* 1995). When using dominant markers, such as AFLP, it is recommended that several approaches be used to estimate population differentiation, thus providing greater confidence in data interpretation (Bonin *et al.* 2007), in this way, AFLP markers result in a economic and powerful tool in species where little genomic information exist generating a lot of information, even though dominant inheritance, using advanced method of analysis accounts appropriately for the genotypic ambiguity inherent in dominant markers given that other structure assumptions are met (Falush *et al.* 2007).

The aim of this study was to characterize the genetic variability and population structure of the coffee berry borer in Brazil. It is hypothesized that all of the lineages arrived in Brazil and then dispersed and colonized areas throughout the country and, therefore, should have the greatest genetic variability.

## MATERIALS AND METHODS

### *Insect samples*

*H. hampei* samples were obtained from 15 coffee regions in Brazil in six states (Figure 1). At each region, we collected 50 coffee beans infested by the coffee berry borer that only had a single hole. A fertile female was extracted from each berry to start a breeding stock on the artificial diet described by Portilla (1999) and to obtain enough individuals for the extraction of genomic DNA.

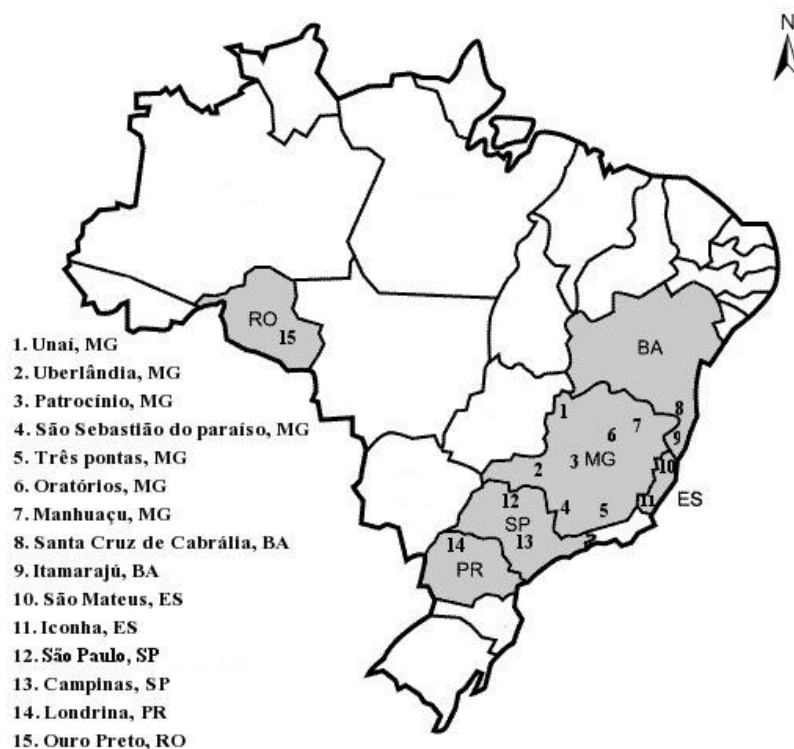


Figure 1. Map showing the locations of the 15 studied populations of *Hypothenemus hampei* in Brazil (Bahia, BA; Minas Gerais, MG; Espírito Santo, ES; São Paulo, SP; Paraná, PR; Rondônia, RO).

## METHODS

### *Isolation and quantification of genomic DNA*

For this procedure, ten samples of *H. hampei* were taken from each location (n = 150), each sample was constituted by a pool of 30 individuals. Total genomic DNA was extracted from each sample using the DNeasy tissue kit (QIAGEN, Valencia, CA). The DNA concentration (ng nucleic acid/ $\mu$ l of solution) and quality (the 260/280 nm absorbance ratio of the DNA sample) were measured using a NanoDrop ND 1000 (NanoDrop Technologies, Wilmington, Delaware USA).

### *Methods for genetic analysis*

A protocol for the AFLP technique (Vos *et al.* 1995) was used to assess the variability and genetic structure of the populations of *H. hampei*. High-quality DNA (50 ng/8  $\mu$ l) from each sample was digested with a pair of restriction enzymes (*EcoRI/MseI*) and ligated to double-stranded *EcoRI/MseI* adaptors. The ligation was pre-amplified with nonselective primers, and selective amplification was subsequently performed using four primer combinations (E-CGC/M-ATG, E-CAG/M-AAC, E-CCG/M-AGT and E-CTC/M-AGT). The products were separated on 6% polyacrylamide gels in Owl vertical electrophoresis chambers at 90 W for 2.5 h. The gels were stained with a silver nitrate solution with formaldehyde, scanned and analyzed.

### *Data analysis*

High levels of inbreeding have been observed in the coffee berry borer (Borsa & Gingerich, 1995). Therefore, the null allele frequency (the number of individuals without bands) must be used to estimate allele frequencies. Allele frequencies were estimated using the Bayesian method developed by Zhivotovsky (1999) and implemented in AFLP-SURV 1.0 (Vekemans *et al.* 2002), which assumes a non-uniform distribution of allele frequencies. A value of  $F_{IS} = 1$  was set, with 500 permutations of the  $F_{ST}$  to estimate the significance among populations. Using Genalex 6 (Peakall and Smouse, 2006), an analysis of molecular variance

(AMOVA) was performed to determine the variation between and within populations. Dissimilarity matrix has estimated with simple-matching coefficient (Sokal and Michener 1958) and after loaded into MEGA software (Tamura *et al.* 2011) for Neighbor-joining test tree construction; additionally, agglomerative hierarchical clustering has implemented in order to corroborate Neighbor-joining clustering process.

STRUCTURE 2.2 was used to determine the probability that each sample collected belonged to a different population (Pritchard *et al.* 2000), using a model of recessive alleles for dominant markers and assuming the presence of an ancestral mix among populations and correlated alleles (Falush *et al.* 2007), i.e., the allele frequencies of the different populations are likely to be similar due to migration or a degree of shared ancestry, indicating that each individual has a certain fraction of each of the  $K$  assumed populations in its genome. STRUCTURE assumes that within a population, loci are in Hardy-Weinberg equilibrium (HWE) and in linkage equilibrium and assigns individuals to separate populations to eliminate violations of these assumptions.

With the above analysis, estimates of population and individual mix were obtained, and stratification analyses of the populations were performed using the Bayesian algorithm implemented in STRUCTURE. Simulations were performed with different  $K$  ancestral groups ( $K= 1$  to  $K = 15$  (total number of populations analyzed)). These simulations were performed with the specific parameters of STRUCTURE: BL = 10,000 and CL = 10,000, and 10 algorithm runs were performed for each  $K$ .

The  $\Delta K$  statistical parameter (Evanno *et al.* 2005) was used to define the most probable number of populations ( $K$ ) in the data. The modal value of the distribution of  $\Delta K$  was obtained with STRUCTURE Harvester v0.6.1 (Earl 2011). The approximate values of gene flow among the ( $K$ ) clusters were estimated with BAPS (Tang *et al.* 2009).

Estimates of ancestry for population pairs and  $F_{ST}$  values for each were performed with Arlequin 3.5 (Excoffier and Lischer 2010). Band pattern analyses were performed with Haplotype Analysis 1.05 (Eliades and Eliades 2009), finally, the exchange and manipulation of matrices from one program to another were performed with the R AFLPdat executable code (Ehrich 2006).

## RESULTS

### *Population structure and total polymorphisms*

The total number of fragments or loci evaluated was 88, with an average of 54.1 per individual, and 36 of these fragments were segregants (the fragments were present in certain individuals and absent in others), which accounted for 40.9% of all bands.

The effective number of alleles ( $n_e$ ) is the number of alleles that are present in a population. In this study,  $n_e$  averaged 1.03, with a standard deviation of 0.002, indicating homogeneity in populations and that the sampling strategy (number of samples per population and number of markers) was sufficient given the small variation in this parameter among the populations. The percentage of polymorphic loci averaged 16.89% among populations, ranging between 0 % and 36.36% (Table 1); the populations of São Mateus, Oratórios and Três Pontas showed no polymorphisms.

Table 1. Genetic diversity (percentage of polymorphic loci) of coffee berry borer populations in Brazil.

Identification map	Population	n	No. Polymorphic bands	% polymorphism
10	São Mateus, ES	10	0	0
6	Oratórios, MG	10	0	0
5	Três Pontas, MG	10	0	0
9	Itamarajú, BA	9	1	1.14
14	Londrina, PR	10	1	1.14
4	São Sebastião do Paraíso, MG	10	7	7.95
12	São Paulo, SP	10	18	20.45
11	Iconha, ES	10	19	21.59
15	Ouro Preto, RO	10	19	21.59
3	Patrocínio, MG	10	21	23.86
13	Campinas, SP	10	23	26.14
1	Unaí, MG	10	23	26.14
7	Manhuaçu, MG	10	29	32.95
8	Santa Cruz de Cabrália, BA	9	30	34.09
2	Uberlândia, MG	10	32	36.36
<b>Average</b>				<b>16.89</b>



Samples from Patrocínio and Uberlândia were the only ones that presented unique or specific alleles, with one and two bands, respectively. Fewer than 25% of the populations shared rare alleles, specifically Patrocínio, Uberlândia, Santa Cruz de Cabrália, Manhuaçu and Campinas.

Using AMOVA, we found that the variation was within populations, with a 96% contribution to the total genetic variation observed. A total of 37 AFLP DNA fingerprints (F) were observed in all of the populations; the most frequent was band pattern 2 (F-2), with frequencies above 0.5 in most populations, except for Santa Cruz de Cabrália and Uberlândia, where a frequency of 0.3 was observed. F-2 is the only DNA pattern present in São Mateus, Oratórios and Três Pontas (Figure 2). In addition to the modal pattern F-2, the population of Londrina harbored F-4 as a specific or unique DNA fingerprint highly related with F-2 and his cluster (distance 0,011) (Figure 3), Similarly, F-23 in the Patrocínio population (frequency = 0.2) was related directly F-2 (Figure 3). The population in Uberlândia (2) was more polymorphic and exhibited a higher number of specific fingerprints (seven): F-10, F-16, F-22, F-25, F-27, F-33 and F-35.

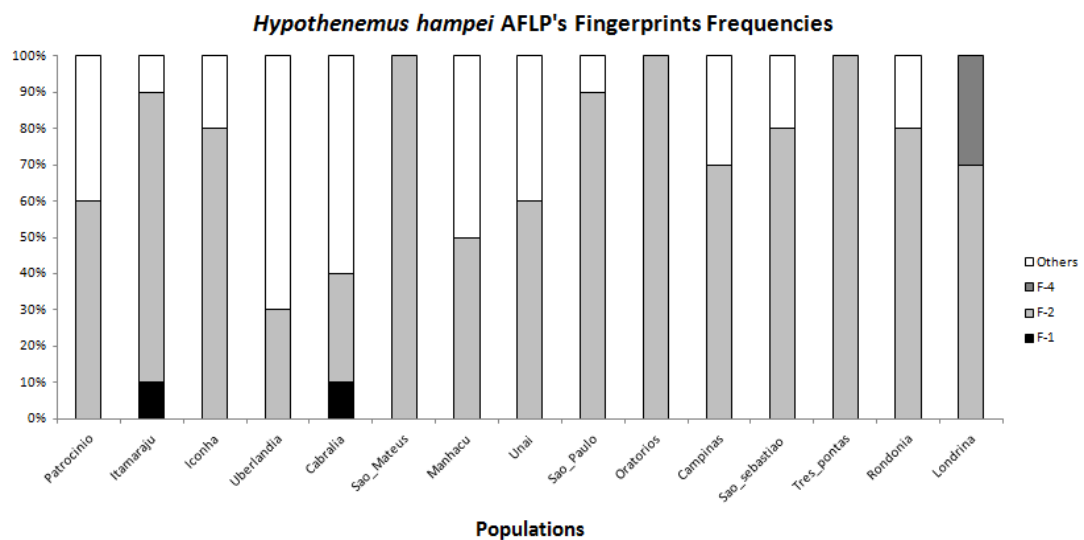


Figure 2. DNA fingerprints frequencies in coffee berry borer populations in Brazil determined by Haplotype Analysis 1.05.

Our results also suggests that the F-1 band pattern is one of the ancestral characterized by the absence of restriction sites and distant from the modal F-2

but interestingly is a pattern in the middle of clusters separation without bifurcation pattern of cladogenesis, his presence is determinant of clusters number (Figure 3), and therefore, its evolution toward new more band pattern has been slower due to the low probability of the formation of restriction sites.

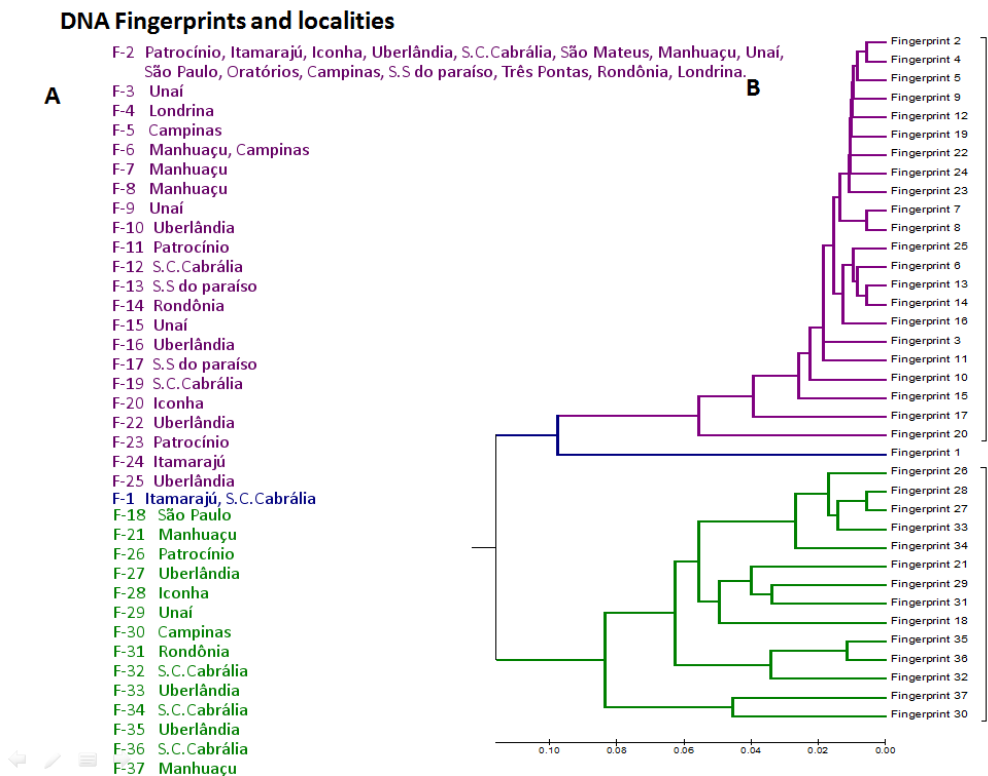


Figure 3. *H. hampei* AFLP fingerprints (A) and neighbor-joining analysis (B). The distribution of fingerprints (F-1 to F-37) among the samples listed in table. Fingerprints and localities are color coded according to groups (B). Three major groups were identified. Bootstrap values is 95% or higher for all interior branches. Fingerprints 1, 2 and 31 are centroids of each cluster.

The co-ancestry coefficient matrix shown in Figure 4 shows the highest coefficients among monomorphic populations and the least variable population (Londrina) compared with populations from Uberlândia and Santa Cruz de Cabrália. These results indicate that these populations were derived from few lineages. São Mateus, Oratórios and Três Pontas are a single population and have the highest genetic distance from the populations of Uberlândia and Santa Cruz de

Cabrália, with a value of 1. Conversely, the monomorphic populations showed a reduced genetic distance from São Paulo, the region where it is presumed that the pest was introduced into Brazil (Bergamin 1945).

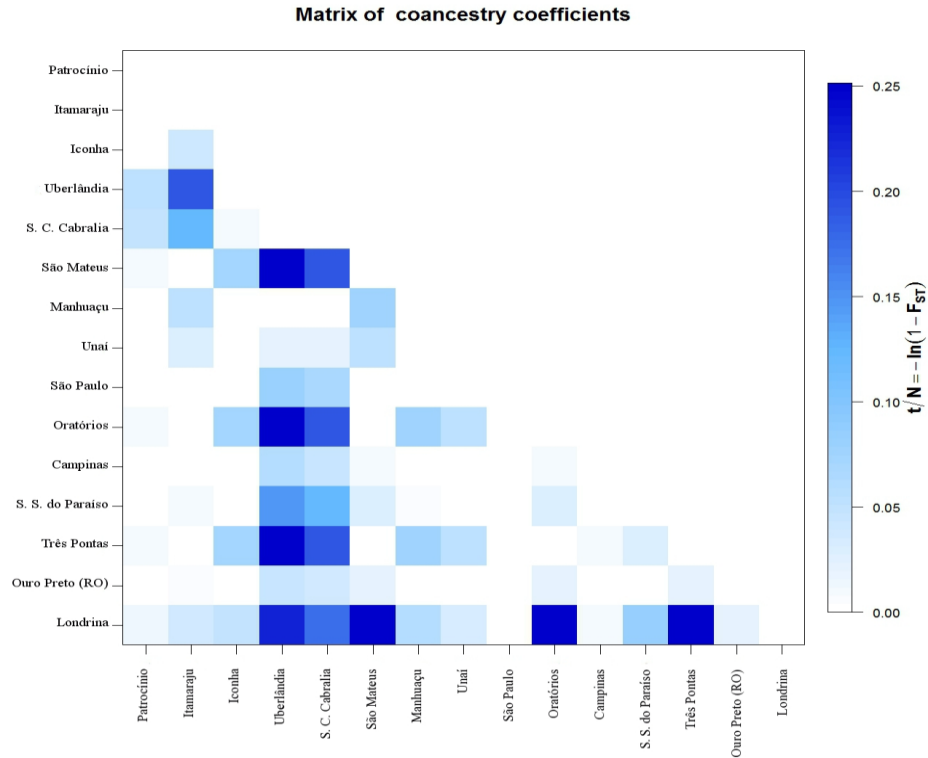


Figure 4. Representation of the coancestry coefficient matrix among populations performed with Arlequin 3.5. S.C. Cabrália, Santa Cruz de Cabrália; S.S. do Paraíso, São Sebastião do Paraíso.

### *Genetic differentiation*

In the analyses of paired populations, the total population genetic differentiation was high ( $F_{ST} = 0.167$ ) Wright (1978). However, when performing a pairwise comparison of populations, heterogeneity was observed in  $F_{ST}$  values (Figure 5).

The greatest genetic differences were found among monomorphic and Uberlândia populations ( $F_{ST} = 0.22$ ) followed by Santa Cruz de Cabrália ( $F_{ST} = 0.17$ ); likewise, genetic differentiation was observed between Itamaraju and Uberlândia ( $F_{ST} = 0.17$ ) and between Londrina and the populations of Uberlândia (0.20), Santa Cruz de Cabrália (0.16), São Mateus (0.22), Oratórios (0.22) and Três

Pontas (0.22). The population of Santa Cruz de Cabrália exhibited moderate differentiation from the population of Itamaraju (0.11).

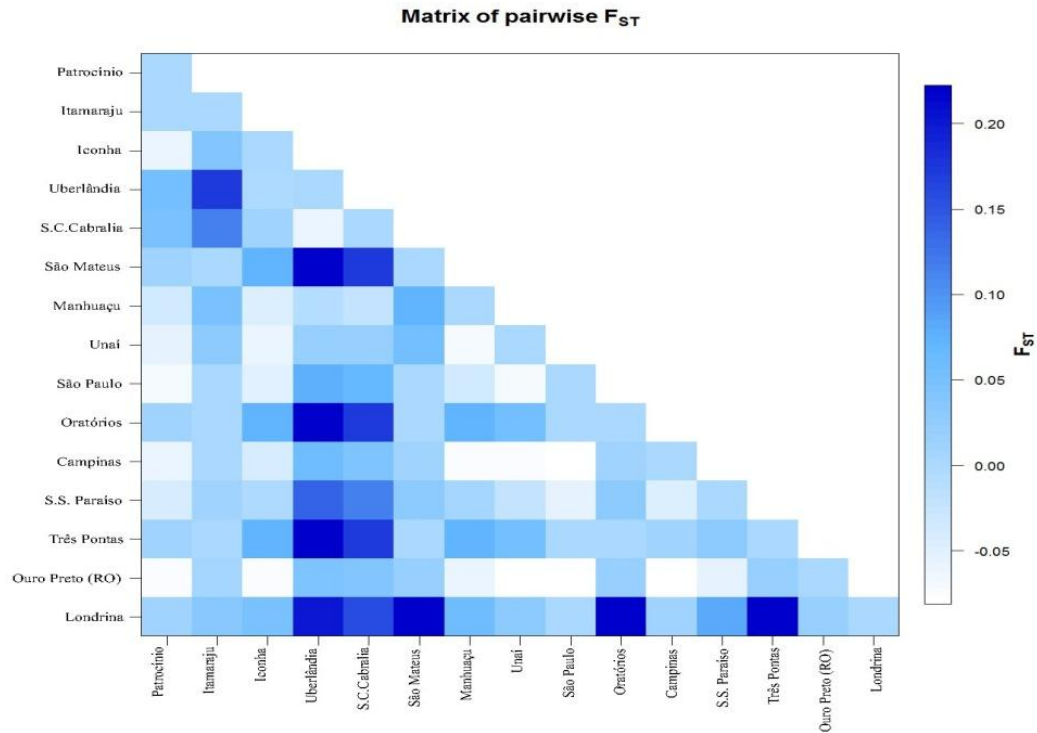


Figure 5. Indicator matrix of  $F_{ST}$  values for population pairs according to the analysis of genetic distances between fingerprints. Color intensity indicates  $F_{ST}$  values between population pairs. S.C. Cabrália, Santa Cruz de Cabrália; S.S. do Paraíso, São Sebastião do Paraíso.

***Bayesian analysis of the structure of coffee berry borer populations in Brazil***

Model simulations using the Bayesian method implemented in STRUCTURE showed a population structure of  $K = 2$  and  $K = 3$ . However, the modal value of the distribution of  $\Delta K$  indicated that the data clustered into three groups (i.e.,  $K = 3$ ) (Figure 6), i.e., that the populations of *H. hampei* in Brazil form three genetic groups.

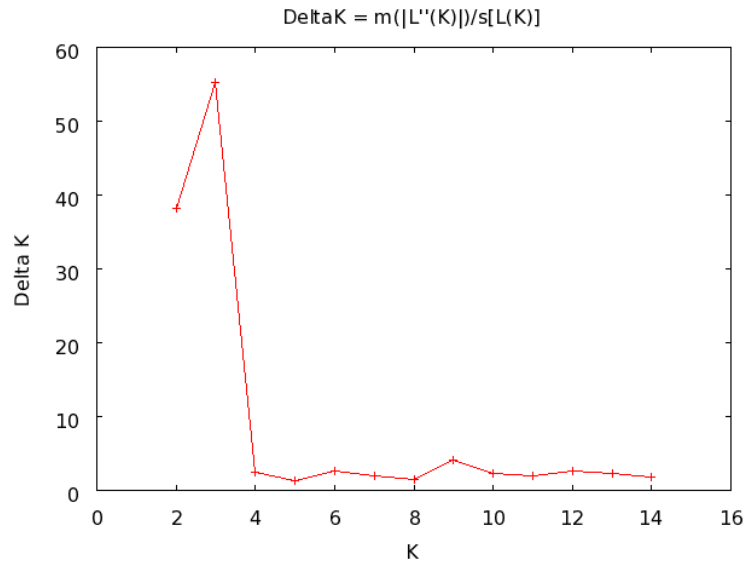


Figure 6. Modal value of the  $\Delta K$  distribution (Evanno *et al.* 2005). The peak in the  $\Delta K$  value confirms the grouping of data into three different populations.

The populations of Santa Cruz de Cabralia and, to a lesser extent, the Itamaraju samples exhibited genetic mixing of the three groups. Londrina, Patrocínio, Iconha, Uberlândia, Manhuaçu, Unaí, São Paulo, Campinas, São Sebastião do Paraíso and Ouro Preto (RO) exhibited a mixture of two groups, and the populations of São Mateus, Oratórios and Três Pontas were unmixed, suggesting that a founder effect of the F-2 band pattern and geographic isolation maintains the homogeneity of the coffee berry borer in these regions (Figure 7).

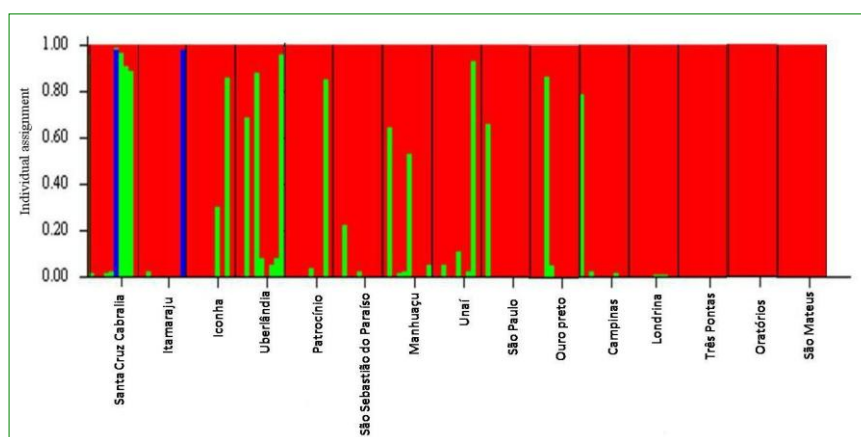


Figure 7. Stratification of Brazilian populations of *H. hampei* for  $K = 3$ . Each sample is represented by a vertical line divided into colors according to the proportion of an sample genome derived from an ancestral population.

With the assignment of samples to each of the groups identified as ancestral populations, a directional gene flow from the K1 group to the K2 group of approximately 6% and an absence of migrants from the K2 and K3 groups were observed (Figure 8).

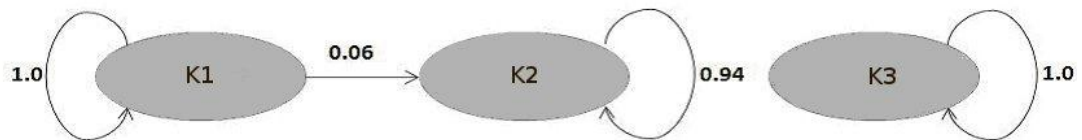


Figure 8. Gene flow between the Brazilian population groups that were evaluated ( $K = 3$ ).

## DISCUSSION

This study provides the first characterization of the variability and genetic structure of populations of the coffee berry borer in Brazil and complements historical records (Bergamin, 1945, 1958) on the appearance of the pest in this country.

The four combinations of primers revealed low genetic variability but enough polymorphisms to determine the genetic structure of *H. hampei* populations in Brazil. The low genetic diversity of the coffee berry borer in this country confirms the results of Borsa and Gingerich (1995) (allozymes), Gingerich *et al.* (1996), Andreev *et al.* (1998), Damon (2000), Gauthier *et al.* (2004) (microsatellites) and Benavides *et al.* (2005) (AFLP) who found that the pest has a high degree of homozygosity and low genetic variability. However, these results diverge from those of Gauthier (2010), who found considerable variation between groups of *H. hampei* using microsatellite markers and other approaches. However, deviation from HWE was observed at all loci, with a significant heterozygote deficiency and a very high  $F_{IS}$  ( $\geq 0.74$ ).

Benavides *et al.* (2005) found that the genetic diversity of *H. hampei* is greater in Brazil than in other Latin American countries. This observation supports the

hypothesis that the coffee berry borer was introduced to the American continent through Brazil as a result of seed importation, becoming the origin of the American coffee berry borer. The above results are supported by Gauthier (2010), who used Bayesian analysis and worldwide phylogenetic reconstructions and found five morphocryptic evolutionary units within *H. hampei* that grouped into four genetic populations: K1 (Ethiopia), K2 (Kenya), K3 (the American group with the exception of Jamaica and comprising Brazil, Colombia, the Dominican Republic, El Salvador, Nicaragua, Mexico, Guatemala and Costa Rica) and K4 (Jamaica, Togo, Cameroon, the Ivory Coast, India, New Caledonia and Java). In the American group, samples from Brazil formed the basis of the low genetic variability found in populations of this country, explaining the lack of heterozygosity and the high degree of consanguinity of this insect throughout the Americas. Additionally, the genetic variability of the Brazilian coffee berry borer is not dissimilar to that of Colombian populations, i.e., the introduction of a few founder lineages in Brazil and the subsequent dispersion of these lineages throughout the Americas explains the very low genetic variability on this continent (Benavides *et al.* 2005; Gauthier, 2010).

Given the frequency of F-2 in all of the populations evaluated, we can infer that this variant was the first DNA fingerprint initially introduced into Brazil together with an ancestral of both F-2 and F-1, possibly maintained through time, has been evolved and generating new variants that still maintain the homogeneity in most of cluster and subsequently have been spread his derivatives through migration processes, with gene flow between populations. The mutation was substantial because differentiation can simply occur by the loss of a restriction site, which is quite likely in the generation of different AFLP profiles.

As mentioned above, the presence of F-2 pattern frequencies greater than 0.5 in most populations suggests that this derive of the ancestral that was introduced into Brazil in 1913 and subsequently created new patterns or was introduced together with other less frequent DNA patterns; the dissemination of this ancestral pattern is consistent with the history of colonization of the pest. According to Bergamin (1945), after the first official record in 1924, the coffee berry borer colonized all of the bean-producing areas within a few years, and 33 years later, it was

documented throughout the country, which explains the widespread presence of this fingerprint in all of the samples.

The large number of patterns found in the populations of Uberlândia and Santa Cruz de Cabrália suggests that because of their relatively high genetic variability, these populations may be the oldest, i.e., with a period of greater divergence than the other populations analyzed. In this case, migration may have been important; however, according to records of the presence of the coffee berry borer in Brazil, the oldest populations should correspond to the locations of Campinas and São Paulo, where the infestation originated (Bergamin, 1958), or alternatively the statement of this author is not correct.

In this study, we found that the genetic differentiation of *H. hampei* populations occurred in Uberlândia, from these results, we infer that this region harbors greater genetic variation and can therefore be considered to be a population generated by different coffee berry borer lineages in Brazil or derived from the F-2 haplotype (F-10, F-16, F-22 and F-25). Directionality is observed in the DNA fingerprint dispersion from Uberlândia to Santa Cruz de Cabrália and Iconha, represented by the distribution of the F-27, F-28 and F-34 AFLP profiles

The values of genetic differentiation support the co-ancestry analysis results, showing the derivation of lineages with subsequent acquisition of genetic variability because they are monomorphic populations that have the highest differentiation from the more polymorphic populations. These results suggest that an introduction event of different genotypes occurred that evolved independently without crossings between populations and that acquired genetic variability was due to gene flow events within subpopulations.

The presence of individuals not assigned to the corresponding population provides potential evidence of an area of hybrid zone, which was observed in all of the polymorphic populations. These areas of divergence of coffee berry borer lineages are those where F-1 and F-2 concurrently spread towards Itamaraju; F-2's ancestor then dispersed throughout the region of Minas Gerais and was fixed in monomorphic populations. The F-2 ancestor pattern was dispersed throughout



Brazil, reaching the town of Ouro Preto (RO), where DNA profiles derived from São Paulo and Campinas from Unaí were also found

These results differ from the historical record of the presence and colonization of the coffee berry borer in Brazil (Bergamin, 1958). This difference may be due to introductions into sites outside of Campinas before 1913 that were not recorded because of factors such as unknowledge of the taxonomy of this species, which created confusion in identification and prevented the timely recognition of its introduction, or because a lack of plant health monitoring made it impossible to establish the correct date of arrival of the coffee berry borer in Brazil. Prior to 1922, Brazil unofficially imported whatever was needed, and seeds for planting different crops were brought in directly by the interested parties (Piza Junior, 1928).

Bergamin (1945) argued that both seed introductions by officers of the Board of Agriculture before 1913 and direct imports by producers were undoubtedly important factors in the introduction of the pest, leaving open the possibility of introductions before this date at sites other than Campinas. Bergamin (1945) considered this region to be the site of introduction because in 1913, the State Agricultural Institute (Campinas) received coffee seeds from Java and Congo infested with the coffee berry borer; however, producers in São Paulo imported seeds prior to 1913 from West Java, an island infested by the pest in 1909.

Additionally, between 1901 and 1902, Brazil imported the seeds of 88 varieties of coffee from around the world. It is not possible to confirm that these samples were carriers of the coffee berry borer, but it is also not possible to state that they were free of the pest; by this date, the coffee berry borer was already present in Congo (Africa) (Bergamin 1945).

Bayesian cluster analysis showed that *H. hampei* populations in Brazil formed three homogeneous genetic groups (i.e.,  $K = 3$ ). First, this finding is consistent with Bergamin records (1945) regarding two possible introductions of this insect in seeds from Indonesia (Java) and Congo or both regions simultaneously and an

additional group mediated by dispersal and gene flow between populations of the insect. This result also agrees with Benavides *et al.* (2005), who found a large number of lineages in samples from two crops from Brazil, showing possible gene flow events between populations in these localities.

Second, this introduction may have been a single introduction of multiple lineages, with the groups found today being defined by subsequent gene flow events between populations (Benavides *et al.* 2005) and a founder effect with genetic drift.

The most common factors that produce population structure in phytophagous insects are the host plant, habitat fragmentation, mating system, dispersal capacity and geographic and/or reproductive barriers (Mopper 1996; Kerdelhué *et al.* 2002). The distribution of genetic variability in the areas under study suggests that geographic isolation was likely one of the most important factors in the diversification of lineages and in the processes of genetic drift in coffee berry borer populations without genetic variability.

The dispersion of the pest is another important factor in population structure; *H. hampei* is dispersed in the field by human activities, wind and, on a larger scale, domestic and international trade (Baker 1984; Sánchez 1985; Bustillo *et al.* 1998; Castro *et al.* 1998; Moreno *et al.* 2001). In Brazil, due to geographical barriers and distances between coffee-producing areas, anthropogenic dispersal may be the primary cause; when the coffee berry borer arrived in Brazil, the coffee was harvested manually, and collectors moved between different production regions, becoming active vehicles for the movement of the insect between different locations. This factor favors gene flow or migration among populations of the coffee berry borer and its effect depends on differences in the allele frequencies of the original populations.

The Uberlândia population was the most polymorphic (36.36%), with the highest number of unique band patterns (seven). These band patterns could be used to develop molecular markers for use in ecological and biological studies of the coffee berry borer in Brazil.

## **Acknowledgements**

The data presented in this work were obtained in the Molecular Biology of Plants (Biomol) and Biotechnology of Coffee (Biocafé) laboratories of the Universidade Federal de Viçosa (Federal University of Viçosa), Minas Gerais, Brazil. The authors wish to thank Everaldo Gonçalves de Barros and Leonardo Corrêa da Silva for advice on laboratory protocols and the following colleagues for providing samples of *H. hampei*: Antônio Alves Pereira (EPAMIG), Herculano Penna Medina Filho (IAC), Cesar Fanton (INCAPER), Cesar Augusto Teixeira (EMBRAPA, RO), Pedro Neves (UEL), Ronaldo Nogueira de Medeiros (Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas de Gerais, Agricultural Research Corporation of Minas Gerais), Luis Fernando Rodrigues Puccinelli and CNPq-INCT-Semiochemicals in Agriculture.

## **REFERENCES**

Andreev D, Breilid D, Kirkendall L, Brun LO, Ffrench-Constant RH (1998) Lack of nucleotide variability in a beetle pest with extreme inbreeding. *Insect Molecular Biology* **7**, 197–200.

Baker PS (1984) Some aspects of the behavior of the coffee berry borer in relation to its control in southern Mexico (Coleoptera: Scolytidae). *Folia Entomológica Mexicana* **62**: 9-24.

Baker PS, Ley C, Balbuena R, Barrera JF (1992) Factors affecting the emergence of *Hypothenemus hampei* (Coleoptera: Scolytidae) from coffee berries. *Bulletin of Entomological Research* **82**, 145–150.

Benavides P, Vega FE, Romero-Severson J, Bustillo AE, Stuart JJ (2005) Biodiversity and biogeography of an important inbred pest of coffee, coffee berry borer (Coleoptera: Curculionidae: Scolytinae). *Annals of the Entomological Society of America* **98**, 359–366.

Bergamin J (1945) The coffee berry borer *Hypothenemus hampei* (Ferrari, 1867). *Boletim da Superintendência dos Serviços do Café* **20**, 6–14.

Bergamin J (1958) The coffee berry borer in Brazil. *Boletim da Superintendência dos Serviços do Café* **33**, 21–22.

Bonin A, Ehrich D, Manel S (2007). Statistical analysis of amplified fragment length polymorphism data: a toolbox for molecular ecologists and evolutionists. *Mol. Ecol.* **16**:3737–3758.

Borsa P, Gingerich DP (1995) Allozyme variation and an estimate of the inbreeding coefficient in the Coffee Berry Borer, *Hypothenemus hampei*. *Bulletin of Entomological Research* **85**, 21–28.

Brun LO, Stuart J, Gaudichon V, Aronstein K, Ffrench-Constant RH (1995) Functional haplodiploidy: a mechanism for the spread of insecticide resistance in an important international insect pest. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* **92**, 9861–9865.

Bustillo AE, Cardenas R, Villalba D, Benavides P, Orozco J, Posada FJ (1998) Integrated management of the coffee berry borer *Hypothenemus hampei* (Ferrari) in Colombia. 134 pp. Cenicafé Chinchiná, Colombia.

Castro L, Benavides P, Bustillo AE (1998) Dispersion and mortality of *Hypothenemus hampei* during collection and processing of coffee. *Integrated Pest Management* **50**, 19-28.

Damon A (2000) A review of the biology and control of the coffee berry borer *Hypothenemus hampei* (Coleoptera: Scolytidae). *Bulletin of Entomological Research* **90**, 453–465.

Earl DA (2011) Structure harvester v 0.6.1. Available at <http://taylor0.biology.ucla.edu/structureHarvester/>

Ehrich D (2006) AFLPdat: a collection of R functions for convenient handling of AFLP data. *Molecular Ecology Notes* **6**, 603-604.

Eliades NG, Eliades DG (2009). HAPLOTYPE ANALYSIS: Software for analysis of haplotype data. Distributed by the authors. Forest Genetics and Forest Tree Breeding, Georg-August University Goettingen, Germany.

Evanno G, Regnaut S, Goudet J (2005). Detecting the number of clusters of individuals using the software Structure: A simulation study. *Mol Ecol* **14**:2611-2620.

Excoffier L., Lischer HEL (2010) Arlequin suite ver 3.5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Mol Ecol Res* **10**, 564–567.

Falush D, Stephens M, Pritchard JK (2007) Inference of population structure using multilocus genotype data: dominant markers and null alleles. *Molec Ecol Notes* **7**, 574 - 578.

Garcia JN (2010) Coffee Berry Borer *Hypothenemus hampei* (Ferrari) (Coleoptera: Curculionidae: Scolytinae) Plant Pest Control Branch, Division of Plant Industry, Hawaii Department of Agriculture 10-01 September, 2p.

Gauthier N, Rasplus JY (2004) Polymorphic microsatellite loci in the Coffee Berry Borer, *Hypothenemus hampei* (Coleoptera, Scolytidae). *Molecular Ecology Notes* **4** 294–296.

Gauthier N (2010) Multiple cryptic genetic units in *Hypothenemus hampei* (Coleoptera: Scolytinae): evidence from microsatellite and mitochondrial DNA sequence data. *Biological Journal of the Linnean Society* **101**, 113-129.

Gingerich DP, Borsa PD, Suckling M, Brun LO (1996) Inbreeding in the Coffee Berry Borer, *Hypothenemus hampei* (Coleoptera: Scolytidae) estimated from

endosulfan resistance phenotype frequencies. *Bulletin of Entomological Research* **86**, 667–674.

Kerdelhué C, Roux-Morabito G, Forichon J, Chambon JM, Robert A, Lieutier F (2002) Population genetic structure of *Tomicus piniperda* L. (Curculionidae: Scolytinae) on different pine species and validation of *T. destruens* (Woll.). *Molecular Ecology* **11**, 483–494.

Le Pelley RH (1968) Pests of coffee. London, Longmans Green and Co. 590 pp.

Mopper S (1996). Adaptive genetic structure in phytophagous insect populations. *Trends in Ecology and Evolution* **11**, 235–238.

Moreno D, Bustillo AE, Benavides P, Montoya EC (2001) Escape and mortality of *Hypothenemus hampei* in the process of collection and processing of coffee in Colombia. *Cenicafé* **52**, 111-116.

Murphy ST, Moore D (1990) Biological control of the coffee berry borer, *Hypothenemus hampei* (Ferrari) (Coleoptera: Scolytidae): previous programmes and possibilities for the future. *Biocontrol News and Information* **11**, 107–117.

Peakall R, Smouse PE (2006) GenAlEx 6: Genetic Analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Molecular Ecology Notes* **6**, 288–295.

Piza Junior ST (1928) *Stephanoderes hampei* (Coffee Berry Borer). Secr Agric, Sao Paulo, 52 pp.

Pritchard JK, Stephens M, Donnelly P (2000) Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics* **155** 945-959.

Portilla R., M. (1999). Desarrollo y evaluación de una nueva dieta artificial para criar *Hypothenemus hampei*. *Cenicafé* 50(1):24-38.

Sánchez R (1985). Biology of the coffee berry borer (*Hypothenemus hampei* Ferr.), pp. 97-104. In P.-Anacafé [ed.], Course on Integrated Management of

Cafeto Pests, with emphasis on the Berry Borer (*Hypothenemus hampei* Ferr.). Promecafé - Anacafé, Guatemala.

Sokal RR, Michener CD (1958) A statistical method for evaluating systematic relationships. *University of Kansas Science Bulletin*, 38, 1409–1438.

Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, and Kumar S (2011) MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Molecular Biology and Evolution* 28: 2731-2739.

Tang J, Hanage WP, Fraser C, Corander J (2009) Identifying currents in the gene pool for bacterial populations using an integrative approach. *PLoS Comput Biol* 5, e1000455. Epub 2009 Aug 7

Ulrich G. M., Wolfenbarger LL. (1999) AFLP Genotyping and Fingerprinting. *Trends Ecol Evol* 14 (10): 384-394.

Vega EF, Infante F, Castillo A, Jaramillo J (2009) The coffee berry borer, *Hypothenemus hampei* (Ferrari) (Coleoptera: Curculionidae): a short review, with recent findings and future research directions *Terrestrial Arthropod Reviews* 2, 129–147.

Vekemans X, Beauwens T, Lemaire M, Roldan-Ruiz I (2002) Data from amplified fragment length polymorphism (AFLP) markers show indication of size homoplasy and of a relationship between degree of homoplasy and fragment size. *Molec Ecol* 11, 139-151.

Vos P, Hogers R, Bleeker M, Reijans M, Van de Lee T, Hornes M, Frijters A, Peleman J, Kuiper M Zabeau M (1995) AFLP: A new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Research* 23, 4407–4414.

Wright S (1978) *Evolution and the Genetics of Populations* vol. 4, Variability Within and Among Natural Populations. University of Chicago Press, Chicago, IL.

Zhivotovsky LA (1999) Estimating population structure in diploids with multi-locus dominant DNA markers. *Molecular Ecology* **8**, 907–913.



## CAPÍTULO II

### MÉTODO COM USO DE MARCADOR MOLECULAR PARA AVALIAR O MOVIMENTO DA BROCA-DO-CAFÉ, *Hypothenemus hampei* (FERRARI).

Zulma Nancy Gil P.<sup>1</sup>, Pablo Benavides Machado<sup>2</sup>, Og Francisco Fonseca de Souza<sup>1</sup>, Flor Edith Acevedo<sup>2</sup>, Ruben Medina<sup>2</sup>, Esther Cecilia Montoya<sup>2</sup>, Eraldo Lima<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Entomologia, Universidade Federal de Viçosa. Minas Gerais, Brasil, CEP 36571-000, [zulma.gil@cafedecolombia.com](mailto:zulma.gil@cafedecolombia.com), <sup>2</sup>Disciplinas de Entomologia e Biometria, Cenicafé, Chinchiná, Caldas, Colômbia.

**RESUMO-** Apresenta-se uma metodologia com uso de marcador molecular e técnicas de marcação-liberação-recaptura para estudar o movimento da broca-do-café *Hypothenemus hampei* (Ferrari) (Coleoptera: Curculionidae) praga importante que afeta a cultura do café em quase todos os países produtores causando grandes perdas aos produtores. O objetivo deste trabalho foi desenvolver uma metodologia viável nos estudos do movimento de *H. hampei* nas suas condições naturais e para isso desenvolvemos (i) avaliação da variação alélica do microssatélite HHK.1.6 como método de marcação, (ii) desenvolvemos um dispositivo para liberar populações da broca-do-café, (iii) liberação e recaptura dos espécimes marcados (iv) avaliação da presença do alelo de 173 pb na população recapturada, (v) estimativa da distância de vôo da broca-do-café, e (iv) ajuste da expressão matemática que melhor descreva o movimento da broca-do-café no espaço ao longo do tempo. Os resultados indicaram que a variação alélica do marcador microssatélite HHK.1.6 nas populações da Catalina e Guapotá, permitiu realizar avaliações confiáveis do movimento da broca ao longo do tempo e por várias gerações do inseto; a eficiência do dispositivo de liberação medida como a percentagem média das brocas que voaram foi de 88,8% com limites inferior e superior de 87,6 e 90%, respectivamente para um coeficiente de confiança de 95%, a broca-do-café voou até os 65 m no quadrante norte e no quinto dia da avaliação, não obstante, 90% dos espécimes de *H. hampei* foram recuperados em plantas localizadas em um raio menor a 40 m do ponto central da

liberação, o maior número médio de brocas recapturadas por árvore foi de  $7,20 \pm 1,32$  em um raio de 5 m e no dia 5 após a liberação. A expressão matemática com melhor ajuste para descrever o movimento de *H. hampei* no espaço ao longo do tempo foi  $\hat{Y} = \alpha\beta^{X_i}$  onde  $Y$  é a média das brocas recapturadas por árvore e  $X$  distância da recaptura em metros. Assim, a aplicação desta metodologia para estudar o movimento de *H. hampei* nas diferentes condições ecológicas e agronômicas da cultura do café, mostrou-se viável e contribuirá para determinar o comportamento deste inseto face às variações climáticas e ecológicas.

**PALAVRAS-CHAVE:** *Hypothenemus hampei*, marcadores moleculares, microssatélites, movimento.

**METHOD WITH USE OF MOLECULAR MARKER TO EVALUATE THE MOVEMENT OF THE COFFEE BERRY BORER *Hypothenemus hampei* (FERRARI).**

**ABSTRACT-** A methodology using molecular marker and techniques of mark-release-recapture is presented to study the movement of the coffee berry borer *Hypothenemus hampei* (Ferrari), an important pest that affects the coffee crops in almost all producing countries causing huge losses to the farmers. The objective of this research was to develop a viable methodology to study the movement of *H. hampei* under natural conditions with (i) the evaluation of the use of the microsatellite HHK.1.6 as a method of marking; (ii) development of a device for releasing populations of the coffee berry borer; (iii) releasing and recapture of marked specimens; (iv) assessment of the presence of the 173 pb allele in the recaptured specimens, (v) estimate of the distance of the flight coffee berry borer and (vi) adjustment of the mathematical expression that best describes the movement of the coffee berry borer in space over time. The results indicated that the marker HHK.1.6 allowed reliable evaluations of the movement of the released population over time and for several generations of insects; the efficiency of the release device, measured as the average percentage of the coffee berry borer that have flown was 88, 8%, with upper and lower limits of 87.6 to 90%, respectively, with a confidence coefficient of 95%, the coffee berry borer, flew up to 65 m in the north quadrant and on the fifth day of the assessment, however, 90% of specimens of *H. hampei* were recovered at plants located in a radius of less than 40 m from the center point of release, the highest average number of borers per tree was recaptured from  $7.20 \pm 1.32$  at a radius of 5 m on day 5 after release. The mathematical expression that best describes the movement of *H. hampei* in the space over time is  $\hat{Y} = \alpha\beta^{X_i}$  where  $Y$  is the average of borers per tree recaptured and  $X$  the distance expressed in meters. Application of this methodology for studying the movement of *H. hampei* in different ecological and agronomic conditions of the crop, proved to be feasible and help to determine the behavior of this insect in different climate and ecological conditions.

**KEY WORDS:** *Hypothenemus hampei*, molecular markers, microsatellites, movement.

## 2.1 INTRODUÇÃO

A cultura do café é a base econômica em muitos países nos trópicos e milhões de pessoas dependem deste para sua subsistência (Jaramillo *et al.* 2009). Na atualidade, a indústria deste produto faz frente não só à ameaça de um inseto de muita importância econômica nos países cafeicultores do mundo, *Hypothenemus hampei* (Coleoptera: Curculionidae), mas também às mudanças climáticas e aumento da temperatura média global.

Na agricultura o incremento da temperatura tem como consequências prolongar as condições ótimas para o desenvolvimento de pragas e doenças, e, por conseguinte um maior impacto das populações destes organismos sobre a vegetação que os alimentam. Em alguns insetos pragas, estes fenômenos podem influir diretamente na distribuição geográfica das espécies, pela tendência a deslocar-se para maiores latitudes ou altitudes trazendo mudanças sobre sua história de vida, número de gerações por ano, a longevidade e os padrões da dispersão (Jaramillo *et al.* 2009). Assim, é importante conhecer o movimento dos insetos em seu habitat natural, para o entendimento de sua biologia, demografia e etologia (Hagler & Jackson 2001), além disso, estes estudos permitem maior eficiência no desenho de programas de amostragem, seleção de métodos da análise de dados, e estimativa de tamanhos populacionais, e outros (Sevacherian & Stern 1972).

Uma ampla variedade de marcadores como pinturas, tintas, pós, radioisótopos, mutilação física, rótulos e marcadores moleculares têm sido utilizados para avaliar a dinâmica e movimento das populações de insetos, a dispersão, territorialidade, o comportamento da alimentação, e outras interações ecológicas (Hagler & Jackson 2001). Os marcadores moleculares são úteis nos estudos de marcação- liberação-recaptura, porque não afetam o comportamento nem aparência externa dos indivíduos, além disso, proporcionam uma medida da dispersão como também o fluxo de genes. (Huettel *et al.* 1976).

O movimento da broca-do-café em seu habitat natural não foi ainda avaliado, assim, é importante conhecer este comportamento do inseto nas diferentes condições ecológicas e agrônômicas da cultura do café. Diante do

exposto, o objetivo deste trabalho foi desenvolver uma metodologia viável nos estudos do movimento de *H. hampei* nas suas condições naturais.

## 2.2. MATERIAL E MÉTODOS

Os resultados da pesquisa descrita no capítulo I mostraram uma baixa variabilidade genética e pouca diferenciação com as populações colombianas, por tanto, não foi possível o desenho de marcadores moleculares a partir destas populações. Assim, neste trabalho utilizamos como método de marcação os alelos que amplificamos com o marcador molecular microssatélite HHK. 1.6, desenhado por Gauthier & Rasplus (2004) sobre populações etíopes de *H. hampei*. Este marcador foi amplificado nos laboratórios de Entomologia do Centro Nacional de Investigaciones de Café - Cenicafé, sobre populações colombianas da broca, os indivíduos de Guapotá (Santander) foram os únicos que apresentaram um alelo de 173 pb, comparado com as outras populações que apresentaram um alelo de 175 pb, por isso neste trabalho, Guapotá foi utilizada como a população marcada e para atingir o objetivo desenvolvemos as seguintes atividades:

### **1. Avaliação da variação alélica do microssatélite HHK. 1.6 nas populações da broca-do-café da estação experimental “La Catalina.”**

Este ensaio foi realizado para verificar que o alelo de 173 pb presente na população marcada, não estava nos indivíduos da broca-do-café do local da liberação (La Catalina), e para isto, o microssatélite HHK.1.6 (Tabela 1), foi amplificado em 100 amostras de *H. hampei* coletadas em diferentes cafezais da estação experimental “La Catalina. O DNA total foi extraído de cada espécime usando o Dneasy Tissue Kit da Quiagen, segundo o protocolo do mesmo e estocado a -20°C. As comparações genéticas as realizamos com 10 espécimes da broca-do-café da região da Guapotá, população que contém o alelo de 173 pb.

Tabela 1. Características do microssatélite HHK. 1.6. (CA)<sub>7</sub>GATC(CA)<sub>3</sub>, amplificado nas populações colombianas de *H. hampei*, e usado como técnica de marcação neste trabalho.

Nome locus	Forward Primer (5'-3')	Reverse Primer (5'-3')	Tamanho do alelo (pb) Guapotá	Tamanho alelo (pb) La Catalina
HHK.				
1.6	CGGCACGAATAATCCCTAC	CCTGAATTATCGACGTCGG	173	175

Os loci do microssatélite HHK. 1.6 foram amplificados em um volume final de 20 µl, cada reação consistiu em: 4 µl de DNA (≈20 ηg), 0.2 µl do iniciador "forward + reverse" (0.5 µM), 1.6 µl de (dNTP) (0.2 mM), 4 µl de solução tampão 1 X, 1.2 µl de MgCl<sub>2</sub> (1.5 mM), 0.1 µl de Taq DNA polimerase (0.5 U promega) e 8.9 µl de água MilliQ autoclavada. As amplificações foram realizadas como segue: uma desnaturação inicial de 5 min a 94°C, seguido por 35 ciclos de 45s a 94°C, 30 s a 52°C, 45 s a 72°C, finalizando com 5 min a 72°C para extensão final. Após a amplificação, o padrão de bandas do DNA de cada indivíduo foi visualizado em eletroforese em gel de poliacrilamida ao 4%.

## 2. *Dispositivo para liberar populações de H. hampei*

Desenvolvemos um dispositivo para liberar populações da broca-do-café e garantir que os espécimes liberados iniciam o vôo ao mesmo tempo, os componentes principais foram fonte de luz, temperatura e vento (Figura 1, anexo A). A eficiência do dispositivo foi avaliada através da percentagem do número médio de brocas que voaram. Para isto, realizamos liberações a diferentes tempos (8h00min, 11h00min, 14h00min e 17h00min). Os tratamentos foram os tempos, cada um com dez repetições, o tamanho da amostra por repetições foi (n=100).



Figura 1. Dispositivo desenvolvido para liberar populações da broca-do-café, o sistema de funcionamento é com ar e calor.

### 3. Liberação e recaptura da população marcada, Guapotá- Santander apresenta o alelo de 173 pb.

Este ensaio foi desenvolvido de outubro de 2011 a fevereiro de 2012, em uma área experimental de 2353 plantas de (*Coffea arabica* var. Colômbia), distribuídas em 6644 m<sup>2</sup> aproximadamente, espaçamento entre plantas de 2 m x 1 m, idade de 24 meses e de primeira safra (Figura 2). A área está localizada na estação experimental “La Catalina”, no município de Pereira, Colômbia. As condições ambientais para o dia que realizamos a liberação foram: temperatura média de 21,8°C, umidade relativa de 77%, precipitação pluviométrica de 0,4 mm, insolação de 8,7 hr/dia, e velocidade do vento 1,67 m/seg.



Figura 2. Representação esquemática da área experimental na Catalina, local onde liberamos a população de *H. hampei* da região de Guapotá, Santander (população marcada). Esta área está composta por 2353 árvores distribuídas em 6644 m<sup>2</sup>.



Para o procedimento liberação-recaptura da população marcada, foram criadas dez mil brocas da região de Guapotá (população que contem o alelo de 173 pb), sobre dieta artificial como descrita em Portilla (1999); a partir da terceira geração selecionamos as cinco mil fêmeas mais ativas, isto é, (as que caminharam mais rápido para uma fonte de luz artificial).

As cinco mil fêmeas selecionadas foram levadas ao campo e liberadas a partir de um ponto central da área, uma vez determinadas as coordenadas do sítio. A liberação foi feita às 14h00min, com o dispositivo que desenvolvemos para este fim (Figura 1), o qual garante que as brocas liberem o dispositivo ao mesmo tempo. Nesta hora de liberação garantimos condições ótimas para o vôo de *H. hampei*.

Para o procedimento de recaptura no dia seguinte a liberação, às 08h00min em cada um dos quatro quadrantes do lote (norte, sul, leste e oeste), e em cada uma das 16 distâncias definidas num raio de (5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75 e 80 m), marcamos (com tinta branca indelével) e contamos em cada árvore o número de frutos perfurados pela broca. Repetimos este mesmo procedimento aos 5, 15, 30, 45, 60, 75 e 90 dias após a liberação (tempos da amostragem), em cada uma das avaliações marcamos os frutos com tinta indelével de uma cor diferente.

#### **4. Avaliação da presença do alelo de 173 pb na população recapturada.**

Nos indivíduos recapturados amplificamos o microssatélite HHK. 1.6 e avaliamos a presença do alelo de 173 pb, para isto, 95 dias após a liberação retiramos em cada quadrante 100 frutos perfurados pela broca-do-café, totalizando 400. Este valor foi determinado estatisticamente: assumindo como variância, a estimativa da proporção de brocas liberadas em 90%; erro da estimativa de 3%; uma confiabilidade mínima de 75% e uma população de frutos média por árvore de 188. Como população testemunha usamos 20 espécimes de *H. hampei* da estação experimental “La Catalina”, onde não está presente o alelo de 173 pb e foi o local da liberação. De cada fruto extraímos um adulto da broca, em seguida, o DNA total foi extraído de cada espécime usando o Dneasy Tissue Kit de Quiagen,

segundo o protocolo do mesmo, e estocado a  $-20^{\circ}\text{C}$ . A reação de PCR foi realizada como descrita anteriormente.

### ***5. Estimativa da distância de vôo da broca-do-café.***

Com os dados obtidos nas recapturas, estimamos a distância de vôo da broca-do-café desde o dia um até o dia 30 após da liberação, foram as recapturas da população liberada inicialmente.

### ***6. Ajuste da expressão matemática que descreva o movimento dos indivíduos liberados de *H. hampei* no espaço ao longo do tempo.***

A seleção da expressão a realizamos sobre os seguintes critérios: a função que apresentar o menor quadrado médio do erro, que o modelo e cada um dos coeficientes fossem significativos ( $p < 0,05$ ), após a confirmação de que os resíduos seguem uma distribuição normal. Para as análises, os dados foram separados em duas partes.

1. Número médio das brocas recapturadas por árvore, desde o dia um até o dia 30; foram as recapturas da população liberada inicialmente.
2. Número médio das brocas recapturadas por árvore, do dia 45 até o dia 90; foram às recapturas da segunda e terceira geração a partir da população liberada.

### ***Análise dos dados***

Com a informação obtida realizamos uma análise descritiva e calculamos

1. Número das amostras da população de *H. hampei* da Catalina com presença do alelo de 173 pb.
2. Médias e intervalos de confiança para a percentagem de adultos de *H. hampei* que voaram usando o dispositivo em cada tempo avaliado.

3. Proporção e intervalo, com um intervalo de confiança de 95%, de frutos que contém brocas com presença do alelo de 173 pb (população liberada).
4. Média por árvore e erro padrão para o número acumulado de brocas recapturadas por data de amostragem e distância.
5. Ajuste da expressão matemática que melhor descreve o movimento da broca do café no espaço ao longo do tempo.

## 2.3. RESULTADOS

Todos os espécimes avaliados apresentaram um alelo de 175 pb, isso indica que o alelo com um peso molecular de 173 pb não está presente nas populações da broca-do-café da estação experimental “La Catalina” (zona central cafeeira colombiana) e pelo tanto o marcador microssatélite HHK.1.6 pode se usar como técnica de marcação neste trabalho. A segregação deste marcador é codominante, e o polimorfismo se observa pelas diferenças no peso molecular, assim, no gel de poliácridamida as amostras que apresentaram o alelo de 173 pb (Guapotá) migram mais rápido, comparadas com as amostras que apresentaram um alelo de 175 pb (La Catalina) (Figura 3).

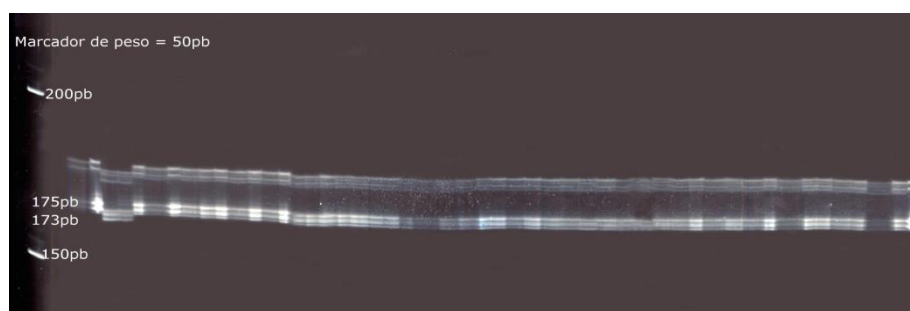


Figura 3. Fragmento do gel de poliácridamida, se apresenta a variação alélica do microssatélite HHK.1.6 amplificado em 100 espécimes de *H. hampei* da estação experimental “La Catalina”. O peso molecular dos alelos que amplificamos nos espécimes da Catalina foi de 175 pb, comparado com os espécimes da população testemunha (Guapotá) que apresentaram um alelo de 173 pb.

A eficiência do dispositivo de liberação foi avaliada em termos de porcentagem média dos indivíduos da broca que voaram. Os valores obtidos estão entre 88,3 e 89,1 % (Tabela 2). Segundo teste *t* de Student ( $p < 0,05$ ), as médias desta variável nos diferentes tempos da liberação são iguais, isto é, as condições ambientais implícitas em cada tempo não influenciaram no voo da broca, portanto, pode-se generalizar como eficiência do dispositivo, uma média de 88,8% de brocas que voaram, com limites inferior e superior de 87,6 e 90%, respectivamente, para um intervalo de confiança de 95%.

Tabela 2. Percentagem média das brocas-do-café que voaram usando o dispositivo.

Hora	Percentagem	LI	LS
8:00	89,0	86,6	91,4
11:00	89,1	86,4	91,7
14:00	88,3	86,1	90,4
17:00	89,1	86,7	91,5
Média geral	88,8	87,6	90

Na tabela 3 indicamos a estimativa da proporção dos indivíduos que apresentaram um alelo de 173 pb (população liberada) em cada uma das distâncias. Observa-se, a proporção está entre 68.1 e 100% através das distâncias, com isto, se corrobora o fundamento deste trabalho, recapturar as populações liberadas.

Tabela 3. Proporção e intervalo, com um coeficiente de confiança do 95%, dos frutos do café que continha brocas que apresentaram um alelo de 173 pb, ou seja a população que foi liberada (Guapotá).

Distância (m)	Percentagem	LI	LS
5	97.2	91.7	100
10	94.4	86.7	100
15	94.4	86.7	100
20	94.4	86.7	100
25	94.4	86.7	100
30	86.1	74.4	97.8
40	88.9	78.3	99.5
45	83.8	71.5	96.1
50	87.0	72.6	100
55	93.1	83.5	100
60	83.8	71.5	96.1
65	78.5	66.2	85,3
70	68.1	55,8	82.3

Dos 5000 espécimes liberados foram recapturados 1331, correspondente a 26,7% da população total. Através das avaliações dos frutos que continham perfurações, se revelou que a broca-do-café voou até 65 m no quadrante norte e no quinto dia da avaliação (Tabelas 4a e 4b). Nos tempos de amostragem 15 e 30 dias as recapturas foram próximas à zero em todos os quadrantes. Para os demais tempos um e cinco dias a maior recaptura das brocas se apresentou aos cinco dias; e enquanto no quadrante norte, em todas as distâncias realizamos recapturas, para os outros quadrantes (sul, este e oeste) só ocorreram até os 40 e 50 m de distância.

Tabela 4a. Número de brocas recapturadas nos quadrantes norte e sul, em cada distância e data de amostragem.

Distância (m)	Quadrante							
	Norte				Sul			
	Tempos de amostragem (dias)							
	1	5	15	30	1	5	15	30
5	7	44	0	1	43	47	0	0
10	12	107	0	0	20	48	0	0
15	2	55	1	0	19	57	0	0
20	0	57	0	0	4	31	0	0
25	3	54	3	3	0	18	0	0
30	2	44	1	1	2	32	0	0
40	3	37	0	0	0	12	0	0
45	0	26	0	2	0	0	0	0
50	0	27	1	0	0	0	0	0
55	0	22	2	2	0	0	0	0
60	0	13	0	0	0	0	0	0
65	0	10	0	0	0	0	0	0

Tabela 4b. Número de brocas recapturadas nos quadrantes leste e oeste, em cada distância e data de amostragem.

Distância (m)	Quadrante							
	Leste				Oeste			
	Tempos de amostragem (dias)							
	1	5	15	30	1	5	15	30
5	15	53	0	0	0	6	0	0
10	25	68	0	0	0	2	0	0
15	21	59	0	0	0	27	0	0
20	1	34	0	0	0	9	0	0
25	2	40	0	0	0	4	0	0
30	3	29	0	0	0	6	0	0
40	1	19	0	0	0	16	0	0
45	1	5	0	0	0	8	0	0
50	0	0	0	0	0	2	0	0
55	0	0	0	0	0	0	0	0
60	0	0	0	0	0	0	0	0
65	0	0	0	0	0	0	0	0

A média por árvore, do acumulado de brocas recapturadas através dos tempos de amostragem, indica que a distância 5 m, é aproximadamente 50% maior, em relação à distância de 10 m (Tabela 5).

Tabela 5. Média por árvore e erro padrão para o número acumulado de brocas recapturadas por data de amostragem e distância.

Distância (m)	Tempos de amostragem (dias)							
	1		5		15		30	
	Média acum.	Erro padrão	Média acum.	Erro padrão	Média acum.	Erro padrão	Média acum.	Erro padrão
5	2,7	0,9	7,4	1,4	7,4	1,4	7,2	1,3
10	1,4	0,1	4,1	0,4	4,1	0,4	4,1	0,4
15	1,4	0,1	2,7	0,2	2,7	0,2	2,7	0,2
20	1,0	0,0	1,8	0,1	1,8	0,1	1,8	0,1
25	1,7	0,3	2,1	0,3	2,1	0,3	2,2	0,3
30	1,4	0,2	1,7	0,2	1,7	0,2	1,7	0,2
40	1,3	0,3	1,7	0,2	1,7	0,2	1,7	0,2
45	1,0		1,5	0,2	1,5	0,2	1,6	0,2
50			1,4	0,2	1,4	0,2	1,4	0,2
55			1,3	0,1	1,3	0,1	1,4	0,1
60			1,6	0,4	1,6	0,4	1,6	0,4
65			1,7	0,3	1,7	0,3	1,7	0,3

Para ajustar os dados da média de brocas recapturadas por árvore, em função da distância para os tempos 30 e 90 dias, a expressão que melhor os descreve é

$$\hat{Y} = \alpha\beta^{X_i}$$

$Y$  = Número médio de brocas recapturadas por árvore.

$X$  = Distância da recaptura em metros.

De modo que, para o período desde o dia 1 até o dia 30 tem-se;

$$\hat{Y} = 0,94889 * -0,04634^{X_i}$$

$$(0,31667) (0,00798)$$

$$R^2 = 0,75$$

$$F_{1;11} = 33,72 \quad P < 0,001$$

Os valores em parêntesis indicam o erro padrão dos coeficientes.

$Y$  = Número médio de brocas recapturadas por árvore.

$X$  = Distância da recaptura em metros.

(Ver análise da variância no anexo B).

Na figura 5, indica-se descritivamente, a relação do número médio de brocas recapturadas por árvore em função da distância e o tempo desde o dia 1 até o dia 30.

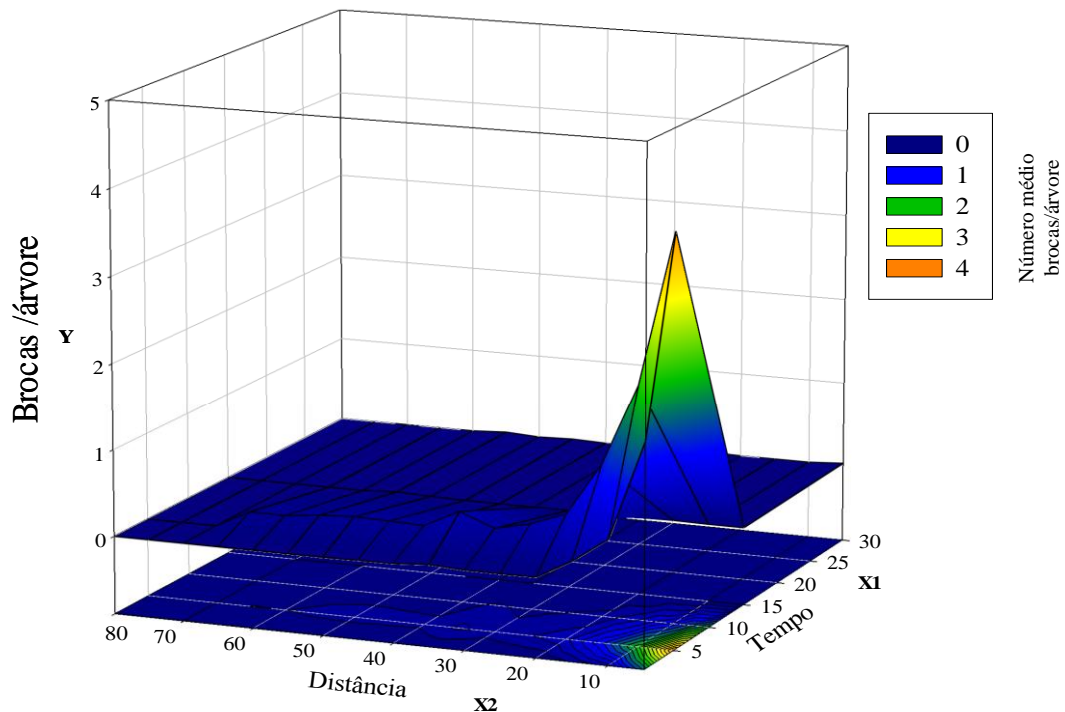


Figura 5. Modelo descritivo do movimento da broca-do-café no espaço ao longo do tempo desde o dia 1 até o dia 30.  $X_1$  são os tempos das recapturas,  $X_2$  as diferentes distâncias das recapturas a partir do ponto central da liberação e  $Y$  é número médio de brocas recapturadas por árvore nos diferentes tempos e distâncias.

A função que descreve o comportamento do movimento da broca-do-café do dia 45 até o dia 90, incluindo o tempo, pode-se expressar como:

$$Y_i = \beta_1 X_{2i}^{\beta_2} X_{3i}^{\beta_3} e^{u_i} \quad (\text{Equação 1})$$

$Y$  = Número médio de brocas recapturadas por árvore.

$X_2$  = Distância da recaptura em metros.

$X_3$  = Tempos em dias.

$U$  = Termo da perturbação estocástica.

$e$  = Base do logaritmo natural.



Ao transformar a equação (1) com a função logaritmo, obtém-se:

$$\ln Y_i = \ln \beta_1 + \beta_2 \ln X_{2i} + \beta_3 \ln X_{3i} + u_i$$

Escrito desta forma, o modelo está linearizado nos parâmetros  $B_1$ ,  $B_2$  e  $B_3$ . Neste modelo  $B_2$  é a taxa (parcial) da recaptura média de brocas com relação à distância, isto é, mede a mudança percentual na recaptura das brocas, devido a uma variação de 1% na distância, permanecendo o tempo constante. Da mesma maneira,  $B_3$  é a variação percentual (parcial) na recaptura média de brocas em relação ao tempo, permanecendo constante à distância.

Ao resolver utilizando o procedimento NLIN do software estatístico SAS, obtém-se.

$$\begin{aligned} \ln Y_i &= -3,0996 - 0,669 \ln X_{2i} + 1,90 \ln X_{3i} \\ &\quad (0,00087) \quad (0,0508) \quad (0,2501) \\ R^2 &= 0,891 \\ F_{3;61} &= 166,21 \quad P < 0,001 \end{aligned}$$

Os valores em parênteses indicam o erro padrão dos coeficientes (Ver a análise da variância no anexo C).

Neste caso, mantendo constante o tempo, um incremento de 1% na distância conduz em média a uma diminuição de 0,7% na recaptura das brocas.

Na forma similar, mantendo constante à distância, um incremento de 1% no tempo, implica um incremento em média de 1,9% da recaptura das brocas (Figuras 6 e 7).

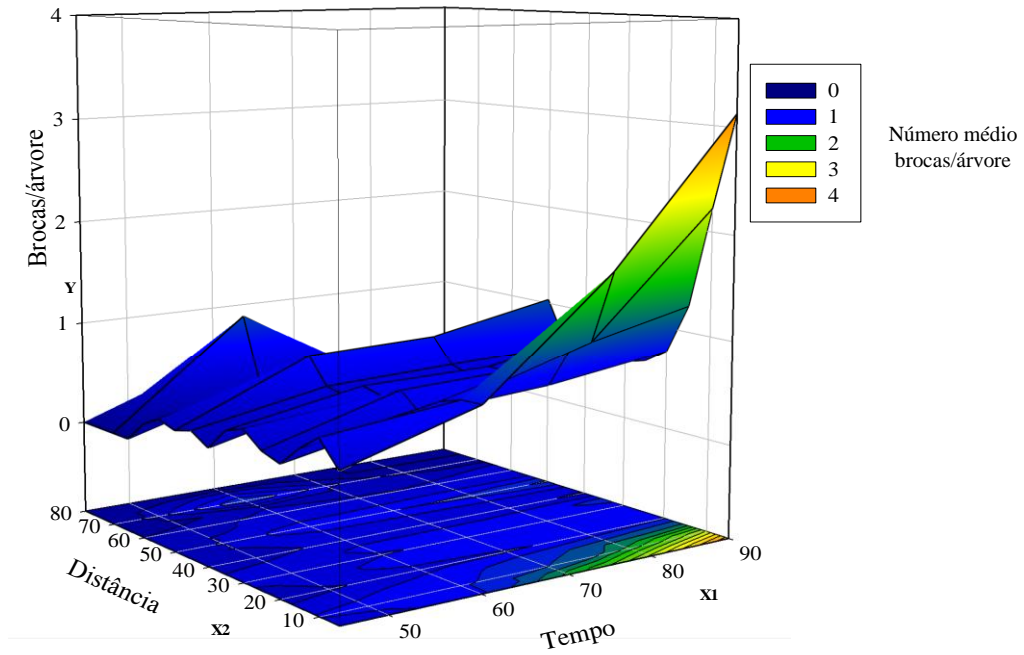


Figura 6. Modelo descritivo do movimento da broca-do-café no espaço ao longo do tempo desde o dia 45 até o dia 90.  $X_1$  são os tempos das recapturas,  $X_2$  as diferentes distâncias das recapturas a partir do ponto central, e  $Y$  número médio de brocas recapturadas por árvore nos diferentes tempos e distâncias.

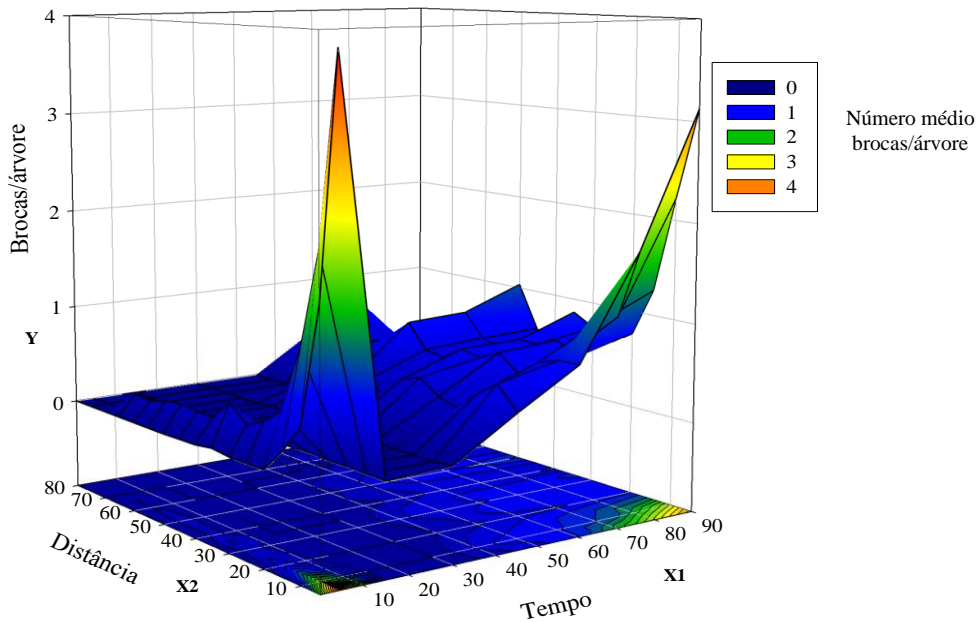


Figura 7. Modelo descritivo do movimento da broca-do-café no espaço ao longo do tempo desde o dia 1 até o dia 90.  $X_1$  são os tempos das recapturas,  $X_2$  as diferentes distâncias das recapturas a partir do ponto central e  $Y$  número médio de brocas recapturadas por árvore nos diferentes tempos e distâncias.

## 2.4. DISCUSSÃO

Neste trabalho usamos a expressão movimento da forma geral e é definido como “o processo mediante o qual os organismos deslocam-se individualmente no espaço ao longo do tempo” (Turchin 1998). A maioria dos trabalhos realizados na ecologia emprega o termo dispersão quando se referem ao movimento e redistribuição da população, o que conduz a uma dispersão espacial.

Este artigo descreve o primeiro relato de marcação-liberação-recaptura da broca-do-café usando marcadores moleculares, assim como é o primeiro experimento de campo com este inseto, que se utiliza o hospedeiro (os grãos do café) como armadilha, ao contrário de outros trabalhos que usam armadilhas com semioquímicos (Zolubas & Byers 1995, Byrne *et al.* 1996, Byers 1999, Acevedo 2006).

A técnica de marcação-liberação-recaptura tem sido usada em insetos, invertebrados, mamíferos e aves; no entanto, qualquer que seja o método que se utiliza deve se basear nas seguintes condições: (i) os animais marcados não serem afetados no que tange seu comportamento ou a esperança da vida e sem que as marcas se percam, (ii) os animais marcados podem se misturar completamente na população, e (iii) a probabilidade de recaptura é a mesma para todos os membros da população (Southwood 1978). Neste trabalho levamos em consideração estas condições.

A variação alélica do marcador molecular microssatélite HHK.1.6 nas populações da Catalina e Guapotá, permitiu realizar avaliações confiáveis do movimento da broca-do-café ao longo do tempo, e por várias gerações do inseto; além disso, este marcador pode ser visualizado com facilidade no gel de poliacrilamida, portanto, facilita a avaliação dos resultados. Acevedo *et al.* (2009) utilizaram o pigmento fluorescente Day-glo® como método de marcação nos indivíduos de *H. hampei*, e encontraram que o marcador se desprende com facilidade quando o inseto perfura o fruto, é de curta duração (até cinco dias) e de difícil visualização sobre o corpo do inseto. Segundo Steinberg & Jordan (1998) as pesquisas com ferramentas moleculares são um meio rápido para fazer medidas da dispersão e o movimento dos organismos, assim, o trabalho do campo

necessário com o componente molecular de nosso estudo, foi completado num tempo de três meses.

Segundo Jarne & Lagoda (1996) das técnicas genéticas, as aloenzimas e os marcadores baseados no DNA são os mais comumente usados como etiquetas moleculares nas pesquisas entomológicas, utilizados para determinar o movimento e dispersão das populações dos insetos. Assim, estudos onde se conjugam os protocolos de marcação-liberação-recaptura com as análises moleculares para estudar o movimento dos insetos, foram desenvolvidos por Lewis *et al.* (1997) para avaliar a estrutura das metapopulações na borboleta *Plebejus argus*.

Na presente pesquisa apresentamos o uso dos grãos de café como armadilhas isso foi possível porque *H. hampei* é específico ao hospedeiro (alimenta-se só sobre café) e a fêmea colonizadora uma vez iniciada a oviposição e até sua morte, permanece no interior do fruto cuidando da progênie. Além disso, o cafeeiro produz metabolitos secundários que atraem os adultos da broca (Bustillo 2006), por isso, este comportamento da espécie garante a recuperação da população liberada através dos frutos. Este método da planta hospedeira como armadilha também é utilizado para medir a emergência e colonização dos insetos (Bucher & Cheng 1970). No caso das larvas dos elaterídeos, elas são atraídas pelo dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) liberado no processo da germinação das sementes; os pesquisadores Willians *et al.* (1992) fazem uso deste comportamento para amostrar as populações deste besouro, colocando para germinar as sementes no solo e posteriormente recuperar os elaterídeos.

No entanto, armadilhas contendo atraentes têm sido utilizadas com sucesso nas técnicas de marcação-liberação-recaptura por se constituir em um método rápido e de fácil uso para amostragem de insetos (Reynolds *et al.* 1997). Além disso, elas permitem a captura e o aprisionamento dos insetos adultos (Pedigo & Rice 2006). Não obstante, as armadilhas para as estimativas do movimento e dispersão dos organismos causam um dilema, porque elas interceptam o vôo dos insetos e interrompem a dispersão, então, a medida real do movimento é afetada. Além disso, o efeito das armadilhas é de curta duração e podem modificar o comportamento dos insetos, já que a resposta é inerente às armadilhas e aos atraentes. Assim, para os estudos que envolvem parâmetros do movimento e

dispersão da broca-do-café, após a presente pesquisa é recomendado que se use os frutos do café como armadilhas, porque não influem no comportamento do inseto.

O número total de frutos com perfurações da broca-do-café foi de 1331. Este valor comparado com a quantidade de brocas liberadas sugere que uma alta proporção morreu sem ter encontrado e perfurado o fruto. Segundo Baker (1984), o movimento das populações é afetado diretamente pelos fatores bióticos, como os reguladores biológicos, e abióticos. Entre estes últimos, os mais limitantes são a umidade e a temperatura, que afetam a fisiologia de seu hospedeiro e os processos metabólicos. Estes fatores puderam ter afetado diretamente a sobrevivência das brocas liberadas, ao mesmo tempo, pode-se inferir que uma parte dos adultos que empreendem o vôo morre antes de perfurar o fruto.

Apesar da broca-do-café ter atingido distâncias de vôo de até 65 m, os resultados nos mostram que a broca-do-café tende a perfurar frutos localizados a menos de 40 metros do epicentro, inclusive, o maior número de brocas recapturadas em média foi aos cinco e dez metros. Isto indica que a broca é um inseto que voa pouco e a capacidade de movimentação esta restrita à área local.

Estes resultados são coerentes com os reportados por Castaño *et al* (2005) que avaliaram, na Colômbia, o efeito da poda sobre lotes vizinhos e encontraram que o inseto teve uma maior influência nos 15 m contíguos ao cafezal com poda. No entanto, o maior impacto sobre os níveis da infestação foi mais notório nas quatro primeiras fileiras. Segundo Alonzo (1984) o vôo das fêmeas adultas, únicas com esta capacidade, a não ser que aproveitem o impulso das correntes de ar, se reduz a uns poucos metros.

Com os relatos anteriores e os resultados da presente pesquisa, confirma-se que a habilidade dos indivíduos de *H. hampei* de se dispersar rapidamente e por si mesma é limitada pelo curto tempo que podem voar e as curtas distâncias que podem percorrer. Sendo assim, as estratégias de controle para este inseto, e o monitoramento com armadilhas devem levar em consideração as distâncias e o tempo reportados para o vôo da broca-do-café neste trabalho.

Para o ajuste dos dados, número médio de brocas recapturadas em função da distância em cada um dos tempos, se avaliaram os seguintes modelos: função da relação de Taylor da forma  $y = e^{(a+bX^c)}$ , onde *c* é taxa de mudança da

densidade com a distância; **a**: tamanho da amostra; **b**: fator de escala das unidades de medida da distância (Taylor 1980). Como também foi avaliada, a função da densidade da forma  $V(X) = (\alpha + \beta x^\phi)^{-1/\vartheta}$ , onde  $x, \alpha, \beta, \phi, \vartheta > 0$  y  $\phi, \vartheta$  são parâmetros de forma. Assim mesmo avaliou-se a função exponencial decrescente da forma  $\hat{Y} = \alpha\beta^{X_i}$ . Esta função oferece consistentemente o melhor ajuste aos dados, além disso, parâmetros confiáveis para descrever o movimento da broca-do-café no espaço ao longo do tempo.

No entanto, os dados de cada pesquisa são únicos, e não pode-se generalizar uma função, já que, a escolha depende da natureza dos dados e o interesse do pesquisador, para nosso caso a função que melhor se ajustou foi a exponencial decrescente da forma  $\hat{Y} = \alpha\beta^{X_i}$ .

Ao finalizar a fase experimental deste trabalho, realizamos as práticas de manejo integrado da broca-do-café sobre a população liberada na estação experimental La Catalina. Com esta prática evitamos a dispersão do alelo de 173 pb pelas outras regiões da zona central cafeeira colombiana garantindo seu uso em pesquisas posteriores, além disso para evitar possível cruzamento entre populações.

## 2.5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Acevedo B., F.E.; Gil P., Z.N.; Bustillo P., A.E.; Montoya R., E.C.; Benavides M., P. 2009.** Evaluación de marcadores físicos y moleculares como herramientas para el estudio de la dispersión de *Hypothenemus hampei*. *Cenicafé* 60 (1): 72-85.
- Acevedo. F. E. 2006.** Evaluación de marcadores físicos y moleculares para el estudio de la dispersión de la broca del café, *Hypothenemus hampei* (ferrari). Universidad de Caldas Facultad de Ciencias Agropecuarias Programa de Agronomía, Manizales (TESIS). 67p.
- Bucher G. E., Cheng H. H. 1970.** Use of trap plants for attracting cutworm larvae. *The Canadian Entomologist* July 1970 102 : pp 797-798.
- Bustillo P, A.E. 2006.** Una revisión sobre la broca del café, *Hypothenemus hampei* (Coleoptera: Curculionidae: Scolytinae), en Colombia. *Revista Colombiana de Entomología* 32(2): 101-116 .
- Byers, J.A. 1999.** Effects of attraction radius and flight path on catch of scolytid beetles dispersing outward through rings of pheromone traps. *Journal of Chemical Ecology* 25, 985–1005.
- Byrne, D.N.; Rathman, R.J.; Orum, T.V.; Palumbo, J.C. 1996.** Localized migration and dispersal by the sweet potato whitefly, *Bemisia tabaci*. *Oecologia* 105, 320–328.
- Gauthier N.; Rasplus J.Y. 2004.** Polymorphic microsatellite loci in the Coffee Berry Borer, *Hypothenemus hampei* (Coleoptera, Scolytidae). *Molecular Ecology Notes* 4 294–296.
- Hagler J. R.; Jackson C.G. 2001.** Methods for marking insects: Current techniques and future prospects. *Annual Review of Entomology* 46: 511–543.
- Huettel, M. D.; Calkins, C. O.; Hill. A. J. 1976.** Allozyme markers in the study of sperm precedence in the plum curculio, *Conotrachelus nenuphar*. *Ann. Entomol. Soc. Am.* 69: 465–468.
- Jaramillo J.; Chabi-Olaye A.; Kamonjo C.; Jaramillo A.; Vega F.E. 2009.** Thermal Tolerance of the Coffee Berry Borer *Hypothenemus hampei*:

Predictions of Climate Change Impact on a Tropical Insect Pest. PLoS ONE 4(8).

- Jarne P.; Lagoda, P.J.L.1996.** Microsatellites, from molecules to populations and back . Trends in Ecology and Evolution, Volume 11, Number 10, October , pp. 424-429(6).
- Lewis, O.T.; Thomas, C.D.; Hill, J.K.; Brookes, M.I.; Crane, T.P.R.; Graneau, Y.A.; Mallet, J.L.B.; Rose, O.C. 1997** Three ways of assessing metapopulation structure in the butterfly *Plebejus argus*. Ecological Entomology 22, 283–293. Pedigo, L.P., Rice, M.E. 2006. Entomology and Pest Management. New York: Prentice Hall, 742p.
- Portilla R., M. 1999.** Desarrollo y evaluación de una nueva dieta artificial para criar *Hypothenemus hampei*. Cenicafé 50(1):24-38.
- Reynolds, D. R.; Riley, J. R.; Armes, N. J.; Cooter, R.J .; Tucker, M.R.; Colvin, J. 1997.** Techniques for Quantifying Insect Migration. Methods in Ecological and Agricultural Entomology. CAB International. Wallingford (Inglaterra), 11-133
- Sevacherian, V.; Stern,V. M. 1972.** Spatial distribution patterns of Lygus bugs in California cotton fields. Environ. Entomol. 1: 695-704.
- Southwood T.R.E.; Henderson P.A. 2000:** Ecological Methods (3rd Edition). Blackwell Science, Oxford. 575 pp.
- Steinberg, E.K.; Jordan, C., 1998.** Using molecular genetics to learn about the ecology of threatened species: The allure and the illusion of measuring genetic structure in natural populations. In: Fiedler, P.L., Kareiva, P.M. (Eds.), Conservation Biology, 2nd Edition. Chapman and Hall, New York, pp. 440-460.
- Taylor R, A. J. 1980.** A family of regression equations describing the density distribution of dispersing organisms. Nature (Lond) 286:53–55
- Turchin, P. 1998.** Quantitative analysis of movement. Measuring and Modeling Population Redistribution in Animals and Plants. Sinauer Associates, Inc., Sunderland, USA.
- Williams, L.; Schotzko, D.J.; McCaffrey, J.P. 1992.** Geostatistical description of the spatial distribution of *Limonium californicus* (Coleoptera: Elateridae)



wireworms in the Northwestern United States with comments on sampling.  
Environ. Entomol. 21, (5) 983- 995 (13).

**Zolubas, P.; Byers, J.A. 1995.** Recapture of dispersing bark beetle *Ips typographus* L. Col.,Scolytidae) in pheromone-baited traps: regression models. J. Appl. Ent. 1 19, 285-289.

## CONCLUSÕES GERAIS

As informações disponíveis sobre a dispersão da broca-do-café *Hypothenemus hampei* (Ferrari) (Coleoptera: Curculionidae), e as observações do presente trabalho, permitem concluir que:

A variabilidade genética de *H. hampei* no Brasil, não é muito diferente das populações colombianas, isto é, a introdução de poucas linhagens fundadoras no Brasil, e a posterior dispersão destas poucas linhagens pelas Américas, explica a baixa variabilidade genética neste continente.

O alelo com um peso molecular de 173 pb presente nas populações da broca-do-café da região de Guapotá (Santander - Colômbia), e ausente nas populações da região central cafeeira colombiana, é viável para realizar estudos ecológicos da broca-do-café, através do tempo e por varias gerações do inseto, no entanto, deve-se ter em conta que a fecundidade e agressividade das populações que contem o polimorfismo não sejam superiores as populações do local onde foram liberadas.

Foi confirmado que a broca-do-café é um inseto que não voa grandes distâncias; a capacidade de movimentação está restrita a área local, além disso a habilidade dos indivíduos de *H. hampei* de se dispersar rapidamente e por si mesma é limitada pelo curto tempo que podem voar e as curtas distâncias que podem percorrer.

A metodologia apresentada pode ser utilizada em pesquisas posteriores para determinar; (i) os parâmetros da distribuição das populações da broca-do-café no espaço e no tempo, (ii) o movimento das populações de *H. hampei* nas diferentes condições agrônômicas e ecológicas da cultura, (iii) a velocidade da dispersão de genes de resistência a pesticidas, (iv) obter modelos mais precisos para realizar predições reais da pressão da praga sobre as culturas do café e (v) determinar os efeitos das mudança climáticas sobre as populações do inseto.

## ANEXOS

### **Anexo A. Descrição dos componentes do dispositivo para liberar populações da broca-do-café; na figura 7 se apresenta com todos os componentes.**

O dispositivo foi desenvolvido para fazer liberações das populações de *H. hampei* e garantir que os espécimes saem do recipiente ao mesmo tempo. Para o desenho levaram-se em conta alguns fatores climáticos que ajudam no movimento de *H. hampei*, como temperatura, vento e luz; por conseguinte, os componentes principais foram (fonte de luz, temperatura e vento) e descrevem-se como segue:

**Fonte artificial de luz e calor:** consiste em uma lâmpada incandescente de 10 W de potência elétrica, que foi usada para simular ambiente artificial de luz e calor, assim, ativar os músculos das asas de *H. hampei* para sair a voar (Figura 1).



Figura 1. Lâmpada de 10 W.

**Fonte de ar:** usou-se um ventilador centrifugo com um rotor de cinco cm de diâmetro e asas planas, tem uma potência de 700 W (Figura 2a). A saída do fluxo de ar regula-se com uma comporta da forma borboleta, localizada na parte superior do ventilador (Figura 2b).



Figura 2a. Ventilador aspas planas



Figura 2b. Comporta borboleta

**Recipiente para o depósito dos espécimes:** este componente tem forma cônica, com 35 mm de diâmetro inferior, 86 mm de diâmetro superior e uma altura de 100 mm (Figura 3a), é de material plástico transparente que permite visualizar a atividade das brocas; na base do funil inferior há um tecido poroso para distribuir o fluxo do ar (Figura 3b).



Figura 3a. Recipiente depósito espécimes

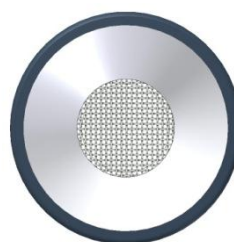


Figura 3b. Recipiente com tecido poroso

**Fonte da potência:** está composta por uma bateria de 12 V, de carga seca e 5 A de corrente (Figura 4).



Figura 4. Bateria de carga seca

**Interruptor manual:** apresenta-se dos tipos, um pulsador normalmente fechado (NC), ativa-se a uma distância de quatro metros para não perturbar o vôo das brocas liberadas (Figura 5a), o outro interruptor é de tipo ON-OFF, esta localizado no cabo do dispositivo (Figura 5b).



Figura 5a Pulsador normalmente fechado  
OF



Figura 5b. Interruptor ON-

**Malha perfurada:** localizada na base inferior do dispositivo, apresenta perfurações de 5 mm de diâmetro; sua função é permitir a passagem do ar externo para a boca do ventilador (Figura 6).



Figura 6. Malha perfurada

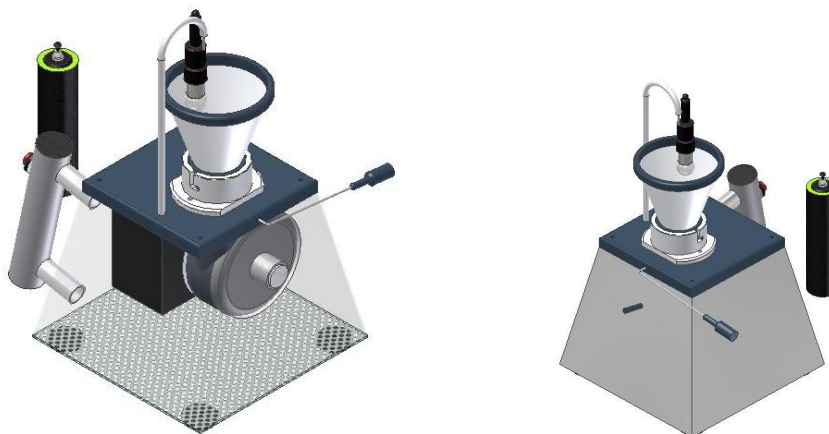


Figura 7. Dispositivo com todos os componentes

**Anexo B. Análise da variância para o número médio de brocas-do-café recapturadas por árvore, em função da distância até o dia 30.**

<b>Number of Observations Read</b>	16
<b>Number of Observations Used</b>	13
<b>Number of Observations with Missing Values</b>	3

<b>Analysis of Variance</b>					
<b>Source</b>	<b>DF</b>	<b>Sum of Squares</b>	<b>Mean Square</b>	<b>F Value</b>	<b>Pr &gt; F</b>
<b>Model</b>	1	9.76872	9.76872	33.72	0.0001
<b>Error</b>	11	3.18658	0.28969		
<b>Corrected Total</b>	12	12.95530			

<b>Root MSE</b>	0.53823	<b>R-Square</b>	0.7540
<b>Dependent Mean</b>	-0.67285	<b>Adj R-Sq</b>	0.7317
<b>Coeff Var</b>	-79.99189		

<b>Parameter Estimates</b>						
<b>Variable</b>	<b>Label</b>	<b>DF</b>	<b>Parameter Estimate</b>	<b>Standard Error</b>	<b>t Value</b>	<b>Pr &gt;  t </b>
<b>Intercept</b>	Intercept	1	0.94889	0.31667	3.00	0.0122
<b>DIS</b>	DIS	1	-0.04634	0.00798	-5.81	0.0001

**Anexo C. Análise da variância para o número médio de brocas-do-caférecapturadas por árvore, em função da distância do dia 45 até o dia 90.**

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Approx Pr > F
<b>Model</b>	3	8.4573	2.8191	166.21	<.0001
<b>Error</b>	61	1.0346	0.0170		
<b>Uncorrected Total</b>	64	9.4920			

Parameter	Estimate	Approx Std Error	Approximate 95% Confidence Limits		Skewness
<b>a</b>	0.000795	0.000876	-0.00096	0.00255	3.0889
<b>b</b>	-0.6696	0.0508	-0.7711	-0.5681	-0.0771
<b>c</b>	1.9007	0.2501	1.4006	2.4008	0.2043