

DIVERSIDADE GENÉTICA DE POPULAÇÕES DO BICHO-MINEIRO EM REGIÕES CAFEIIRAS DO BRASIL¹

Bruna Iório Espíndola Simões², Juliana Camargo Martinati Schenk³, Karina Alves da Silva⁴, Paula de Souza Guimarães⁵, Mirian Perez Maluf⁶, Oliveiro Guerreiro Filho⁷, Lilian Padilha⁸

¹ Trabalho financiado pelo Consórcio Brasileiro de Pesquisa e Desenvolvimento do Café – Consórcio Pesquisa Café

² Bolsista Consórcio Pesquisa Café, CPT, brunaioriosimoes@gmail.com

³ Bolsista CNPq/INCT, Embrapa Café/IAC, julianamartinati@hotmail.com

⁴ Bolsista Consórcio Pesquisa Café, CPT, karinaalves88@hotmail.com

⁵ Bolsista Consórcio Pesquisa Café, CPG, psguim@yahoo.com.br

⁶ Pesquisador, PhD, Embrapa Café, Brasília-DF, mirian.maluf@embrapa.br

⁷ Pesquisador, PhD, Instituto Agronômico de Campinas, bolsista CNPq DT oliveiro@iac.sp.gov.br

⁸ Pesquisador, DSc, Embrapa Café, Brasília-DF, lilian.padilha@embrapa.br

RESUMO: Considerada a principal praga do cafeeiro, o bicho-mineiro (*Leucoptera coffeella*) aparece em todas as regiões produtoras de café do país, causando maiores danos em lavouras estabelecidas em locais de clima quente e seco, como o de Cerrados. O conhecimento da variabilidade genética deste inseto pode auxiliar na concepção de estratégias de manejo adequadas do cultivo. Nosso objetivo foi avaliar a diversidade genética em populações do bicho-mineiro de lavouras de café arábica utilizando marcadores moleculares do tipo ISSR. Neste trabalho, amostras de lagartas foram coletadas de diferentes cultivares e em cinco regiões no país com altitudes que variaram de 460m a 950m. O controle químico da praga era realizado com diferentes princípios ativos de produtos de contato e/ou sistêmicos. O DNA de um bulk de cinco indivíduos foi extraído, utilizando kit comercial, e amplificado com 13 primers do tipo ISSR (CA ou AC)_n. Os dados moleculares foram transformados em matrizes binárias 0 e 1, para a ausência e presença de bandas. Foram calculados o conteúdo de informação polimórfica ou PIC, a identidade e diversidade genética. O dendrograma foi obtido pelo método UPGMA e, nele pode ser observado que a divergência genética das populações de bicho-mineiro foi organizada em função da cultivar e da altitude do local em que a lavoura está instalada. Em menor intensidade, o modo de ação do produto, se de contato ou sistêmico, também parece interferir na distância genética entre as populações. Estudos com maior número de populações e representatividade regional estão em andamento.

PALAVRAS-CHAVE: *Leucoptera coffeella*, *Coffea arabica*, marcador ISSR, variabilidade genética.

GENETIC DIVERSITY OF LEAF MINER POPULATIONS IN BRAZILIAN COFFEE REGIONS

ABSTRACT: Considered the key coffee pest, the leaf miner (*Leucoptera coffeella*) occurs in all coffee producer regions of the country, specially injuring crops established in hot and dry climates, such as Cerrados. Knowledge of the genetic variability of this insect may help in the design of appropriate crop management strategies. Therefore, our goal was to evaluate the genetic diversity of leaf miner populations in arabica coffee crops with ISSR markers. Samples of *L. coffeella* caterpillars were collected in coffee different cultivars and in five regions located at altitudes ranging from 460m to 950m. The chemical pest control was performed with different active ingredients of contact and/or systemic products. The bulk DNA of five individuals was extracted using a commercial kit and amplified by 13 ISSR (CA or AC)_n primers. Molecular data were transformed into binary matrices 0 and 1 for the absence and presence of bands. Polymorphic information content or PIC, identity and genetic diversity were calculated. The dendrogram was obtained by the UPGMA method and it can be observed that the genetic divergence of the coffee leaf miner populations was organized according to the cultivar and the altitude of the place where the crop is installed. With a minor effect, the mode of action of the product, be it by contact or systemic, also seems to interfere with the genetic distance between the populations of this study. Studies with larger populations and greater regional representation is ongoing.

KEY WORDS: *Leucoptera coffeella*, *Coffea arabica*, ISSR, genetic variability.

INTRODUÇÃO

O *Leucoptera coffeella* ou bicho-mineiro é um inseto monófago cuja lagarta se alimenta de folhas das plantas de *Coffea* spp.. As grandes perdas provocadas pelo bicho-mineiro ocorrem devido ao consumo do tecido paliçádico dessas folhas resultando em necrose e menor área fotossintética, podendo ocorrer queda das folhas minadas. Até o momento, a quase totalidade das cultivares de café arábica, registradas no Brasil, é susceptível ao bicho-mineiro, tornando-se indispensável o controle químico desta praga. O uso intensivo de defensivos agrícolas pode impactar de maneira significativa esse inseto e contribuir para o aumento da sua resistência a esses produtos. O manejo integrado de pragas é uma estratégia importante para minimizar o impacto do uso de defensivos, e fatores como cultivares (Conceição et al., 2005) e forma de ação dos produtos químicos (Diez-Rodríguez et al. 2006; Fragoso et al. 2002) podem implicar em

adoção de estratégias distintas no manejo. Assim, o conhecimento da diversidade genética das populações do bicho-mineiro pode contribuir para a definição de técnicas de manejo apropriadas para lavouras atacadas por essa praga. A utilização de marcas moleculares em estudos genéticos de populações dos insetos permite acessar a diversidade genética diretamente ao nível da molécula do DNA. O uso de marcadores moleculares determinou, por exemplo, que populações de *L. coffeella* observadas na Colômbia e no Brasil consistem em uma mesma espécie e compartilham uma origem comum recente (Pantoja-Gomes et al., 2019).

No presente trabalho, populações de *L. coffeella* de diferentes regiões do Brasil foram coletadas para estudos de diversidade genética utilizando marcadores do tipo ISSR (*Inter Simple Sequence Repeat*), escolhidos com base na sua abundância em genomas eucariotos (Luque et al. 2002). Esse marcador é construído a partir de sequências de microssatélites e permite a geração de grande número de bandas informativas sem a necessidade prévia do conhecimento da sequência do genoma a ser estudado, e vem sendo utilizado para estudos dessa natureza em insetos (Six et al. 2018; Souza et al. 2018, Mendki et al. 2011).

MATERIAL E MÉTODOS

Amostras de lagartas do bicho-mineiro foram coletadas diretamente das folhas de cafeeiros com minas/lesões não predadas por inimigos naturais, colocadas em tubos fechados hermeticamente contendo 1 mL de etanol absoluto. As amostras foram mantidas em temperatura ambiente durante o seu transporte até o laboratório de Biologia Molecular do IAC-Centro de Café, em Campinas-SP, onde foram mantidas a uma temperatura de -20°C até o momento da extração do DNA. As amostras oriundas de diferentes regiões produtoras de café no Brasil (Figura 1) foram caracterizadas quanto ao local, altitude, cultivar de café sob ataque da praga e produtos químicos utilizados nos talhões (Tabela 1).

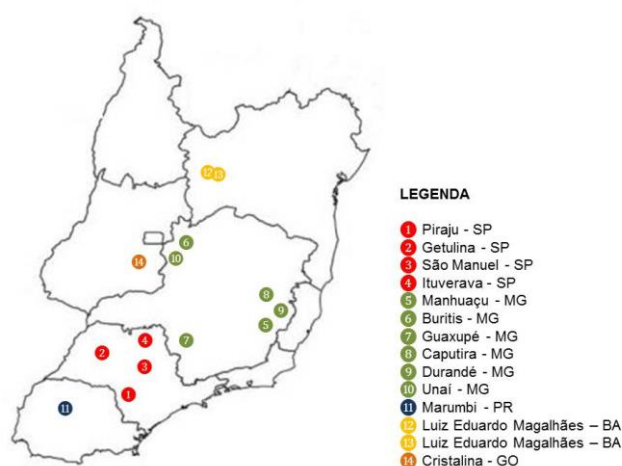


Figura 1. Regiões da coleta das amostras de lagartas de *L. coffeella*.

O DNA das lagartas foi extraído com o kit comercial Quick-gDNA Mini Prep (*Zymo Research*). Foi utilizado um bulk de cinco indivíduos montado em função do local de coleta, cultivar e produto aplicado. Os bulks de DNA foram amplificados com 13 primers ISSR (CA ou AC)_n (Tabela 2), via PCR (*Polymerase Chain Reaction*). A reação de PCR foi realizada com 40 ng de DNA genômico em um volume final de reação de 25 µL, e ciclos de amplificação dos ISSR como segue: 94°C/5 min; 45 ciclos de 94°C/1 min, 35°C/ 45 seg, 72°C/ 1,5 min; e uma etapa final a 72°C/10 min. Os produtos da amplificação das reações foram separados por eletroforese em gel de agarose 2% corado com brometo de etídeo. Os fragmentos de DNA gerados foram estimados por comparação com o marcador de peso molecular 1Kb. Os perfis das bandas fortes foram transformados em matrizes binárias 0 e 1, para a ausência e presença de bandas.

O conteúdo de informação polimórfica ou PIC, que mede o poder do marcador em detectar o polimorfismo, foi calculado com $PIC = \sum P_{ij}^2$ onde P_{ij} é a frequência do $j^{\text{ésimo}}$ alelo para o $i^{\text{ésimo}}$ loco, somados através de todos os alelos dos locos (Nei, 1973). A identidade genética e a diversidade genética de cada população foram estimadas segundo Nei (1978) com o uso do programa POPGene versão 1.32 (Yeh et al., 1997). O dendrograma foi obtido pelo método UPGMA (*Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean*) através programa MEGA-X (Kumar et al., 2018) utilizando como base a matriz de diversidade genética gerada no programa anterior.

Tabela 1. Caracterização das amostras de *L. coffeella* relativas às cultivares e regiões de café onde foram coletadas, bem como, ao controle químico - princípios ativos e modos de ação- aplicado nessas lavouras. Campinas, 2019.

Cultivar	ID	Local de coleta	Altitude	Princípio ativo do defensivo	Modo de ação do defensivo
Catuai Vermelho IAC 144	MG6-Ct 144	Buritis, MG	920m	Cloridrato de cartape, Fenprothrin, Novaluron, Abamectina	Contato e fisiológico
Catuai Amarelo IAC62	MG5-Ct 62	Guaxupé, MG	900m	Abamectina Cloranthraniliprole	Contato e ingestão
Catuai Amarelo IAC62	SP7-Ct 62	São Manuel, SP	600m	Profenofós, Lufenuron	Contato e ingestão
Catuai Vermelho IAC 144	BA1-Ct 144	L.E.Magalhães, BA	720m	Cloridrato de cartape, Profenofós, Lufenuron	Contato e ingestão
Catuai Vermelho IAC 144	BA2-Ct 144	L.E. Magalhães, BA	720m	Cloridrato de cartape, Profenofós, Lufenuron	Contato e ingestão
Catuai Vermelho IAC144	SP3-Ct 144	Ituverava, SP	605m	Deltametrina, Flubendiamida	Contato e ingestão
Tupi	PR5-Tupi	Marumbi, PR	635m	Cloranthraniliprole	Contato e ingestão
Tupi IAC 1669-33; Obatã IAC 1669-20	SP12-Tupi + Obatã	Piraju, SP	615m	Cloranthraniliprole, Abamectina	Contato e ingestão
Catuai Vermelho IAC 99	MG10-Ct 99	Unaí, MG	880m	Thimetoxam, Cloridrato de cartape, Fenprothrin	Contato e sistêmico
Ipiranga; Obatã	SP17-Ipiranga+Obatã	Getulina, SP	460m	Cloranthraniliprole, Abamectina	Contato e sistêmico
Palma 2	GO1-Palma	Cristalina, GO	950m	Thimetoxam, Cloridrato de cartape, Fenprothrin, Novaluron	Contato, sistêmico e fisiológico
Catuai*	MG7-Ct*	Manhuaçu, MG	900m	Thiamethoxam, Cyproconazole, Imidacloprido	Sistêmico
Catuai*	MG8-Ct*	Caputira, MG	580m	Imidacloprido, Triadimenol	Sistêmico
Catuai*	MG9-Ct*	Durandé, MG	635m	Thiamethoxam, Cyproconazole, Flutriafol, Imidacloprido	Sistêmico

*= a cultivar não foi especificada

Tabela 2. Sequência dos primers ISSR amplificados em amostras de *L. coffeella* coletadas em cinco estados brasileiros. Campinas, 2019.

Primer*	Sequência (5'-3')	Nº Amplicons polimórficos	Tamanho dos Amplicons (pb)	T°C anelamento
UBC817	(CA) ₈ A	12	350-1500	54,8°C
UBC818	(CA) ₈ G	9	250-750	57,2°C
UBC825	(AC) ₈ T	16	250-1250	54,8°C
UBC826	(AC) ₈ C	13	400-2000	57,2°C
UBC827	(AC) ₈ G	9	270-1250	57,2°C
UBC846	(CA) ₈ RT	16	250-1500	56,5°C
UBC847	(CA) ₈ RC	13	300-1500	58,8°C
UBC848	(CA) ₈ RG	9	450-1250	58,8°C
UBC855	(AC) ₈ YT	15	300-1200	56,5°C
UBC856	(AC) ₈ YA	6	350-1500	56,5°C
UBC857	(AC) ₈ YG	10	250-1250	58,8°C
UBC888	BDB(CA) ₇	3	300-900	56,4°C
UBC889	DBD(AC) ₇	8	300-750	55,6°C

Fonte*: University British Columbia, Vancouver, CA. 2006.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O conhecimento da diversidade genética de populações do bicho-mineiro pode auxiliar na compreensão do comportamento deste inseto e contribuir para o desenvolvimento de práticas de manejo integrado mais sustentáveis. Com o objetivo de avaliar a distância genética entre as populações de *L. coffeella*, presentes em 14 locais de cinco estados brasileiros (Figura 1), 13 marcadores ISSR foram amplificados no DNA das lagartas coletado nessas regiões (Tabela 2). Esses insetos foram coletados em lavouras de diferentes cultivares de café cujo manejo agroquímico era realizado com diferentes princípios ativos e/ou modos de ação do defensivo agrícola (Tabela 1). O número de amplicons polimórficos/primer variou de 3 a 16, sendo este último valor observado com o uso do primer UBC 846, e com o qual também foi observada a faixa mais ampla de tamanho de fragmentos (250 a 2000pb). Um total de 140 marcas ISSR foram utilizadas nas análises de diversidade genética, e o valor médio calculado para o PIC desses primers foi de 0,49, podendo estes serem considerados informativos para as análises de diversidade genética. Os valores da identidade de Nei (1978) variaram de 0.3077 para a relação entre MG-GO1 Palma 2_Contato+Sistêmico+Fisiológico e as populações de BA1-CT144_Contato e BA2-CT144_Contato; sendo o maior valor de identidade genética de 0,8462 observado entre MG10-CT99_Contato+Sistêmico e MG5-CT62_Contato, e entre MG9-CT*_Sistêmico e MG8-CT*_Sistêmico.

Pelo agrupamento obtido pelo método UPGMA três arranjos (I, II e III) puderam ser discriminados, sendo que a cultivar e a altitude do local em que a lavoura está instalada foram fatores determinantes na diversidade genética entre as populações do inseto (Figura 3).

No primeiro arranjo (I) podem ser observadas que as altitudes variaram de 460 a 900m. No subarranjo 1a, cinco populações de lagartas coletadas em lavouras de cultivares Catuaí (MG5-CT62, MG10-CT99, SP3-CT144, MG8-CT* e MG9-CT*) e uma na da cultivar Palma 2 (GO1-Palma2_Contato+Sistêmico+Fisiológico) - que tem o Catuaí IAC-81 como um de seus parentais- foram agrupadas. Nesse subarranjo as cultivares foram agrupadas de acordo com as altitudes aproximadas de 900m, onde cultivares Catuaí IAC62 e IAC99 foram agrupadas à cultivar Palma 2, e a altitude de 600m, em que as populações MG8 e MG9 coletadas em lavouras de Catuaí sem identificação da cultivar, foram agrupadas à população presente em lavoura de Catuaí IAC144. No subarranjo 1b sob a altitude de 600 m, lagartas que atacaram a cultivar Tupi (oriunda do cruzamento entre Vila Sarchi e Híbrido de Timor) foram agrupadas àquelas que atacaram o Catuaí 62. Chama a atenção que ambas utilizaram formulações cujo modo de ação é o de contato e ingestão. Um terceiro subarranjo 1c foi formado independente da altitude, mas com características voltadas às origens das cultivares. Nele além da lavoura de Catuaí, as lagartas foram coletadas em folhas de Catucaí, Obatã e Ipiranga. Esta última é uma variedade de *C. canephora*, e o Catucaí é originário do cruzamento de Icatu (Bourbon x *C. canephora*) com Catuaí. Nesse subarranjo ainda pode ser considerado que as populações estavam sob sistema de controle químico com produtos sistêmicos.

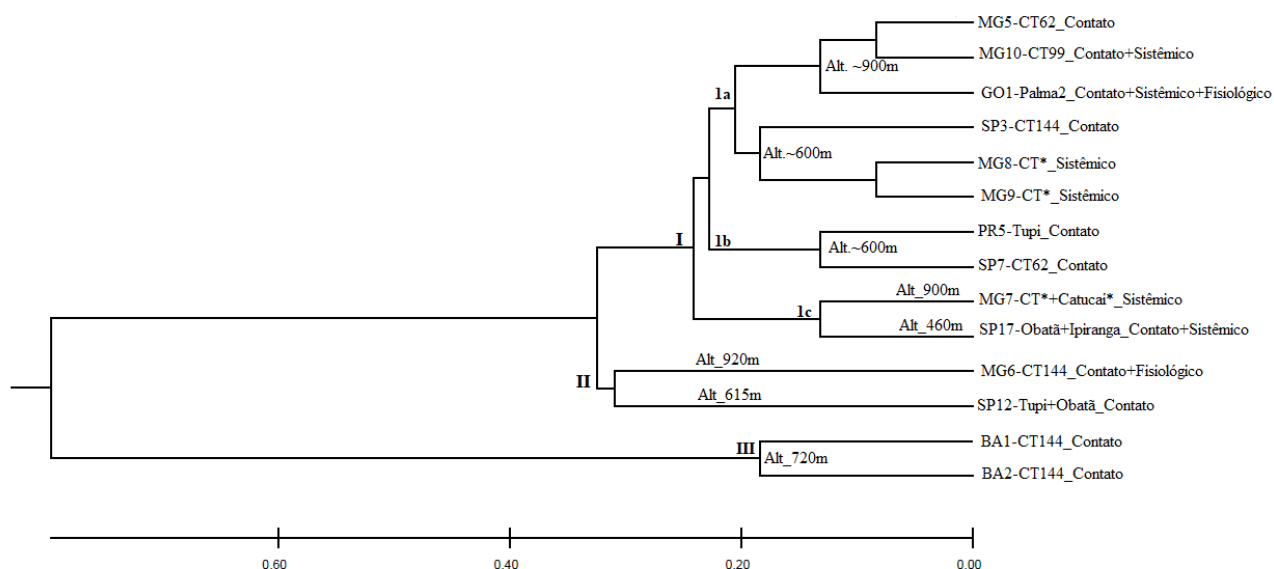


Fig. 3. Dendrograma obtido pelo método UPGMA, com base nas distâncias genéticas de Nei (1978). Foram considerados 140 amplicons ISSR, detectados em 14 populações de *L. coffeella*, as quais estão descritas na tabela 1. (Abreviações: Alt = Altitude; as duas primeiras iniciais do nome das amostras são referentes ao Estado onde foram coletadas as lagartas; CT=Catuaí; CT*=Catuaí sem especificação da cultivar. Modo de ação do defensivo agrícola: Contato; Sistêmico; Fisiológico).

Um arranjo II formado por populações de *L. coffeella* presentes em lavouras de Catuaí, Obatã e Tupi, parece ter ocorrido em função do modo de ação do produto que é por contato, já que cultivar e altitude não foram determinantes neste arranjo II. Li et al (2016) afirmam que mudanças biológicas, fisiológicas e assinaturas genéticas são, significativamente, alteradas em resposta à seleção por inseticidas em *Culex pipienscomplex*. Em nosso trabalho, mesmo que com menor efeito, o modo de ação do defensivo agrícola parece interferir na diversidade genética do bicho-mineiro, e pode ser um fator importante a ser considerado no manejo integrado do controle de pragas. Por outro lado, mais estudos precisam ser realizados para verificar o alcance desse fator.

Um arranjo III foi formado por duas populações de lagartas coletadas em diferentes pivôs de uma mesma fazenda sob os mesmos tratos culturais. A distância genética entre essas amostras pode ser devido à variação dentro de população, variável que não foi englobada nesse estudo.

CONCLUSÕES

A diversidade genética de populações de *L. coffeella* é influenciada pela cultivar atacada pela lagarta, bem como, pela altitude em que estão implantadas tais lavouras. Em menor intensidade, o modo de ação do produto, se sistêmico ou de contato, também parece interferir na distância genética entre as populações do bicho-mineiro avaliadas neste estudo.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos a colaboração dos produtores de café das diferentes regiões do país pelo envio das amostras de *L. coffeella* ao nosso laboratório. Agradecemos ao Dr. Sergio Parreiras Pereira do Instituto Agrônomo IAC - Café pela parceria e envolvimento na obtenção de amostras. Agradecemos o apoio financeiro do Consórcio Pesquisa Café e do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- CONCEIÇÃO, C.E.C., GUERREIRO-FILHO, O., GONÇALVES, W. Flutuação populacional do bicho-mineiro em cultivares De café arábica resistentes à ferrugem. *Bragantia*, 64(4), p. 625-631, 2005.
- DIEZ-RODRÍGUEZ, G.I., BAPTISTA, G.C., TREVIZAN, L.R.P, HADDAD, M.L., NAVA, D.E. Resíduos de Tiametoxam, Aldicarbe e de seus metabólitos em folhas de cafeeiro e efeito no controle de *Leucoptera coffeella* (Guérin-Mèneville) (Lepidoptera: Lyonetiidae). *Neotropical Entomology* 35(2):257-263, 2006.
- FRAGOSO, D.B., JUSSELINO FILHO, P., PALLINI FILHO, A., BADJI C.A. Ação de inseticidas organofosforados utilizados no controle de *Leucoptera coffeella* (Guérin-Mèneville) (Lepidoptera: Lyonetiidae) sobre o Ácaro Predador *Iphiseiodes zuluagai* Denmark & Muma (Acari:Phytoseiidae). *Neotropical Entomology* 31(3):463-467, 2002.
- KUMAR, S., STECHER, G., LI, M., KNYAZ, C. AND TAMURA, K. MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across computing platforms. *Mol. Biol. Evol.* 35: 1547–1549, 2018.
- Li, C., Guo, X., Zhang, Y., Dong, Y., Xing, D., Yan, T. et al. Identification of genes involved in pyrethroid-, propoxur-, and dichlorvos- insecticides resistance in the mosquitoes, *Culex pipienscomplex* (Diptera: Culicidae). *Acta Tropica* 157 84–95, 2016.
- LUQUE, C., LEGAL, L., STAUDTER, H., GERS, C., WINK, M. ISSR (Inter Simple Sequence Repeats) as genetic markers in Noctuids (Lepidoptera). *Hereditas* 136: 251–253, 2002. (Brief report)
- MENDKI M.J., SHARMA A.K., VIJAY VEER, AGRAWAL O.P., SHRI PRAKASH, PARASHAR B.D. Population genetic structure of *Culex quinquefasciatus* in India by ISSR marker. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine* 357-362, 2011.
- NEI, M. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics*, 89, 583-590, 1978.
- PANTOJA-GOMEZ, L.M., CORRÊA, A.S., OLIVEIRA, L.O., GUEDES, R.N.C. Common Origin of Brazilian and Colombian Populations of the Neotropical Coffee Leaf Miner, *Leucoptera coffeella* (Lepidoptera: Lyonetiidae). *Journal of Economic Entomology*, XX(X), 2019, 1–8. (doi: 10.1093/jee/toy416).
- PASCHOAL, A. D. Pragas, Praguicidas e a Crise Ambiental: Problemas e Soluções. Rio de Janeiro: FGV, 1979. 106p.
- SIX, D.L., VERGOBBI, C., CUTTER, M. Are survivors different? Genetic-based selection of trees by mountain pine beetle during a climate change-driven outbreak in a high-elevation pine forest. *Frontiers in Plant Science*. 9: Article 993, 2018. (doi: 10.3389/fpls.2018.00993).
- WRIGHT, S. Evolution and the genetics of populations: variability within and among natural populations. University of Chicago. Chicago, 1978.
- YEH, F. & T. BOYLE. POPGENE 1.32. *Molecular Biology and Biotechnology Center*. University of Alberta, Center for international Forestry Research. Alberta, Canadá. 1997.