

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
CURSO DE AGRONOMIA**

**DIVERGÊNCIA GENÉTICA EM *Leucoptera coffeella* DA REGIÃO DO
TRIÂNGULO MINEIRO E ALTO PARANAÍBA**

ANDRÉ LUIZ BORGES

**ANA MARIA BONETTI
(Orientadora)**

Monografia apresentada ao curso de
Agronomia da Universidade Federal de
Uberlândia para a obtenção do grau de
Engenheiro Agrônomo

Uberlândia – MG
Junho – 2005

**DIVERGÊNCIA GENÉTICA EM *Leucoptera coffeella* DA REGIÃO DO
TRIÂNGULO MINEIRO E ALTO PARANAÍBA**

APROVADO PELA BANCA EXAMINADORA EM 17/06/2005

Profª Drª Ana Maria Bonetti
(Orientadora)

Prof Dr. Mauro Batista Lucas
(Co-Orientador)

Prof Dr. Cícero Donizete Pereira
(Membro da Banca)

Uberlândia – MG
Junho – 20005

AGRADECIMENTOS

Ao Pai Celestial pela oportunidade, Luz, Força e Paz.

À minha família, meu pai Júlio Borges e minha mãe Vilma Borges, aos meus irmãos Kleber Borges e Poliana Borges. À minha companheira Juliana.

Aos meus colaboradores das Fazendas dos municípios de Araguari, Monte Carmelo, Patrocínio e Pereiras.

Aos meus colegas da Agronomia.

Aos colegas do Laboratório de Genética/ INGEB-UFU.

Ao Instituto de Genética e Bioquímica e Instituto de Ciências Agrárias pelas facilidades concedidas.

A todos os meus Professores, em especial Dr^a Bonetti, Dr Kerr e Dr Mauro.

ÍNDICE

RESUMO	4
1. INTRODUÇÃO	6
2. REVISÃO DE LITERATURA	11
3. MATERIAL E MÉTODOS	13
3.1 – Material biológico.....	13
3.2 – Manuseio experimento do bicho mineiro.....	17
3.3 – Extração de DNA.....	21
3.4 – Quantificação do DNA.....	22
3.5 – Eletroforese de DNA em gel de agarose	23
3.6 – DNA Polimórfico Amplificado ao Acaso (RAPD).....	23
3.7 – Análise estatística.....	26
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	28
5. CONCLUSÕES	31
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	33

RESUMO

Considerando que existem poucos trabalhos sobre a variabilidade genética dessa praga na região do Triângulo Mineiro e Alto Paranaíba, esse trabalho foi realizado com o objetivo de avaliar e determinar as distâncias genéticas entre populações do inseto, utilizando marcadores moleculares gerados por *Random Amplified Polymorphic DNA* – (RAPD). O material biológico investigado foi a larva do bicho mineiro. Foram coletadas amostras em 03 municípios vizinhos, representativos na produção e qualidade do café em Minas Gerais, na região do Triângulo Mineiro (Araguari e Monte Carmelo) e na região do Alto Paranaíba (Patrocínio). A amostra testemunha foi obtida no Estado de São Paulo, no município de Pereiras. Em cada município mineiro foram coletadas amostras de populações do bicho mineiro em cafeeiro cv “Mundo Novo”, em 03 lavouras. Em Araguari: Faz. São José, Faz. Lagoa Seca e Viveiro Brasil; em Monte Carmelo: Faz. Crioulos I, Crioulo II e Faz. Água limpa; em Patrocínio: Faz. Makena, Faz. Garça Branca e Faz. EPAMIG e em Pereiras-SP: Faz. Hokko do Brasil. Foi utilizado um *bulk* de 10 larvas por local de coleta. Sete “primers” *Operon Technologies* geraram 59 bandas, confirmadas em três repetições da reação de RAPD para cada “primer”. A análise estatística foi gerada pelo método de porcentagem em desacordo no programa Statistica 6.0. Os resultados de RAPD foram visualizados em gel de agarose 1,5% e coloração com brometo de etídio. Os 7 marcadores gerados por RAPD permitiram a separação das populações de *Leucoptera coffeella* em três subgrupos: Araguari, Monte Carmelo e Patrocínio, no grupo de Minas Gerais e *out grup*, Pereiras-SP. O município de Araguari – MG, que procede à rotação de diferentes inseticidas e não mantém intercâmbio de mudas com os demais municípios, apresentou-se

isolado dentro do grupo mineiro. Os municípios de Monte Carmelo e Patrocínio, ambos do Estado de Minas Gerais, utilizam princípios ativos diferentes de inseticida e apresentaram, aproximadamente, 36,5% de divergência genética. Os resultados obtidos indicam que a rotação de grupos químicos diferentes de inseticidas, causa menor pressão de seleção no inseto praga, deixando de selecionar possíveis linhagens resistentes do inseto, a um determinado princípio ativo de inseticida e conseqüentemente, o seu grupo químico. O que permitiu o uso de um princípio ativo de inseticida por mais tempo, em consórcio com outros princípios ativos de grupos químicos diferentes.

1. INTRODUÇÃO

O cafeeiro é uma dicotiledônea da Família *Rubiaceae* e Gênero *Coffea*, que segundo Lima et al. (2003), possui como centro de origem a Etiópia, no continente africano, onde ainda ocorre em seu estado nativo.

Embora no Brasil sejam plantados em escala comercial apenas os cultivares das espécies *Coffea canephora* e principalmente a espécie *C. arabica* encontrada em 85 % dos países cafeicultores, existem muitas outras espécies de cafeeiros (CANECCHIO FILHO, 1987).

As variedades, “Sumatra”, “Borbon”, “Catuaí” e “Mundo Novo” são as mais cultivadas no Brasil, destacando-se a cultivar “Mundo Novo”, provavelmente, resultante de uma recombinação genética natural entre “Sumatra” e “Borbon Vermelho”, gerando um café muito rústico e de elevada produtividade. Esse cultivar possui o porte do “Sumatra”, as folhas se assemelham às do “Borbon Vermelho” e apresenta muitas ramificações secundárias.

De acordo com o Anuário Estatístico da Agricultura Brasileira – Agriannual (2005) o Brasil é o maior produtor de café em grão do mundo, com produtividade superior a 40 milhões de sacas de 60 Kg de café beneficiado, sendo a região Sudeste a maior produtora de café, contribuindo com mais de 32.449 mil sacas de 60Kg. O Estado de Minas Gerais contribui com, aproximadamente, 19.765 mil sacas, o Estado do Espírito Santo, em torno de 8.360 mil sacos e o Estado de São Paulo, como terceiro maior produtor, com mais de 4.153 mil sacos.

Segundo Malavolta et al. (1993), a abertura de novas áreas de cultivo, como as grandes zonas de cerrado, que possuem solos pobres em fertilidade e condições climáticas mais secas aliado ao uso irracional e freqüente de defensivos agrícolas favoreceram a ocorrência e proliferação de pragas e doenças nas populações de cafeeiro, sendo as principais, a *Leucoptera coffeella*, popularmente “bicho mineiro do cafeeiro” e a *Hemileia vastatrix*. que provoca a doença “ferrugem do cafeeiro”.

O bicho mineiro, segundo Crowe (1964) é um inseto do Gênero *Leucoptera* (*Lepidoptera:Lyoniidae*) com quatro espécies, *Leucoptera coffeina*, *L. coma* e *L. meyricki*, encontradas na África e a *L. coffeella*, presente em toda a região Neotropical (América do Sul e Central e a maioria das Ilhas do Caribe).

A *Leucoptera coffeella* (Guérin –Menéville, 1842) é um inseto monófago e foi introduzido no Brasil, no ano de 1850, provavelmente, através de mudas provenientes das Antilhas e das Ilhas de Bourbon, conforme referências de Pragas... (2000).

O inseto *L. coffeella* sua fase de mariposa possui tamanho médio de 6,5 mm de envergadura, com asas brancas na parte dorsal (SOUZA et al., 1998; GALLO et al., 2002).

Sendo um inseto fototrópico negativo e de hábito crepuscular auroral, seu comportamento característico é ocultar-se durante o dia, na página inferior do limbo foliar. No início do pôr-do-sol, o adulto abandona seu esconderijo e inicia suas atividades de alimentação e acasalamento. A fêmea tem uma postura média de 7 ovos por noite, podendo ovipositar até 60 unidades durante seu ciclo de vida, que pode variar de 19 a 87 dias. A oviposição é feita na lâmina superior das folhas e não é comum a oviposição de dois ou mais ovos na mesma folha. Os ovos levam de 5 a 21 dias para dar origem às lagartas, que tem seu habitat no mesófilo foliar. O período larval tem duração de 9 e 40 dias, conforme as condições de calor e umidade. Terminado esse período, as lagartas abandonam o interior das folhas, saem pela página inferior, tecem um fio de seda e deslocam-se para o terço inferior do cafeeiro, onde ficam incubadas em um casulo característico em forma de X (Figura 1). O estágio de pupa tem duração de 5 a 26 dias, em condições de umidade e temperatura adequadas, dando origem à nova forma adulta de mariposa que possui vida média de 15 dias, recomeçando assim um novo ciclo e, conseqüentemente, novas gerações (GALLO et al., 2002).

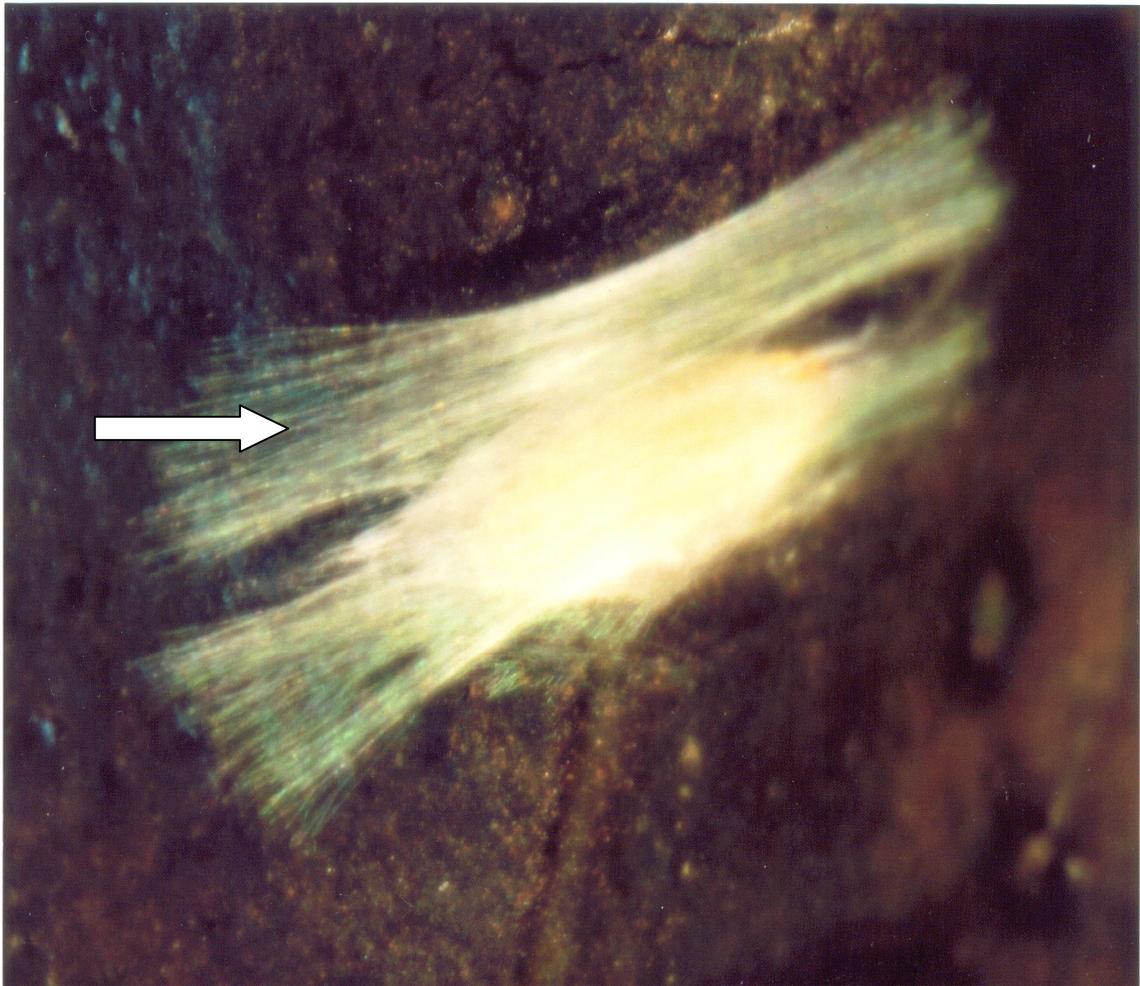


Figura 1: Casulo em forma de X (seta), característico da espécie *Leucoptera coffeella*.

O prejuízo causado pela *L. coffeella* é indireto, pois a larva do inseto ataca o mesófilo foliar causando manchas características (Figura 2), que diminuem a área fotossintética e como consequência, a produção de fruto. Os ataques das larvas induzem produção e acúmulo de etileno, no tecido do pecíolo foliar, induzindo à abscisão foliar (GALLO et al., 2002).

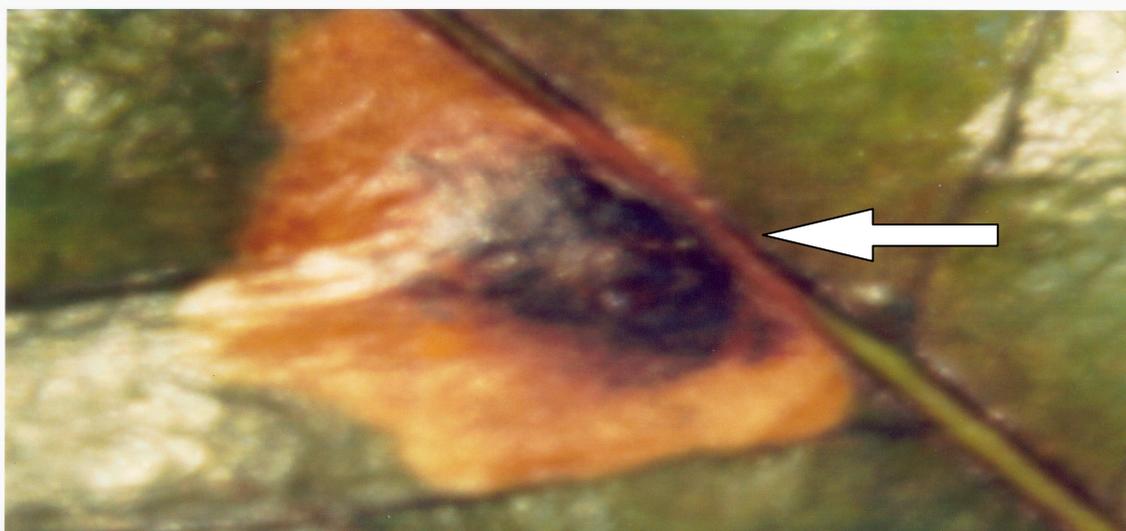


Figura 2: Superfície foliar do cafeeiro, com mancha (seta) causada pela larva do inseto *Leucoptera coffeella*.

Malavolta et al. (1993), Souza et al. (1998), Guedes; Fragoso (1999) salientam que de abril a maio, no início do período seco, as condições do meio ambiente ficam mais favoráveis ao inseto nas áreas de cerrado, fazendo com que a população aumente, caracterizando um primeiro pico populacional da praga. Essa suposta explosão populacional, segundo os autores, é preventivamente controlada com aplicações, no solo de inseticidas sistêmicos granulados, por ocasião do período chuvoso de novembro a janeiro. O controle é complementado, curativamente, com pulverizações foliares com vários inseticidas, dentre eles os Carbamatos e Piretróides. No período de julho a setembro, o inseto atinge seu maior pico populacional, exigindo sucessivas aplicações de inseticidas em caráter curativo, o que pode selecionar insetos resistentes a diferentes princípios ativos dos inseticidas.

2. REVISÃO DE LITERATURA

A utilização de técnicas de análise molecular pode ser informativa no estudo de populações de inseto praga.

A técnica do DNA Polimórfico Amplificado ao Acaso (RAPD - *Random Amplified Polymorphic DNA*) uma das derivações da PCR, utiliza “primers” curtos e de seqüências arbitrárias. É um método para gerar marcadores moleculares que não exige o conhecimento prévio das seqüências do DNA a serem estudadas.

Os marcadores RAPD, possuem caráter dominante, detectando-se os polimorfismos como presença (homozigotos dominantes ou heterozigotos) ou ausência de bandas (homozigoto recessivo). A ausência de bandas representa o conjunto de todos os alelos de um determinado *locus* que não pode ser amplificado devido à inserções, deleções ou mutações de ponto no sítio de anelamento dos “primers”. A técnica de RAPD detecta apenas um alelo de um *locus*. Codominância de marcadores RAPD resulta de pequenas inserções ou deleções de DNA entre sítios de iniciação dos “primers”, sendo que a detecção só pode ser feita por análise de segregação de marcadores. As principais aplicações da

técnica RAPD residem na obtenção de “fingerprints” genômicos de indivíduos, variedades e populações, análise da estrutura, diversidade genética em populações naturais, populações resultantes de melhoramento, bancos de germoplasma, estabelecimento de relacionamento filogenético entre diferentes espécies, construção de mapas genéticos de alta cobertura genômica e localização de genes de interesse econômico (FERREIRA e GRATAPAGLIA, 1998). Esses autores citam, ainda, a importância dessa técnica nos programas de melhoramento, pois é uma das poucas técnicas que possibilitam a análise genética detalhada para um grande número de marcadores, em populações naturais ou na caracterização de bancos de germoplasma, envolvendo centenas ou milhares de indivíduos.

Considerando que existem poucos trabalhos sobre a variabilidade genética dessa praga na região do Triângulo Mineiro e Alto Paranaíba, esse trabalho foi realizado com o objetivo de avaliar e determinar as distâncias genéticas entre populações do inseto, nas cidades de importância da região, utilizando marcadores moleculares gerados por RAPD.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 – Material biológico

O material biológico investigado foi a larva do inseto *Leucoptera coffeella*, coletada em 03 (três) municípios vizinhos e representativos na produção e qualidade do café em Minas Gerais: Araguari e Monte Carmelo (Triângulo Mineiro) e Patrocínio (Alto Paranaíba). A amostra testemunha foi coletada no Estado de São Paulo, na cidade de Pereiras (Tabela 1) em cafeeiro do cultivar “Mundo Novo” (Figura 3).

Os experimentos foram conduzidos no laboratório do Instituto de Genética e Bioquímica – Universidade Federal de Uberlândia (UFU), no período de agosto de 2003 a setembro 2004.

Tabela 1: Locais de coleta do material biológico (*Leucoptera coffeella*) nos Estados de Minas Gerais e São Paulo, dados de 1997 (Informação: INSTITUTO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA - IBGE, 2005).

Cidades	Coordenadas geográficas	Área plantada de café (ha)
Araguari	<p>Lat:18°38'50"S</p> <p>Long:48°11'14"W</p> <p>Altitude:921 metros</p>	12.000
Monte Carmelo	<p>Lat:18°43'29"S</p> <p>Long:48°29'55"W</p> <p>Altitude:870 metros</p>	11.800
Patrocínio	<p>Lat:18°56'38"S</p> <p>Long:46°59'33"W</p> <p>Altitude:965 metros</p>	28.675
Pereiras-SP	<p>Lat:23°04'34"S</p> <p>Long:47°58'33"W</p> <p>Altitude:490 metros</p>	16



Figura 3: Cafeeiro cultivar “Mundo Novo”. Foto realizada no Viveiro Brasil em Araguari.

As larvas do bicho mineiro foram coletadas ao acaso, em três propriedades rurais distintas, em cada município (Tabela 2). Nos locais de coleta, independente da idade da planta, foram coletadas 50 folhas de cafeeiro cultivar “Mundo Novo”, do terço médio a baixo. As amostras foram acondicionadas em sacos de papel perfurados e levadas ao Laboratório de Genética / UFU, onde as larvas vivas foram retiradas das folhas e mantidas a -80°C, em tubos eppendorf, até a manipulação experimental. Em cada propriedade foi aplicado um questionário a respeito da lavoura.

Tabela 2: Municípios e Propriedades Rurais de coleta de *Leucoptera coffeella*.

Municípios	Local de coleta	Proprietários ou Responsáveis	Propriedades rurais	Data da coleta
Araguari	1	Sr. José Bento	Faz. São José	15/09/2003
	2	Sr. Irineu	Faz Lagoa Seca	15/09/2003
	3	Sr. Tarcisio	Viveiro Brasil	15/09/2003
Monte Carmelo	4	Sr. Yermak	Faz. Crioulos 1	26/09/2003
	5	Sr. Ione Agassi	Faz. Crioulos 2	26/09/2003
	6	Sr. Francisco	Faz. Água Limpa	26/09/2003
Patrocínio	7	Sr. Otair	Faz. Makena	27/09/2003
	8	Sr. José Grossi	Faz. Garça Branca	27/09/2003
	9	Sr. Lázaro	Faz. Experimental de Patrocínio EPAMIG	27/09/2003
Pereiras (SP)	10/ SP	Sr. Alvimar Ferreira	Faz. Experimental HOKKO do Brasil	02/10/2003

3.2 – Preparação experimental do bicho mineiro

Após a retirada das larvas do bicho mineiro das folhas de cafeeiro, foram selecionadas aquelas com, no mínimo, 4 mm e de coloração branco a amarelo-perolizada (Figura 4).

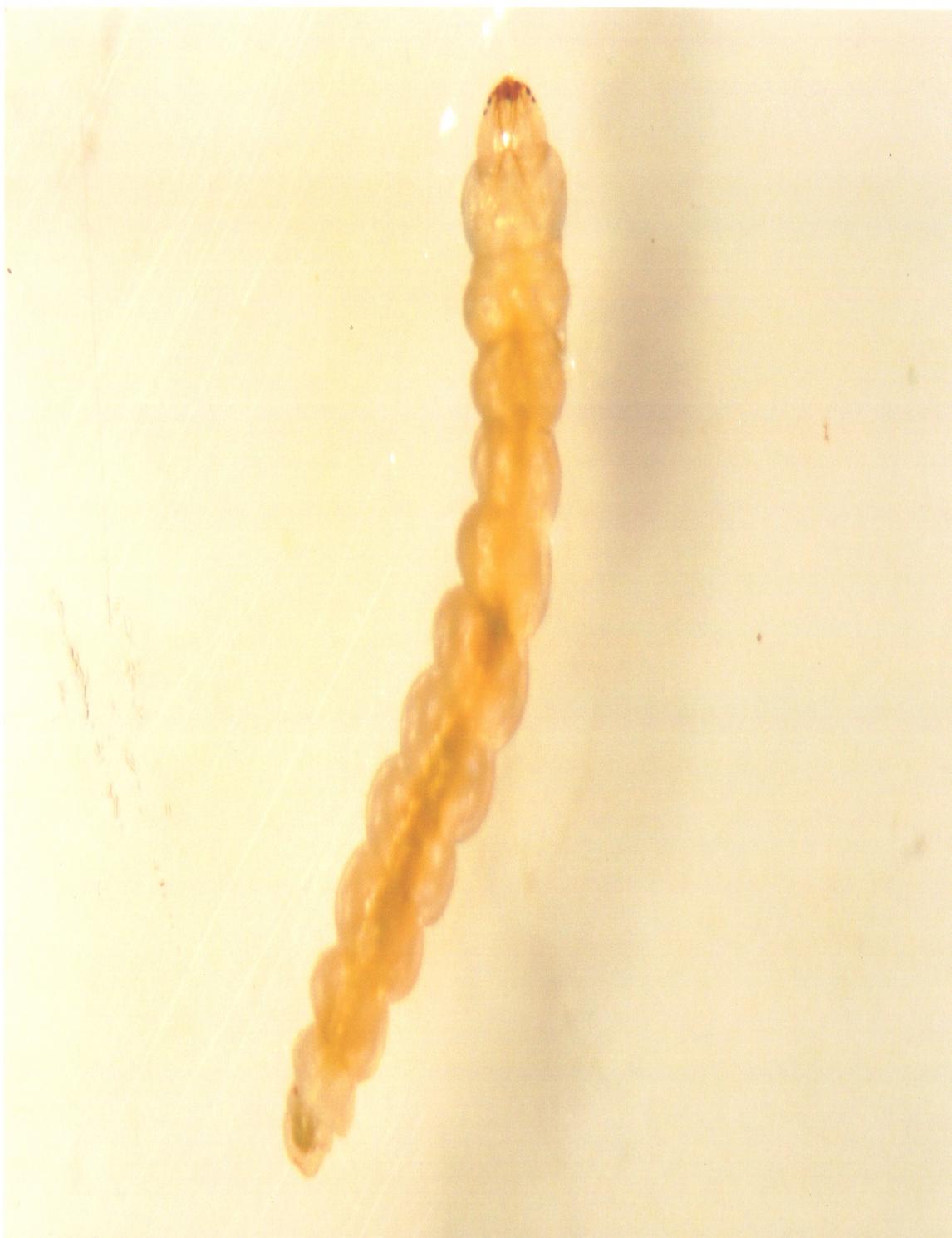


Figura 4: Padrão de larva de *Leucoptera coffeella* selecionado para análise.

Devido ao reduzido tamanho das larvas, optou-se por bulk de 10 indivíduos, como amostra de cada local de coleta, o que apresentou resultados satisfatórios em quantidade e qualidade do DNA.

Em placas de Petri, com o auxílio de pinça e bisturi estéreis, sob esteriomicroscópio Heerbrugg Switzerland, Mild M 3 C,. cada larva foi lavada com 500 μ l de água destilada. O ânus, os últimos segmentos anelares, o aparelho digestivo e seu conteúdo foram retirados com auxílio de bisturi (Figura 5). O tegumento e a região da cabeça da larva foram lavados com 500 μ l de água destilada e estocados a -80°C , em novo tubo eppendorf.

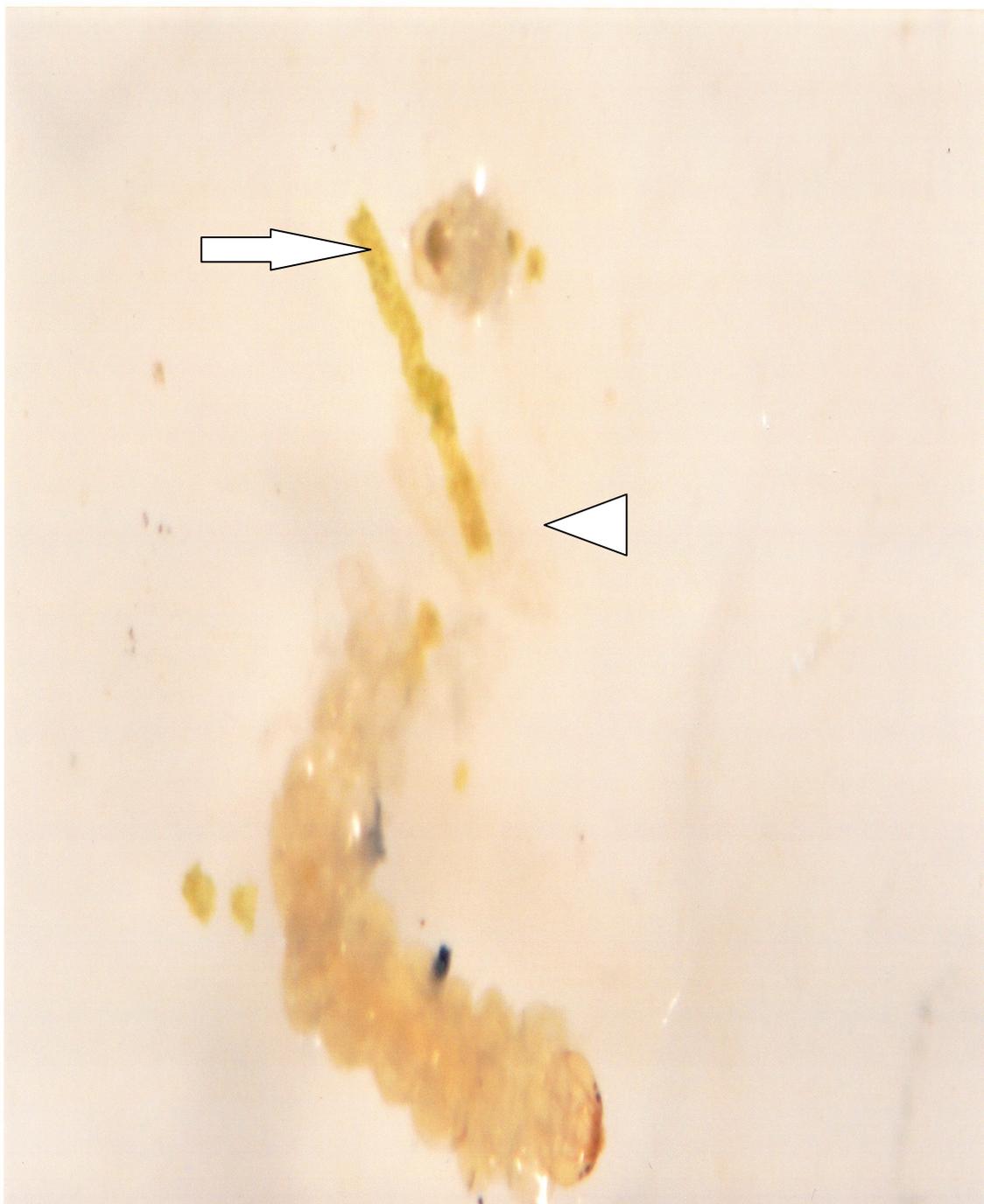


Figura 5: Processamento pré-experimento da larva de *Leucoptera coffeella*, remoção da folha de café (seta) e conteúdo gastrointestinal (ponta de seta).

3.3 – Extração de DNA

O DNA foi extraído pelo método de Sheppard et al. (1992), com modificações introduzidas no Laboratório de Genética / UFU.

Para cada 10 larvas maceradas em nitrogênio líquido, foram adicionados 200 µl de tampão de Grinding (10 mM Tris-Cl, 60 mM NaCl, 30 mM sacarose, 10 mM EDTA e água destilada). A solução foi transferida do graal de porcelana para tubo eppendorf de 2 ml, centrifugada por 1 minuto a 10.000 rpm, descartado o sobrenadante e acrescentados 400 µl de tampão de Lise (300 mM Tris-Cl, 40 mM SDS, 20 mM EDTA, 0,7% DEPEC), para expor o DNA cromossomal. Os tubos foram mantidos em gelo por 15 minutos. Adicionados 10 µl de proteinase K e incubados em Banho-Maria por 45 minutos a 45°C. Posteriormente, foi acrescentado fenol, dobrando o volume da solução em tubo eppendorf e centrifugado por 1 minuto a 5000 rpm, coletado o sobrenadante e transferido para um novo tubo eppendorf, adicionando solução fenol:clorofórmio (1:1) até dobrar o volume do sobrenadante e centrifugado por 1 minuto a 5000 rpm. Coletado o sobrenadante e transferido para novo tubo eppendorf e acrescentado fenol: clorofórmio: álcool isoamílico (25:24:1). Centrifugado por 1 minuto a 5000 rpm, coletado o sobrenadante e transferido para outro tubo eppendorf ao qual se adiciona 1/10 do volume de NaCl 2 M e 2 volumes de etanol 100% e gelado.

As amostras foram mantidas a -20°C por 24 horas para precipitar o DNA. Centrifugado por 15 minutos a 13000 rpm, lavou-se o DNA precipitado com 500 µl de

etanol 70 %, tomando cuidado para o “pellet” não ser descartado. Logo após o “pellet” secou à temperatura ambiente e foi ressuspenso com 30 µl de água ultrapura.

A qualidade das amostras de DNA (Figura 6) foi verificada em gel de Agarose 1%, visualizadas em transiluminador UV e as imagens fotografadas em VDS Image System (Pharmacia).

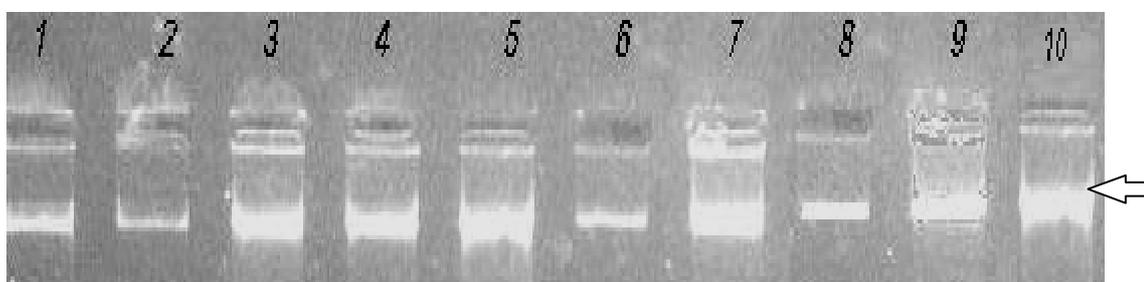


Figura 6: Resultado da extração de DNA (seta), *bulk* de 10 larvas de *Leucoptera coffeella*.

1 – Faz. São José; 2 – Faz. Lagoa Seca; 3 – Viveiro Brasil; 4 – Faz. Crioulos 1; 5 – Faz.

Crioulos 2; 6 – Faz. Água Limpa; 7 – Faz. Makena; 8 – Faz. Garça Branca; 9 –Faz.

Experimental de Patricínio EPAMIG; 10 (SP) – Faz. Experimental HOKKO do Brasil. Gel de agarose 1,0%, coloração com brometo de etídio.

3.4 – Quantificação do DNA

O DNA foi quantificado por absorvância a 260 nm em espectrofotômetro U - 2000, Hitachi. Uma alíquota de 1 µl de cada amostra foi diluída 1000 vezes em

água ultrapura, para a leitura. A concentração de DNA foi calculada segundo Oliveira (1998):

$$[DNA] = ABS\ 260 \times fc \times fd$$

onde:

ABS 260nm = absorvância, da amostra a 260 nm. (nm)

fc = fator de diluição da amostra (adimensional)

fd = (50) fator de conversão da cubeta (adimensional)

3.5 – Eletroforese de DNA em gel de agarose

Os produtos amplificados foram separados em gel de agarose 1,5% em tampão Tris-Borato EDTA (TBE) 0.5X e corado com brometo de etídio (0,5 µg/ml).

Foram aplicados 20 µl de cada amostra e 3 µl de tampão de carregamento (azul de bromofenol 3,61 M, Xileno Cianol 4,6M, Sacarose 1,17 M e EDTA 0,1 M pH 8.0). A eletroforese foi conduzida a 90 Volts por 2,5 hora. Os resultados, após coloração, foram visualizados em transiluminador UV e as imagens foram fotografadas em VDS Image System (Pharmacia).

3.6 – DNA Polimórfico Amplificado ao Acaso (RAPD)

Foram testadas as concentrações de 5, 10 12,5 e 15 ng/μl de DNA, para realização do RAPD. As concentrações de 10, 12,5 e 15 ng/μl, apresentaram um padrão de banda satisfatório, sem nenhuma diferença polimórfica entre elas, permitindo, então, trabalhar com 10 ng/ μl de DNA em cada reação.

Foram testados “primers” curtos de seqüência aleatória, sendo selecionados 7 “primers” (Operon Technologies) que apresentaram padrões de bandas adequadas para análise da divergência genética entre as populações (Tabela 3). Foram obtidas 59 bandas amplificadas, com boa intensidade e definição (Figura 7), nas 03 (três) repetições realizadas para cada “primer”, consideradas na análise para a montagem da matriz das distâncias genéticas.

Tabela 3: “Primers” selecionados para a reação RAPD em *Leucoptera coffeella*

“Primers”	Seqüência 5' → 3'
OPA 01	5'-CAGGCCCTTC-3'
OPA 02	5'-TGCCGAGCTG-3'
OPA 04	5'-AATCGGGCTG-3'
OPA 06	5'-GGTCCCTGAC-3'
OPA 15	5'-TTCCGAACCC-3'
OPA 17	5'-GACCGCTTGT-3'
OPM 11	5'-GTCCACTGTG-3'

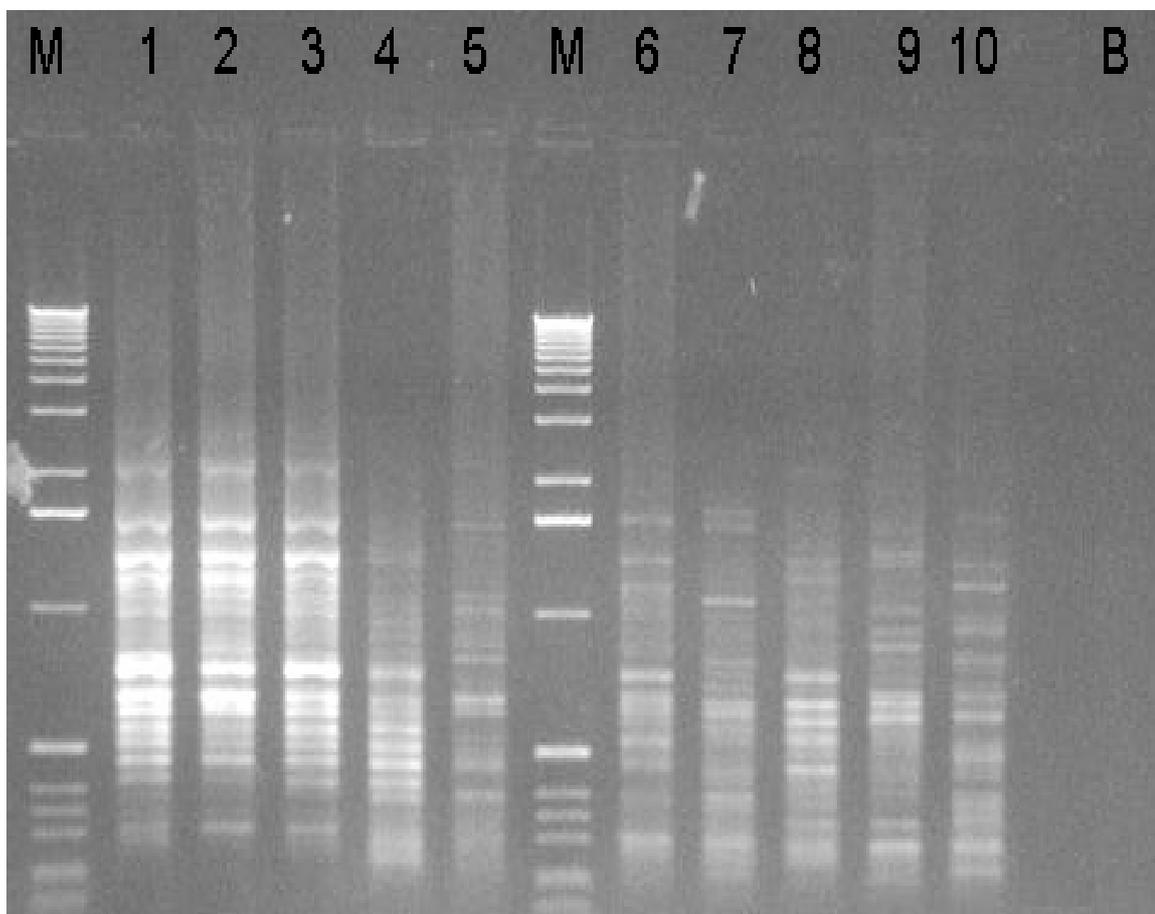


Figura 7: Produtos de PCR amplificados com “primer” OPA 02. M→ marcador de peso molecular de 1 Kb, 1 –Faz. São José; 2 – Faz. Lagoa Seca; 3 – Viveiro Brasil; 4 – Faz. Crioulos 1; 5 – Faz. Crioulos 2; 6 – Faz. Água Limpa; 7 – Faz. Makena; 8 – Garça Branca; 9 – Faz. Experimental de Patrocínio EPAMIG; 10 (SP) – Faz. Experimental Hokko do Brasil e B – branco da reação. Gel de 1,5%, coloração com brometo de etídio.

A reação de amplificação de RAPD, foi preparada com Tris-Cl 10 mM, Kcl 50 mM, MgCl₂ 2,5 mM, dNTPs 100 µM de cada dNTP (dCTP, dATP, dGTP, dTTP), 10 pmoles de “primer”, 1,5 U *Taq*-DNA polimerase, 10 ng de DNA genômico e volume final completado

com água ultrapura para 20 µl. Cada reação foi coberta com uma gota de óleo mineral para evitar a evaporação e centrifugado a 5000 rpm por 5 segundos. Para cada bateria de reação foi preparado um controle negativo, que consistiu de todos os componentes da reação exceto o DNA genômico, para confirmação os produtos amplificados, evitando falsos resultados de possíveis contaminações ou artefatos do “primer”.

As reações de amplificação foram processadas em termociclador PCR Express HIBAYD, por 3 ciclos de 94°C/ 1 minuto, 35°C/ 1 minuto e 72°C/ 2 minutos; 34 ciclos de 94°C/ 10 segundos, 40°C/ 20 segundos, 72°C/ 2 minutos e 1 ciclo de 72°C/ 5 minutos.

3.7 – Análise estatística

Foi montada uma matriz binária de acordo com a presença (1) ou ausência (0) de bandas reproduzíveis, obtidas pela técnica de RAPD.

A matriz gerada, pelo programa Statistica 6.0 (Figura 8) demonstra as distâncias genéticas e análise de “cluster”. Estas distâncias foram calculadas pelo método de porcentagem de desacordo (PUTERKA et al., 1993), que é dado pela equação:

$$N'_{ab}/N_t$$

onde:

N'_{ab} = número total de bandas polimórficas entre os *bulk* de genótipos comparados

N_t = número total de bandas

A análise de “clusters” foi feita pelo método (UPGMA - Unweighted pair-group method average) não ponderado de agrupamento aos pares, utilizando médias aritméticas, o qual agrupa, inicialmente, indivíduos mais similares e assim por diante, até os indivíduos ou grupos mais divergentes. (OLIVEIRA, 1998).

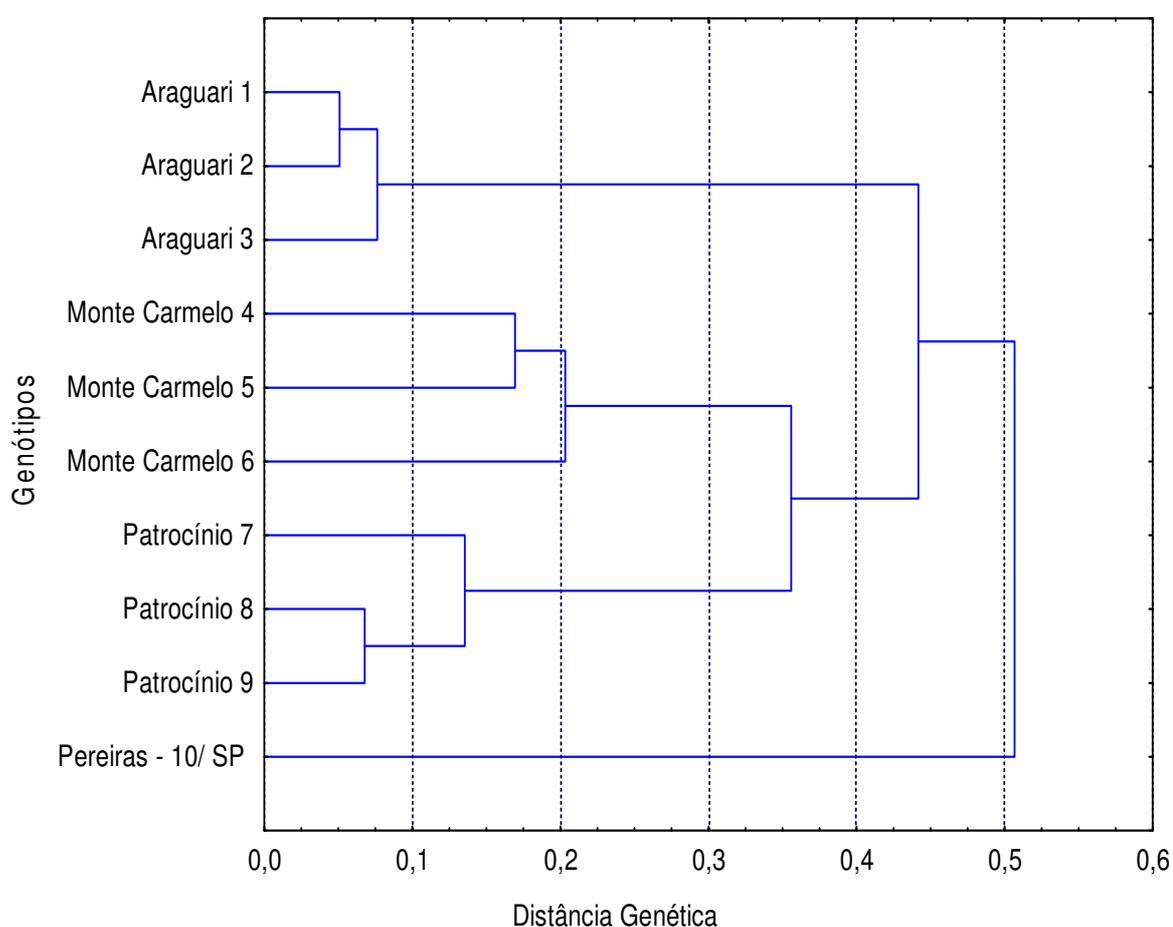


Figura 8: Dendrograma representativo da distância genética por porcentagem de desacordo e agrupado pelo método de UPMGA, de populações de *Leucoptera coffeella* em 03 (três) municípios de Minas Gerais.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A análise dos genótipos de *Leucoptera coffeella* dos municípios do Estado de Minas Gerais, mostrou variabilidade genética dentro de cada população do inseto. Conforme o dendograma (Figura 8) a maior divergência entre as populações do inseto de Monte Carmelo 6 e Monte Carmelo 4 e 5 foi entorno de 21%, e a menor divergência genética ocorreu entre as populações de Monte Carmelo e Patrocínio, com aproximadamente 36,5%.

Os municípios de Monte Carmelo e Patrocínio em Minas Gerais possuem um intercâmbio de mudas, entre viveiros e/ou produtores, o que pode ter aproximado as duas populações do inseto dos subgrupos de cada um dos municípios, na análise de divergência genética. O município de Araguari – MG não mantém com os municípios de Monte Carmelo e Patrocínio (MG) estreito intercâmbio entre viveiros e/ou produtores para comercialização de mudas, fato que pode ter promovido o isolamento genético das populações do bicho mineiro, nesse município.

Pelos questionários aplicados nos locais de coleta, detectou-se o uso exclusivo de controle químico para infestações do bicho mineiro. Dentro de cada município de Minas

Gerais é utilizado inseticida baseado no mesmo princípio ativo e entre os municípios, princípios ativos distintos. O Aldicarb, Deltamethrin e Triazophos são utilizados em Araguari (MG), o Lambdacialotrina é utilizado em Monte Carmelo (MG) e o Thiamethoxam, em Patrocínio (MG).

A rotação de diferentes princípios ativos, como no município de Araguari ou uso exclusivo de um principio ativo de inseticidas, como nos demais municípios mineiros, em altas frequências de aplicações e altas dosagens, podem ter exercido pressão seletiva diferencial nas linhagens de insetos, o que, associado ao restrito fluxo gênico entre populações do inseto dos municípios mineiros, pode explicar a divergência genética entre as amostras de cada grupo.

As populações de Araguari 3 apresentam-se geneticamente menos divergentes dentro do município. O rígido controle químico aliado à rotação de diferentes princípios ativos de inseticidas, para a produção de mudas, pode estar mantendo as linhagens de bicho mineiro e evitando a seleção de genótipos diferentes, nesse local.

As populações de *L. Coffeella* de Monte Carmelo 6 e Patrocínio 7 são de propriedades rurais que desenvolveram alto grau de tecnologia, utilizando controle químico do inseto por infestação de talhão. Essa tecnologia, possivelmente, evita a migração de insetos de outras áreas para dentro da propriedade, sendo o controle efetuado das bordas dos talhões para o centro, empregando rígido controle químico com apenas um princípio ativo, o que pode estar selecionando e conservando as linhagens de bicho mineiro mais resistentes, no local.

A amostra testemunha (*out group*) do Estado de São Paulo, do município de Pereiras, apresentou a maior divergência genética em relação às cidades mineiras,

provavelmente, devido à diferença de altitude, latitude, longitude, diferentes métodos de controle químico e restrito ou inexistente fluxo gênico com as populações mineiras do inseto.

5. CONCLUSÕES

A análise de 7 marcadores de RAPD permitiu a separação das populações de *Leucoptera coffeella* em três subgrupos, Araguari, Monte Carmelo e Patrocínio, no grupo de Minas Gerais e um *out group* pertencente à cidade de Pereiras-SP.

O município de Araguari – MG apresentou-se isolado dentro do grupo mineiro com divergência genética aproximada de 7,2%, talvez, devido à baixa pressão de seleção sobre o inseto, resultante da rotação de diferentes inseticidas e pelo restrito fluxo gênico.

Os municípios de Monte Carmelo e Patrocínio, ambos do Estado de Minas Gerais, apresentam divergência genética próxima de 36,5%. São municípios que utilizam um único princípio ativo de inseticida, o que pode estar exercendo uma pressão de seleção mais efetiva sobre as populações de *L. coffeella* do que no município de Araguari-MG.

Os resultados obtidos permitiram indicar que a rotação de grupos químicos diferentes de inseticidas, causa menor pressão de seleção no inseto praga, deixando de selecionar linhagens resistentes do inseto a um determinado princípio ativo de inseticida e, conseqüentemente, ao seu grupo químico, o que permite o uso de um princípio ativo

de inseticida por mais tempo, em consórcio com outros princípios ativos de grupos químicos diferentes.

Estudos da biologia do inseto *Leucoptera coffeella* e sua filogenia devem ser reanalisados, para elucidação e monitoramento do seu comportamento.

Marcadores RAPD constituem-se em eficientes ferramentas moleculares para estudo de populações.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGRIANUAL 2004: **Anuário estatístico da agricultura brasileira**. São Paulo: FNP, 2004. 496 p.

CANECCHIO FILHO, V. **Cultura do café**. Campinas, SP: ICEA, 1987. 84 p.

CROWE, T. J. **Coffee leaf miner in Kenya**. I. Species and life histories. Kenya Coffee, Nairobi, v. 29, n. 341, p. 83 – 173, 1964.

FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. 3.ed. Brasília: EMBRAPA-CENAGEM, 1998. 220 p.

GALLO, D.; NAKANO, O. ; NETO, S. S. et al. **Entomologia agrícola**. Piracicaba. FEALG, 2002. 920 p.

GUEDES, R. N. C. & FRAGOSO, D. B. Resistência a inseticidas: Bases gerais, situações e reflexões sobre o fenômeno em insetos praga do cafeeiro. In: ENCONTRO SOBRE PRODUÇÃO DE CAFÉ COM QUALIDADE, 1., 1999, Viçosa. **Anais...** Viçosa: UFV, 1999. p. 99 -120.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA – IBGE. **Produção agrícola municipal**. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br/cidadessat/default2.php>>. Acesso em: 15 fev. 2005.

LIMA, J. V. O. **Eficácia biológica e praticabilidade agrônômica do inseticida cypermethrin (Nor-Trin 250 CE) no controle do Bicho Mineiro do cafeeiro *Leucoptera coffeella***. 2003. 22 f. Plano de Monografia (Graduação) – Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2003.

LIMA, J. V. O.; LUCAS, M. B.; SILVA, A. J. A. et al. *Eficácia biológica e praticabilidade agrônômica do inseticida cypermethrin (Nor-Trin 250 CE) no controle do Bicho Mineiro do cafeeiro *Leucoptera coffeella**. In: VI Simpósio Brasileiro de Pesquisa em Cafeicultura Irrigada, 4., 2003, Araguari, **Anais...** Uberlândia: UFU, 2003, 60 - 64 p.

MALAVOLTA, E.; FERNANDES, D. R.; CASALE, H. et al. Arquivo do Engenheiro Agrônomo nº 03, “**Seja doutor do seu cafezal**”. Piracicaba: POTAFOS – Associação Brasileira para a Pesquisa da Potassa e do Fosfato, 1993. Disponível em: <[http://www.potafos.org/ppiweb/brazil.nsf/87cb8a98bf72572b8525693e0053ea70/d5fbc829a2f54298832569f8004695c5/\\$FILE/cafezal.pdf](http://www.potafos.org/ppiweb/brazil.nsf/87cb8a98bf72572b8525693e0053ea70/d5fbc829a2f54298832569f8004695c5/$FILE/cafezal.pdf)>. Acesso em: 22 fev. 2004.

OLIVEIRA, R. de C. **Divergência Genética por Marcadores RAPD em *Tetragonisca angustula* LATREILLE, 1811 (*Hymenoptera, Apidae, Meliponinae*)**. 1998. 50 f. Dissertação (Mestrado em Genética Molecular) – Instituto de Genética e Bioquímica, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 1998.

PRAGAS DO CAFEIEIRO: RECONHECIMENTO E CONTROLE. Direção de Jershon Morais. Viçosa: CPT, 2000. 1 vídeo cassete (65 min), VHS, Son., color.

PUTERKA, G. J.; BLACK IV, W. C.; STEINER, W. M.; BURTON, R. L. Genetic variation and phylogenetic relationships among worldwide collections of the Russian wheat aphid, *Diuraphis noxia* (Mordvilko), inferred from allozyme and RAPD-PCR markers. **Heredity**, Virginia, v. 70, p. 604 – 618, 1993

SHEPPARD, W. S.; STECK, G. J.; MACPHERON B. A. Geografic populations of the medfly may be differentiated by mitochondrial DNA variation. **Experientia**, Basel, v. 48, p. 1010 – 1013, 1992.

SOUZA, C. J.; REIS, P. R.; RIGITANO, R. L. O. **Bicho mineiro do cafeeiro**: biologia, danos e manejo integrado. Belo Horizonte: EPAMIG, 1998. 48 p.