

EVALUACIÓN DE MARCADORES FÍSICOS Y MOLECULARES COMO HERRAMIENTAS PARA EL ESTUDIO DE LA DISPERSIÓN DE *Hypothenemus hampei*

Flor E. Acevedo-Bedoya*, Zulma N. Gil-Palacio*, Alex E. Bustillo-Pardey*,
Esther C. Montoya- Restrepo**, Pablo Benavides-Machado*

RESUMEN

ACEVEDO B., F.E.; GIL P., Z.N.; BUSTILLO P., A.E.; MONTOYA R., E.C.; BENAVIDES M., P.
Evaluación de marcadores físicos y moleculares como herramientas para el estudio de la dispersión de
***Hypothenemus hampei*. Cenicafé 60 (1): 72-85. 2009.**

Para realizar estudios de dispersión de la broca del café, se evaluó el efecto del pigmento fluorescente Day-glo® sobre la mortalidad de la broca, la capacidad para emprender el vuelo y la retención sobre el cuerpo del insecto durante la penetración al fruto de café y bajo exposición simulada a la lluvia. Se diseñó el marcador molecular de ADN HhaSTS6 a partir de poblaciones de broca provenientes de Cesar y Nariño y se evaluó la presencia de éste en poblaciones de broca de la zona central cafetera y la segregación sobre una primera generación (F1). Los resultados muestran que el pigmento Day-glo® ocasionó un porcentaje de mortalidad menor al 10%, con una retención mayor al 90% en brocas que perforaron el fruto y 100% en aquellas expuestas al agua lluvia. El marcador HhaSTS6 estuvo ausente en Caldas, Quindío y Risaralda, heredándose entre 73 y 100% en la F1. Se concluye que el pigmento Day-glo® no es viable para marcar y monitorear adultos de broca en estudios de dispersión y el marcador molecular HhaSTS6 podría ser apropiado para realizar estudios de dispersión a través del tiempo en el campo.

Palabras clave: Broca del café, dispersion, pigmento fluorescente Day-glo®, marcador molecular HhaSTS6,

ABSTRACT

In order to conduct studies about coffee berry borer dispersion, the effect of the fluorescent pigment Day-glo® on the mortality of this insect, its capacity to fly, the retention on its body during the boring of coffee beans and under simulated rain exposure were evaluated. The DNA molecular marker *HhaSTS6* was designed from coffee berry borer populations from Cesar and Nariño, and its presence in *H. hampei* populations of the coffee growing central zone as well as the segregation on a first generation (F1) were evaluated. The results show that the Day-glo® pigment caused a mortality rate of less than 10%, with retention of more than 90% in insects that bored coffee beans and 100% in those exposed to rain. The marker *HhaSTS6* was absent in Caldas, Quindío and Risaralda inheriting between 73% and 100% in the F1 progeny. It is concluded that the pigment Day-glo® is not viable to mark and trace coffee berry borer adults in dispersal studies and that the molecular marker *HhaSTS6* could be appropriate to carry out dispersal studies through time in field conditions.

Keywords: Coffee berry borer, dispersion, fluorescent Day-glo® pigment, *HhaSTS6* molecular marker.

* Investigador Asociado, Asistente de Investigación, Investigador Principal e Investigador Científico II, respectivamente. Entomología. Centro Nacional de Investigaciones de Café, Cenicafé. Chinchiná, Caldas, Colombia.

** Investigador Científico III. Biometría. Centro Nacional de Investigaciones de Café, Cenicafé. Chinchiná, Caldas, Colombia.

La broca del café, *Hypothenemus hampei* (Ferrari) (Coleoptera: Curculionidae: Scolytinae), al ser una especie exótica introducida a zonas con condiciones favorables, desarrolló todo su potencial biótico en Colombia sin ninguna restricción, alcanzando altos niveles poblacionales y diseminándose con facilidad hasta llegar a convertirse en la plaga de mayor importancia económica para los caficultores. Al comportarse como barrenador de las almendras, cumplir todo el ciclo de vida dentro de ellas, tener una alta tasa reproductiva y presentar varias generaciones al año, ha sido difícil controlarla; razón por la cual las investigaciones desarrolladas en Cenicafé, se han orientado a generar conocimiento que permita diseñar un plan de manejo, integrando diversas técnicas de control que disminuyan la infestación a niveles económicamente aceptables por los productores del grano (8).

Para la implementación de un programa de manejo integrado es indispensable el conocimiento de aspectos biológicos y ecológicos del insecto, como el ciclo de vida, hábitos, comportamiento reproductivo, dinámica poblacional y la relación de éstos con los diferentes componentes climáticos y los patrones de dispersión, entre otros (8). De esta manera, estudios tendientes a determinar los mecanismos y patrones de dispersión de este insecto permitirán desarrollar y fortalecer técnicas de control, optimizar las estrategias de manejo dentro de un marco integral, tales como la aplicación de insecticidas, la liberación de parasitoides, la recolección de frutos antes del zoqueo y la eliminación de focos abandonados, entre otras. Además, con este conocimiento se podrá conocer la velocidad de dispersión de genes de resistencia a pesticidas y obtener modelos más precisos para realizar predicciones reales de la presión de la plaga sobre los cultivos de café.

La capacidad de dispersión de la broca no ha sido evaluada, pero existen reportes de estudios que involucran parámetros de dispersión. La broca no vuela bien y el modo de transporte más común es sobre la ropa y el equipo de trabajadores en plantaciones infestadas (6); sin embargo, existe una proporción de adultos que vuela y se dispersa, lo que dificulta el control del insecto (8). El vuelo inicial de las hembras es ascendente hasta encontrar corrientes de aire que las desplazan a otros sitios (2, 5), distanciados hasta 500 m (22), lo que se constituye en una evidencia de que la broca emigra y causa infestación severa en lotes circundantes (22, 10), en donde se disponen de manera agregada (2, 22). Es así como la broca es un insecto que tiene capacidad de vuelo, y desde el punto de vista evolutivo necesita de esta capacidad para encontrar nuevos frutos aptos para su alimentación y oviposición (2, 5). Esta dispersión de poblaciones es afectada directamente por factores bióticos y abióticos, entre estos últimos, los más limitantes son la humedad y la temperatura, que afectan la fisiología de su hospedero y los procesos metabólicos y los mecanismos endógenos sensoriales del insecto (2, 4, 5, 9).

Diferentes métodos son actualmente utilizados para cuantificar la dispersión de poblaciones de insectos, entre ellos se encuentran los que involucran la marcación de las poblaciones, la liberación en el campo y posterior captura de los especímenes utilizando trampas atrayentes (21, 23). El marcador a emplear no debe afectar la población, debe ser seguro al medio ambiente, de fácil identificación y aplicación, durable para el experimento y de bajo costo (16, 21). La selección del marcador depende del insecto, del medio ambiente en que éste se encuentre y de la naturaleza del experimento. Usualmente, los grupos de insectos pueden ser marcados

por medio de tintas, polvos (16, 20, 23) o empleando marcadores moleculares (17).

Dentro de los marcadores físicos, el pigmento fluorescente más usado es Day-glo® Color Corp. (Cleveland, Ohio), que es un colorante orgánico en forma de polvo, insoluble en agua, no volátil, con una densidad de 1,36 g.cm⁻³ y un tamaño medio de las partículas (75 micras), que se adhieren fácilmente al cuerpo de los insectos. Es poco visible ante la luz normal pero se detecta fácilmente bajo luz ultravioleta o luz negra fluorescente (16).

En investigaciones realizadas con el pigmento Day-glo® sobre diferentes insectos, se encontró que la marcación con este pigmento no tuvo efecto adverso sobre la emergencia, la capacidad de vuelo y la percepción semioquímica, lo que demuestra que es efectivo para monitorear el vuelo de diferentes especies de insectos (11, 12, 14, 18). Sin embargo, al incrementarse el grado de marcación se puede incrementar la mortalidad y disminuir la longevidad de los especímenes (11).

Los estudios tradicionales realizados con marcadores físicos como polvos o tintas, sólo permiten el monitoreo de especies por una generación o parte de ella, y su utilización se dificulta en especies muy pequeñas. Una alternativa en estos casos ha sido el desarrollo de marcadores moleculares para monitorear su dispersión, con las ventajas de poder ser utilizados en especies microscópicas e incluso gametos, y poder ser evaluados por varias generaciones. Evaluaciones de la dispersión, directamente con marcadores moleculares son posibles si se encuentran o introducen alelos únicos, ausentes en la población natural de insectos donde serían liberados; los marcadores presentes en estas poblaciones o los sistemas artificiales de cría de estos insectos no deben perjudicar

o modificar la capacidad de dispersión de los individuos liberados en la población natural. Sin embargo, las dinámicas de los alelos introducidos pueden ser influenciados por una selección natural, actuando sobre los marcadores moleculares en sí, más que por la dispersión o flujo génico que usualmente son el principal interés en esta clase de estudios. Finalmente, debe existir la manera de monitorear movimientos de larga distancia de los individuos (3).

A pesar de las dificultades asociadas con los estudios de dispersión, la combinación de estudios ecológicos con los nuevos enfoques moleculares han proporcionado una mejor comprensión de los patrones de dispersión en invertebrados (7). La genética de poblaciones proporciona métodos indirectos para estudiar la dispersión, así, niveles del flujo de genes entre poblaciones pueden ser inferidos de la caracterización genética de individuos, usando marcadores moleculares como aloenzimas (13), ADN mitocondrial (13, 24), ADN polimórfico amplificado al azar y microsatélites (15), entre otros. Altos niveles de dispersión resultarán en alelos compartidos y poca subdivisión entre poblaciones, mientras que bajos niveles de dispersión en divergencia genética entre poblaciones, como resultado de deriva o selección. Sin embargo, la aparente similaridad genética de poblaciones puede depender de la tasa de mutación relativa y del modo de herencia del marcador molecular que ha sido empleado. Diferentes regiones del genoma evolucionan a una tasa diferente que puede influenciar la interpretación de patrones de dispersión (3).

Las características de comportamiento y hábitos de la broca del café hacen difícil encontrar un marcador con el cual se puedan realizar estudios de dispersión, por lo cual se planteó esta investigación con el objetivo de evaluar marcadores físicos y moleculares en la broca del café que permitiera posteriormente

evaluar la dispersión de este insecto en condiciones naturales.

MATERIALES Y MÉTODOS

Actividad I. Evaluación de la efectividad del pigmento fluorescente Day-glo® para marcar adultos de broca.

Esta actividad se dividió en una fase de laboratorio y otra de campo, con el fin de asegurar el éxito en la obtención de un marcador físico apropiado para realizar estudios de dispersión en el campo.

Evaluación de los pigmentos fluorescentes en condiciones controladas. En el laboratorio de Entomología de Cenicafé, ubicado en Chinchiná (Caldas), con una humedad relativa de 70% y una temperatura de 24°C, se determinó si el pigmento Day-glo® ocasionaba mortalidad en adultos de broca, si afectaba la capacidad del insecto para emprender el vuelo y si era retenido sobre el cuerpo del insecto durante la penetración al fruto de café, sobre adultos sumergidos en agua con jabón y en aquellos expuestos al agua lluvia. Estas variables fueron evaluadas con tres niveles de marcación, los cuales constituyeron los siguientes tratamientos:

T1. Adultos de broca cubiertos con el pigmento en más del 70% de su cuerpo (severamente marcados).

T2. Adultos de broca cubiertos con el pigmento entre el 25 - 50% de su cuerpo (parcialmente marcados).

T3. Adultos de broca sin marcar (testigo).

Los insectos se marcaron con el pigmento Day-glo® rojo fuego (serie AX -14), el cual se aplicó con una jeringa de 5 mL sobre grupos de 100 individuos puestos en vasos desechables de 200 mL, a una altura de 8 cm, para lograr un cubrimiento sobre

el cuerpo del insecto mayor al 70%; y a una altura de 15 cm para un cubrimiento del 25 al 50%. La detección del marcador se efectuó mediante la observación de los insectos en el estereo-microscopio bajo luz negra fluorescente.

Para la evaluación de cada uno de los parámetros se emplearon unidades experimentales compuestas por 100 adultos de broca.

Mortalidad: se utilizaron 15 unidades experimentales por tratamiento, seleccionadas aleatoriamente. Las unidades experimentales se dispusieron en cajas Petri con papel filtro humedecido. El registro del porcentaje de brocas muertas se realizó después de 3, 5 y 8 días de instalado el experimento, extrayendo aleatoriamente cinco unidades experimentales en cada tiempo de evaluación.

Capacidad de emprender el vuelo: se emplearon cinco unidades experimentales por tratamiento. Cada unidad se depositó en uno de los extremos de una caja de malla de 1 m de largo x 0,5 m de alto (Figura 1), en el otro extremo se ubicó una trampa para broca con un atrayente a base de alcoholes (metanol:etanol, en relación 3:1), para registrar durante cinco días el número de individuos capturados en la trampa.

Retención del marcador durante la penetración al fruto: se evaluaron 15 unidades experimentales por tratamiento, sin incluir el testigo; éstas se depositaron de manera individual en una caja plástica que contenía 100 frutos de café cereza, de 22 a 30 semanas de desarrollo. Las evaluaciones se realizaron a los 3, 5 y 8 días, disecando los frutos infestados de cinco unidades experimentales tomadas aleatoriamente, para contar el número de brocas marcadas.

Retención del marcador en agua con jabón: se utilizaron 15 unidades experimentales por tratamiento, sin incluir el testigo; cada unidad se depositó en una solución de agua con jabón al 0,1%, preparada en vasos desechables, para registrar el número de brocas que conservaron el marcador durante 3, 5 y 8 días, se seleccionaron aleatoriamente 5 unidades experimentales en cada fecha de evaluación.

Retención del marcador bajo exposición al agua lluvia: cinco unidades experimentales por tratamiento (excepto el testigo), se colocaron durante 10 min. en un simulador de lluvia con una intensidad de $110 \text{ mm}\cdot\text{h}^{-1}$, para registrar posteriormente el número de adultos de broca marcados mediante observación bajo luz negra fluorescente.

Las variables de respuesta fueron: porcentaje de mortalidad de adultos de broca, porcentaje de adultos de broca que emprendieron el vuelo, porcentaje de adultos de broca que retuvieron el marcador durante la penetración al fruto, porcentaje de adultos de broca que retuvieron el marcador en agua con jabón y porcentaje de adultos de broca que retuvieron el marcador bajo exposición al agua lluvia.

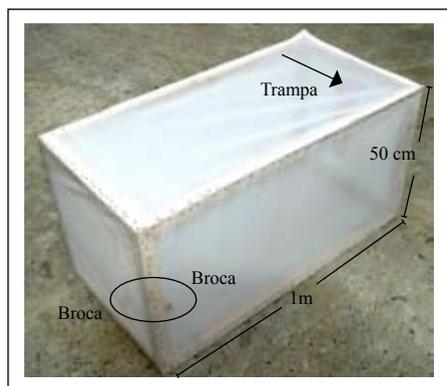


Figura 1. Caja de malla para evaluar la capacidad de la broca para emprender el vuelo en el laboratorio.

La información se analizó estimando los promedios y la variación por tratamiento para cada una de las variables de respuesta. Se realizaron análisis de varianza para el diseño completamente aleatorio y pruebas de comparación de promedios de Tukey al 5%, cuando hubo efecto de los tratamientos.

Evaluación de los pigmentos fluorescentes en condiciones no controladas.

En la Estación Central Naranjal de Cenicafé, ubicada en Chinchiná (Caldas), a una altitud de 1.400 m, con una temperatura media de $21,6^{\circ}\text{C}$, 74,8% de humedad relativa y precipitación anual de 2.322 mm; y en la finca La Romelia, ubicada en Chinchiná (Caldas), a una altitud de 1.335 m, con una temperatura media de $20,6^{\circ}\text{C}$, 77% de humedad relativa y precipitación anual de 2.520 mm, se verificaron en el campo los resultados obtenidos en las evaluaciones de laboratorio, para lo cual se seleccionó el tratamiento en el cual los adultos de broca presentaron un porcentaje de mortalidad y capacidad de emprender el vuelo igual al del testigo y un valor de retención del marcador mayor al 90%. Esta verificación se realizó de la siguiente manera:

Para evaluar el número de adultos de broca que retuvieron el marcador durante la penetración al fruto, se seleccionaron 15 ramas de café con 50 frutos de más de 150 días de desarrollo, que no estuvieran infestados por broca. En cada rama (unidad experimental) se instaló una manga entomológica y ésta se infestó artificialmente con 100 brocas marcadas, de acuerdo con el mejor tratamiento de la evaluación en el laboratorio. A los 3, 5 y 8 días después de la infestación, se seleccionaron aleatoriamente cinco ramas, se desprendieron los frutos infestados, los cuales fueron disecados para contar el número de brocas con presencia del marcador, mediante observación de los insectos bajo luz negra fluorescente; con esta información se obtuvo

el porcentaje de brocas que retuvieron el marcador durante la penetración al fruto.

Adicionalmente, en un potrero de la finca La Romelia, se determinó el número de adultos de broca que emprendieron el vuelo, liberando grupos de 1.000 brocas en los cuatro puntos cardinales (N, S, E, O), a una distancia de 5 m, alrededor de una trampa para broca Brocatrap® situada a una altura de 1,5 m desde el suelo. La lectura del número de adultos capturados en la trampa se realizó diariamente, durante cinco días, después de la liberación de los insectos.

La información se analizó estimando los promedios e intervalos de confianza para el porcentaje de adultos de broca que retuvieron el marcador durante la penetración al fruto, con un coeficiente de confianza del 95%; los promedios obtenidos en el laboratorio y en el campo, en cada fecha de evaluación, se compararon mediante una prueba *t* al 5%. Para la evaluación del porcentaje de brocas que emprendieron el vuelo en el campo, sólo se registraron los promedios de los tratamientos, ya que al utilizarse una metodología diferente no fue posible comparar estos resultados con los obtenidos en el laboratorio.

Actividad II. Diseño de un marcador molecular para estudiar la dispersión de la broca en el campo.

En esta actividad se diseñó un marcador molecular dominante STS (*Site Tagged Sequence*) mediante la técnica AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*); posteriormente, y con el fin de conocer la posibilidad de utilizarlo en la zona cafetera central, se evaluó la presencia de este marcador en las Estaciones Experimentales de Cenicafé ubicadas en el eje cafetero, así como la segregación del mismo sobre una población F1.

Diseño de un marcador molecular dominante STS a partir de polimorfismos AFLP. Se emplearon siete muestras de ADN de brocas provenientes de los departamentos de Caldas, Cesar, Quindío, Nariño, Norte de Santander, Risaralda y Valle, y se generaron perfiles AFLP utilizando el kit *AFLP Analysis System II for small genomes* (GIBCO Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA), con nueve combinaciones de *primers* selectivos (Tabla 1), previamente seleccionados por su capacidad de amplificar polimorfismos en broca (5).

Para el diseño del marcador STS se aislaron las bandas polimórficas de los geles de acrilamida, se reamplificaron mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), se clonaron utilizando la técnica pGEM®-T *Easy vector System I* (Promega, Madison, WI) y se enviaron a secuenciar en los laboratorios Macrogen (Corea). Posteriormente y a partir de la secuencia nucleotídica del polimorfismo, se diseñaron nuevos *primers* para la amplificación del marcador sobre preamplificados de AFLP y ADN genómico.

Evaluación de la presencia del marcador molecular en las Estaciones Experimentales de Cenicafé en el eje cafetero. Para confirmar la ausencia del marcador molecular en las Estaciones Experimentales de Cenicafé y utilizarlo en estudios de dispersión en esta zona, se realizó un muestreo de broca en la Estación Central Naranjal (Chinchiná, Caldas), en la Subestación Experimental La Catalina (Pereira, Risaralda) y en la Subestación Experimental Paraguaicito (Buenavista, Quindío). En cada Subestación se dividió el área de café en producción en diez sectores, en cada uno se recolectaron 200 frutos brocados, recorriendo los lotes en zigzag, estos frutos se disecaron en el laboratorio extrayendo los adultos presentes en cada uno de ellos. A estos adultos, se les extrajo el ADN por grupos de máximo 50 individuos

Tabla 1. Combinaciones de *primers* selectivos empleados para generar perfiles AFLP.

<i>Primer E*</i>	AC	AG	TA	TT
	CAA CAC	CTG CTT	CAG	CAA
<i>Primer M*</i>	CTA CTG CTT			

* *Primers* incluidos en el Kit AFLP Analysis System II (Invitrogen).

en 500 μ L del buffer STE, siguiendo la metodología para la extracción de ADN reportada por Acevedo *et al.* (1), para luego identificar la presencia del marcador mediante reacciones de PCR.

Las reacciones de PCR se realizaron en un volumen de 12,5 μ L, conteniendo 1,5 μ L de ADN (20ng), 0,5 μ M de cada *primer*, 0,2 mM de dNTPs, 1X de 10X PCR *buffer*, 1,5 mM de MgCl₂, 0,3 U de *Taq polimerasa* (Promega) y 6.675 μ L de agua microfiltrada. Después de la desnaturalización inicial a 95°C por 5 min., los ciclos de desnaturalización, anillamiento y extensión, fueron de 94°C por 30 s, 50°C por 30 s y 72°C por 60 s, en 35 ciclos completos, con una extensión adicional de 10 min. a 72°C.

Evaluación de la segregación de un marcador molecular sobre una generación F1. Con el fin de confirmar la segregación en la progenie del marcador dominante diseñado, se realizaron crías individuales a partir de 12 hembras (provenientes de una población en donde se amplificó previamente el marcador), en viales con café pergamino húmedo (45%). Transcurridos 25 días después de la infestación se retiraron las hembras madres de cada una de las crías y se les extrajo el ADN de manera individual, para identificar la presencia del marcador mediante PCR. Después de 15 días se extrajo el ADN de cada uno de los estados fisiológicos (excepto huevos), de tres poblaciones positivas, en donde la hembra madre amplificó el marcador, para

cuantificar de manera porcentual la presencia del mismo en la descendencia.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Actividad I. Evaluación de la efectividad de pigmentos fluorescentes para marcar adultos de broca.

En el laboratorio se obtuvo un porcentaje de mortalidad de adultos de broca menor al 10%, para todos los tratamientos en todas las lecturas (Tabla 2), y el análisis de varianza no mostró diferencias estadísticas significativas entre ellos ($P < 0,05$), lo que indica que el pigmento Day-glo[®] no causó mortalidad a las brocas evaluadas en este estudio.

Para la variable porcentaje de brocas que emprendieron el vuelo, los tratamientos evaluados fueron estadísticamente iguales al testigo según análisis de varianza ($P < 0,05$), lo que demuestra que el pigmento Day-glo[®] no dificultó el vuelo de la broca.

Al evaluar la retención del pigmento sobre el cuerpo del insecto después de la penetración al fruto, no se encontró efecto significativo de los tratamientos en las lecturas realizadas a los 3 y 5 días después de instalado el experimento, mientras que para la lectura del día ocho el análisis de varianza mostró efecto de los tratamientos ($P < 0,05$), por lo cual se realizó una prueba de comparación de promedios de Tukey al 5%,

Tabla 2. Porcentaje de mortalidad de adultos de broca marcados con el pigmento Day-glo®.

Tratamiento	Día de evaluación	% Promedio de mortalidad	C.V.
T1. Brocas con más del 70% de cubrimiento con el pigmento Day-glo® (Severamente marcadas)	3	6,0	40,82
	5	5,2	16,08
	8	4,6	45,07
T2. Brocas con 25-50% de cubrimiento con el pigmento Day-glo® (Parcialmente marcadas)	3	5,6	48,24
	5	4,4	63,47
	8	4,6	36,37
T3. Brocas sin marcar (Testigo)	3	5,0	61,64
	5	3,6	66,89
	8	3,0	23,57

Tabla 3. Porcentaje de adultos de broca que retuvieron el pigmento Day-glo® después de la penetración al fruto.

Tratamiento	Día de evaluación	Promedio	C.V.
T1. Brocas con más del 70% de cubrimiento con el pigmento Day-glo® (Severamente marcadas)	3	100	0
	5	100	0
	8	99,8 A*	0,53
T2. Brocas con 25-50% de cubrimiento con el pigmento Day-glo® (Parcialmente marcadas)	3	100	0
	5	98,4	1,81
	8	95,6 B*	2,95

*Promedios identificados con letras distintas indican diferencias significativas entre tratamientos (Tukey 5%).

con diferencias a favor del tratamiento T1 (brocas severamente marcadas), demostrando que la retención es mayor al incrementar el porcentaje de marcación (Tabla 3). El porcentaje de retención del pigmento fue mayor al 90% para todos los tratamientos en todas las lecturas, este valor se considera alto si se tiene en cuenta que el insecto es un barrenador.

Cuando los adultos de broca marcados con el pigmento fueron expuestos al agua

lluvia y sumergidos en agua con jabón, se obtuvo un porcentaje de retención del 100%, lo que indica que el pigmento no se desprende fácilmente y puede utilizarse en el campo para marcar y monitorear poblaciones de broca, incluso usando trampas atrayentes que contienen recipientes de captura con agua y jabón.

Los adultos de broca marcados de acuerdo con los tratamientos T1 (brocas severamente marcadas) y T2 (brocas parcialmente

marcadas), presentaron un porcentaje de mortalidad y capacidad de emprender el vuelo estadísticamente igual al testigo (brocas no marcadas) y un porcentaje de retención del pigmento mayor al 90%. Sin embargo, para realizar la verificación de los resultados en el campo, se seleccionó el tratamiento T2 por ser más económico al requerir menor cantidad del pigmento.

No hubo diferencias significativas entre los datos obtenidos en el laboratorio y el campo para el porcentaje de adultos de broca que retuvieron el marcador durante la penetración al fruto, según la prueba t al 5% (Tabla 4); lo cual indica que parte del pigmento permaneció sobre el cuerpo del insecto mientras éste perforaba los frutos de café en condiciones naturales.

El porcentaje de adultos de broca que emprendieron el vuelo fue menor al 6% en el campo, mientras que en el laboratorio estuvo cercano al 45% (Tabla 5). No obstante, el

promedio del porcentaje de los adultos de broca que emprendieron el vuelo tanto en el laboratorio como en el campo fue igual al del testigo, lo cual implica que el pigmento no inhibe la capacidad de vuelo de la broca. La diferencia entre los resultados obtenidos en el laboratorio y el campo, pudo deberse a que no se empleó la misma metodología en ambas condiciones y a la influencia de los factores climáticos sobre el comportamiento de la broca, registrados por Cárdenas (9) y Alonzo (2), en los cuales las altas temperaturas y humedad relativa favorecen el vuelo del insecto, mientras que ambientes secos con un alto brillo solar inducen al insecto a permanecer en su refugio.

De acuerdo con los resultados obtenidos en el laboratorio y el campo, el marcado con pigmentos fluorescentes no mostró efecto sobre la mortalidad y la capacidad de la broca para emprender el vuelo y tuvo una alta retención sobre el cuerpo de los insectos; estos resultados confirman lo registrado por

Tabla 4. Promedios e intervalos de confianza para el porcentaje de adultos de broca que retuvieron el marcador durante la penetración al fruto, en el laboratorio y el campo.

Día de evaluación	Ambiente	Promedio	Límite inferior	Límite superior
5	Laboratorio	98,4	96,7	100
	Campo	99,2	98,52	99,89
8	Laboratorio	95,6	92,9	98,29
	Campo	85,61	93,9	100

Tabla 5. Promedios para el porcentaje de adultos de broca que emprendieron el vuelo en el laboratorio y el campo.

Tratamiento	Ambiente	Promedio
T2. Brocas con 25-50% de cubrimiento con el pigmento Day-glo® (Parcialmente marcadas)	Laboratorio	45,2
	Campo	5,29
T3. Brocas sin marcar (Testigo)	Laboratorio	42
	Campo	3,52

Polivka (19), Cook y Hain (11), Foot (14) y Poland *et al.* (18), los cuales concluyeron en estudios realizados sobre insectos del orden Coleoptera, que los pigmentos fluorescentes Day-glo® no interfirieron con la supervivencia ni el comportamiento normal de los insectos, lo que se constituye en un medio sencillo para estudiar su dispersión.

Además, el pigmento Day-glo® es económico y de fácil aplicación, lo cual lo hace viable para monitorear el vuelo de la broca a cortas distancias y por períodos de tiempo no mayores a cinco días, ya que después de este tiempo presentó dificultades para detectarse en adultos que perforaron el fruto.

Actividad II. Diseño de un marcador molecular para estudiar la dispersión de la broca en el campo.

Los perfiles AFLP permitieron identificar una banda polimórfica de 241 pares de bases (pb) presente en poblaciones de broca de Cesar y Nariño y ausente en Valle, Norte de Santander, Caldas, Quindío y Risaralda, usando la combinación de *primers* AC/CTT (Figura 2).

La secuencia nucleótida fue la siguiente:

```

5' TAACTTGAAA GAGTGCCTTG
TAATCGTCCC ATCTTCGCAA
GGCAGTCAGA TCAAAGCGAT
CACCGAGTTT TCTGCTTCTG
CGGGCAATCA AACCAATACC
AAGCGCCAGA GTGAGATAGT
CGGAACACAA GGCAGCCCAT
GCAACACCAT TGCTACGTAG
CCCCATCCCC AGTACAAACA
CCAACAGCAA GAATACATTG
ATGCTATTGC TTACCAGCAT
GACAAATAAG GTGGCACGTG A-3'

```

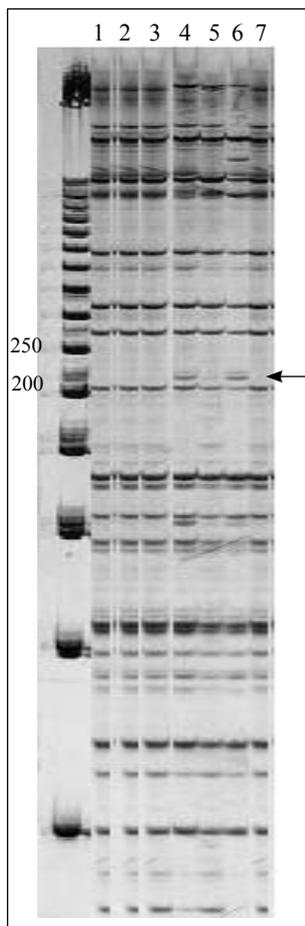


Figura 2. Polimorfismo AFLP (→) en poblaciones colombianas de *H. hampei*: 1. Caldas, 2. Norte de Santander, 3. Valle, 4. Nariño, 5. Risaralda, 6. Cesar, 7. Quindío.

Sobre la secuencia de nucleótidos de este marcador STS, denominado *HhaSTS6*, se diseñaron los *primers forward* 5' TAACTTGAAAGAGTGCC-3' y *reverse* 5' TCACGTGCCACCTTATTG-3' y se realizó la amplificación sobre los productos pre-amplificados de AFLP y sobre ADN genómico de diferentes poblaciones de broca. La Figura 3 muestra que el marcador amplificó en los preamplificados de todas

las poblaciones analizadas, mientras que en reacciones sobre ADN genómico sólo amplificó en Nariño y Cesar (Figura 4).

A partir de 11 hembras de la localidad del Cesar CE5-11 (en donde amplificó el marcador *HhaSTS6*), se identificó la presencia de éste en tres de ellas (CE 5-11.3, CE 5-11.4 y CE 5-11.7). Al evaluar la presencia del mismo sobre estas tres poblaciones, se encontró que el marcador *HhaSTS6* segregaba en mínimo un 73% de la progeie F1 (Tabla 6).

El marcador *HhaSTS6*, no se encontró presente en las poblaciones de broca de las

estaciones experimentales de Cenicafé, por lo cual es potencialmente útil para ser usado en estudios de dispersión, si se comprueba que la fecundidad y la agresividad de las poblaciones de broca que lo contienen no difieren estadísticamente de las poblaciones presentes en esta zona. De esta manera podrían realizarse liberaciones de individuos conteniendo el marcador para su posterior seguimiento en diferentes intervalos de tiempo, a diferentes distancias, a partir de un punto de liberación, según muestreo sistemático.

El uso de marcadores moleculares en estudios de dispersión de la broca del café permitiría realizar una evaluación más

Figura 3.
Amplificación del marcador *HhaSTS6* sobre producto preamplificado de diferentes poblaciones de broca de Colombia. CA, Caldas; RA, Risaralda; QU, Quindío; CE, Cesar; NA, Nariño; VA, Valle. NS, Norte de Santander.

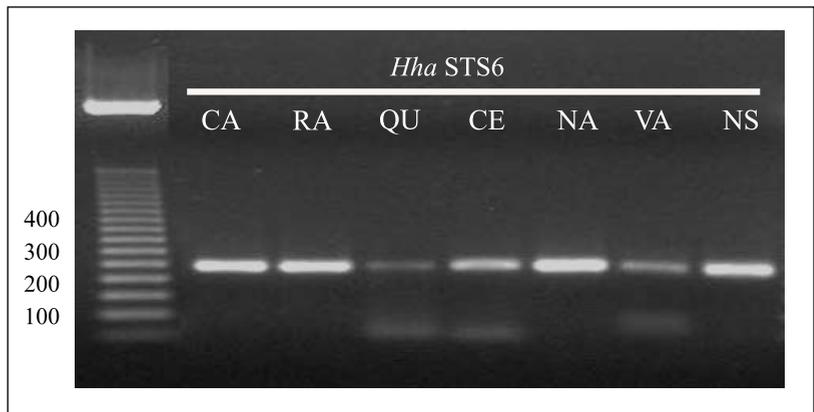


Figura 4.
Amplificación del marcador *HhaSTS6* sobre ADN genómico de hembras individuales de diferentes poblaciones colombianas de broca. C+ y C- son los controles positivo y negativo, respectivamente.



Tabla 6. Presencia del marcador *HhaSTS6* sobre poblaciones F1.

Población	N	Hembras	Machos	Pupas	Larvas	Amplificación	% Amplificación
CE5-11-3	27	14	1	0	12	27	100
CE5-11-4	22	15	1	3	3	16	72,7
CE5-11-7	26	13	2	0	11	20	76,9

confiable del movimiento de las poblaciones a través del tiempo por varias generaciones del insecto, lo cual no podría realizarse marcando los individuos con el pigmento Day-glo®, debido a que éste se desprende en el proceso de penetración al fruto, reteniéndose por cortos períodos de tiempo (no mayores de cinco días).

De este estudio se puede concluir que el pigmento fluorescente Day-glo® a pesar de no haber tenido efecto negativo sobre la supervivencia ni el movimiento de la broca del café, presentar una alta retención sobre el cuerpo del insecto, ser económico y de fácil aplicación, no es un marcador ideal para realizar estudios de dispersión en la broca del café, debido a que los insectos marcados con este pigmento sólo pueden monitorearse por espacios de tiempo muy cortos, no mayores a cinco días; además, debido al tamaño de la broca y a su hábito como barrenador, la detección se dificulta ya que debe hacerse bajo luz negra fluorescente, con ayuda de un estereoscopio en condiciones de oscuridad.

El marcador molecular *HhaSTS6* está presente en poblaciones de broca de las regiones del Cesar y Nariño, y ausente en

las Subestaciones Experimentales de Cenicafé ubicadas en el eje cafetero. Además, este marcador presenta un alto porcentaje de segregación en la progenie, y se considera de utilidad en estudios de dispersión de la broca del café a través del tiempo, por varias generaciones del insecto, siempre y cuando se compruebe que la fecundidad y agresividad de las poblaciones de broca que lo contienen, no difieren de las presentes en la zona donde se vaya realizar el estudio.

AGRADECIMIENTOS

Al Centro Nacional de Investigaciones de Café, Cenicafé, por la financiación del proyecto; al profesor Alberto Soto de la Universidad de Caldas; a Lucio Navarro, Fredy Betancur y Miguel Constantino por su asesoría; a los auxiliares Arturo Gómez y Jhon Jairo García y a todos aquellos que contribuyeron con el desarrollo de estudio.

LITERATURA CITADA

1. ACEVEDO B. F.E.; NAVARRO E., L.; CONSTANTINO C., L. M.; GIL P., Z.; BENAVIDES M., P. Método rápido y económico para la extracción de ADN genómico en la broca del café y su uso en PCR. *Cenicafé* 58(2):134-141. 2007.

2. ALONZO P., F. R. Aspectos ecológicos de la broca *Hypothenemus hampei* (Coleoptera: Scolytidae). El problema de la broca (*Hypothenemus hampei*, Ferrari) (Coleoptera: Scolytidae) y la caficultura. Aspectos relacionados con importancia, daño, identificación, biología, ecología y control. Instituto Interamericano de cooperación para la agricultura. San José (Costa Rica). 77-136.1984.
3. AVISE, J. C. Molecular Markers Natural History and Evolution (USA: Chapman and Hall) second edition 2004.
4. BAKER, P. S. Some aspects of the Behavior of the coffee berry borer in relation to its control in Southern México (Coleoptera: Scolytidae). Folia Entomológica Mexicana 61: 9-24. 1984.
5. BAKER, P. S. La bioecología de la broca del café, *Hypothenemus hampei*: Memorias del seminario sobre la broca del café. Sociedad Colombiana de Entomología. Medellín, 1991. 118p.
6. BENAVIDES, P.; VEGA, F.; ROMERO S., J.; BUSTILLO P., A.; STUART, J. Biodiversity and biogeography of an important inbred pest of coffee, the coffee berry borer, *Hypothenemus hampei* (Ferrari) (Coleoptera: Curculionidae: Scolytinae). Annals of the Entomological Society of America 98(3):359-366. 2005.
7. BILTON, D.T.; FREELAND, J. R.; OKAMURA, B. Dispersal in Freshwater Invertebrates. Annual Review of Ecology and Systematics 32:159-81. 2001.
8. BUSTILLO, P. El manejo de cafetales y su relación con el control de la broca del café en Colombia. Chinchiná, CENICAFE, 2002. 40p (Boletín Técnico No. 24).
9. CÁRDENAS, M. R. Biología, hábitos y control cultural de la broca del café (*Hypothenemus hampei*, Ferrari) (Coleoptera: Scolytidae). Memorias del XX congreso de la Sociedad Colombiana de Entomología. Cali, 1993 344p.
10. CASTAÑO S., A.; BENAVIDES M., P.; BAKER, P. Dispersión de *Hypothenemus hampei* en cafetales zoqueados. Cenicafé 56(2):142-150. 2005.
11. COOK, S. P.; HAIN, F. The influence of self-marking with fluorescent powders on adult bark beetles (Coleoptera: Scolytidae). Journal of Entomological Science 27(3):269-279. 1992.
12. CORBETT, A.; ROSENHEIM, J. Quantifying movement of a minute parasitoid, *Anagrus epos* (Hymenoptera: Mymaridae), using fluorescent dust marking and recapture. Biological control (6):35-44. 1996
13. CREASE, T.J.; LEES, K.; YUS, I.; SPITZEK.; LEHMAN N.; LYNCH M. Allozyme and mtDNA variation in populations of the *Daphnia pulex* complex from both sides of the Rocky mountains. Heredity 79:242-51. 1997.
14. FOOT, W. H. Use of fluorescent powders to monitor flight activities of adult *Glischrochilus quadrisignatus* (Coleoptera: Nitidulidae). The Canadian Entomologist 108(10):1041-1044. 1976
15. FREELAND J.R.; NOBLE L.R.; OKAMURA, B. Genetic diversity of North American populations of *Cristatella mucedo*, inferred from microsatellite and mitochondrial DNA. Molecular Ecology 9:1375-89. 2000.
16. HAGLER, J.; JACKSON, G.; Methods for marking insects: Current techniques and future prospects. Annual Review of Entomology. Vol. 46: 511-543. 2001.
17. LOXDALE, H. D.; LUSHAI, G. Molecular markers in entomology. Bulletin of Entomological Research 88(6):557-600. 1998.
18. POLAND, T. N.; HAACK, R. A.; PETRICE, T. R. Dispersal of *Tomicus piniperda* (Coleoptera: Scolytidae) from operational and simulated mill yards. The Canadian Entomologist 132(6):853-866. 2000.
19. POLIVKA, J. B. The use of fluorescent pigments in a study of the flight of Japanese beetle. Journal of Economic Entomology 42(5):818-821. 1949.
20. REYNOLDS, D. R., RILEY, J. R. Remote sensing, telemetric and computer based technologies for investigating insect movement: a survey of existing and potential techniques. Computers and electronics in agriculture 35(2-3):371-307. 2002.
21. REYNOLDS, D. R.; RILEY, J. R.; ARMES, N. J.; COOTER, R.J. TUCKER, M.R.; COLVIN, J. Techniques for Quantifying Insect Migration. Methods in Ecological and Agricultural Entomology. CAB International. Wallingford (Inglaterra), 11-133 p. 1997.
22. RUIZ C., R. Efecto de la fenología del fruto del café sobre los parámetros de la tabla de vida de la broca del café; *Hypothenemus hampei* (Ferrari). Universidad de Caldas. Facultad de Ciencias Agropecuarias, 1996. 87 p. (Tesis Ingeniero Agrónomo).

23. SOUTHWOOD, T.R.E. Ecological Methods with particular reference to the study of insect populations. 2 ed. London , Chapman & Hall, 524 p. 1978.
24. TAYLOR, D.J.; FINSTON, T.L.; HEBERT, P.D.N. Biogeography of a widespread freshwater crustacean: pseudocongruence and cryptic endemism in the North American *Daphnia laevis* complex. Evolution 52:1648–70. 1998.