

## Aspectos biológicos, morfológicos y genéticos de *Hypothenemus obscurus* e *Hypothenemus hampei* (Coleoptera: Curculionidae: Scolytinae)

Biologic, morphologic, and genetic aspects of *Hypothenemus obscurus* and *Hypothenemus hampei* (Coleoptera: Curculionidae: Scolytinae)

LUIS M. CONSTANTINO<sup>1</sup>, LUCIO NAVARRO<sup>2</sup>, ALEJANDRO BERRIO<sup>3</sup>, FLOR E. ACEVEDO<sup>4</sup>, DAVID RUBIO<sup>5</sup> y PABLO BENAVIDES<sup>6</sup>

**Resumen:** Existen dos especies de *Hypothenemus* en Colombia de importancia económica: *H. hampei* y *H. obscurus*. La primera es la plaga más destructiva del café, mientras que la segunda ataca varias especies, incluyendo macadamia y café. El objetivo de esta investigación fue comparar estas dos especies, biológica, morfológica y genéticamente, con el fin de establecer diferencias que expliquen la adaptación de la broca al café. Los insectos fueron criados en dieta artificial de café y macadamia para estudiar su biología. Se estudió su morfología mediante mediciones en microscopio de luz y a través de Microscopía Electrónica de Barrido (MEB). Las comparaciones genéticas se realizaron mediante citogenética y bandeado C cromosómico, desarrollo de perfiles genéticos AFLP y estudios de partenogénesis. La duración del ciclo de vida (huevo a adulto) de *H. obscurus* fue de 28,5±1,3 días y en *H. hampei* de 26,8±1,0 en dietas de macadamia y café respectivamente. Ambas especies se desarrollaron en las dietas alternativas; sin embargo, su capacidad reproductiva se afectó significativamente. Las comparaciones morfológicas mostraron características específicas que diferencian ambas especies y permitieron explicar su comportamiento de alimentación. Los análisis citogenéticos revelaron heterocromatización facultativa que ocasiona patrones idénticos de haplodiploidía funcional en ambas especies, igualmente se reportan similares cariotipos y número de cromosomas. No se evidenció partenogénesis y se amplificaron fragmentos de ADN exclusivos en cada una de ellas. Esta información permitirá avanzar en la comparación de los transcriptomas de estas especies para dilucidar las bases genéticas que soportan los hábitos monófagos de la Broca del Café.

**Palabras claves:** Citogenética. Huella digital. Microscopía electrónica.

**Abstract:** There are two species of the genus *Hypothenemus* of economical importance in Colombia: *H. hampei* and *H. obscurus*. The first is the most destructive insect pest of coffee worldwide, while the latter attacks several crops including macadamia nut and coffee. This research was carried out in order to compare, biologically, morphologically and genetically, these two species to establish differences which explain the adaptation of coffee berry borer to coffee plants. The insects were reared on macadamia and coffee artificial diets. The morphology was studied through observations under light microscope, and Scanning Electron Microscopy (SEM). The genetic comparisons were made using cytogenetics, C-Banding of chromosomes, AFLP molecular fingerprints and parthenogenesis bioassays. *H. obscurus* life cycle (egg to adult) was estimated in 28.5±1.3 days, while *H. hampei* was 26.8± 1.0 on macadamia and coffee diets respectively. Both species could develop on the alternative diet; however, their reproductive capacity was significantly reduced. The morphological comparisons showed specific characteristics for each species, and allowed to explain their feeding habits. The cytogenetic analysis showed facultative heterochromatization which offered identical functional haplo-diploid patterns in both species. We also reported similar karyotypes and chromosome number for both species. There was no evidence of parthenogenesis in these two species and each one showed distinguishable DNA fragments in their fingerprints. This basic information will allow advancing in the comparison of the transcriptomes of these two species in order to elucidate the genetic basis that supports the monophagous habits of coffee berry borer.

**Key words:** Cytogenetics. Fingerprints. Electronic Microscopy.

### Introducción

La Broca del Café *Hypothenemus hampei* (Ferrari, 1867) y la Falsa Broca *H. obscurus* (Fabricius, 1801) son dos especies que se han reportado en el cultivo del café. La primera es la plaga más devastadora del cultivo a nivel mundial, se alimenta y reproduce del endospermo del fruto, causando su deterioro comercial y reduciendo su calidad en taza; es una especie de hábitos monófagos, exclusiva del género *Coffea* y es de origen africano (Bustillo 2006). Por otro lado *H. obscurus* es una especie polífaga, de origen neotropical, se alimenta del mucílago del café, pero es incapaz de perforar las almendras (Vélez 1997).

Los adultos de estas dos especies se pueden encontrar atacando simultáneamente los frutos de café, siendo *H. hampei* la especie más abundante y de distribución más amplia en todo Colombia. Actualmente infesta unas 800.000 ha de café (Bustillo 2006) en un rango entre 600 y 2.200 m.s.n.m. con temperaturas entre 19 y 21°C (Arcila 2007), mientras que *H. obscurus* se encuentra asociada principalmente a cultivos de macadamia en regiones de la zona central cafetera colombiana ubicadas entre los 20 y 23°C, a altitudes comprendidas entre 1.000 y 1.500 m.s.n.m (Villegas y Sánchez 2008). Los adultos de *H. obscurus* y *H. hampei* a simple vista son difíciles de distinguir. *H. hampei* posee setas erectas y filiformes, mientras que *H. obscurus* las po-

<sup>1</sup> M.Sc., Investigador Científico I, Entomología, Cenicafé, Chinchiná, Caldas. [luismiguel.constantino@cafedecolombia.com](mailto:luismiguel.constantino@cafedecolombia.com). <sup>2</sup> Biólogo, Investigador Científico I, Entomología, Cenicafé, Chinchiná, Caldas. [lucionavarro@cafedecolombia.com](mailto:lucionavarro@cafedecolombia.com). <sup>3</sup> Biólogo, Entomología, Cenicafé, Chinchiná, Caldas. [alejandroberrio@cafedecolombia.com](mailto:alejandroberrio@cafedecolombia.com). <sup>4</sup> I. A. Entomología, Cenicafé, Chinchiná, Caldas. [floredith.acevedo@cafedecolombia.com](mailto:floredith.acevedo@cafedecolombia.com). <sup>5</sup> M.Sc., Mejoramiento Genético, Cenicafé, Chinchiná, Caldas. [david.rubio@cafedecolombia.com](mailto:david.rubio@cafedecolombia.com). <sup>6</sup> Ph.D., Investigador Científico II, Coord Disciplina de Entomología, Cenicafé, Chinchiná, Caldas. [pablo.benavides@cafedecolombia.com](mailto:pablo.benavides@cafedecolombia.com)

see más cortas y achatadas en forma de bate en su extremo con seis estrías longitudinales (Alonzo-Padilla 1984; Rubio 2003).

Ambas especies presentan varias sinonimias dados los problemas para identificar correctamente las 200 especies del género *Hypothenemus* conocidas en el ámbito mundial (Wood 2007). *H. obscurus* se encuentra distribuido en Costa Rica, Sur África, en el sudeste asiático, Sur de Estados Unidos, Hawai, Guadalupe, Jamaica, Puerto Rico, México, Guatemala, Nicaragua, Costa Rica, Trinidad, Guyana, Surinam, Colombia y Brasil, donde se tiene reportada como plaga del cultivo de macadamia (*Macadamia integrifolia* Maiden y Betch) ocasionando una disminución del rendimiento y calidad de la nuez. Igualmente esta especie se alimenta de las vainas y semillas, y en algunas ocasiones en ramas secas, de una amplia variedad de hospedantes entre los cuales los más importantes son: el algarrobo *Hymenaea courbaril* (Caesalpinaceae), tamarindo *Tamarindus indica* (Caesalpinaceae), clavellino *Caesalpinia pulcherrima* (Caesalpinaceae), nuez moscada *Myristica fragrans* (Myristicaceae), nuez del brasil *Bertholletia excelsa* (Lecythidaceae), yarumo *Cecropia* sp. (Cecropiaceae), matapalo *Phoradendron* sp. (Loranthaceae), *Ficus* sp. (Moraceae), mangle *Rhizophora* sp. (Rhizophoraceae), cacao *Theobroma cacao* (Sterculiaceae), congolo *Mucuna* sp. (Fabaceae) y café *Coffea arabica* (Rubiaceae) (Wood 2007). Estos antecedentes nos indican que *H. obscurus* es de hábitos polívoros, contrario a *H. hampei* el cual ha sido descrito de hábitos monófagos, alimentándose exclusivamente del género *Coffea* spp. (Rubiaceae) (Vélez 1997; Bustillo 2006).

En Colombia *H. obscurus* está reportada como plaga del cultivo de la nuez de macadamia en la zona cafetera de los departamentos de Quindío, Risaralda, Caldas, Cauca, Valle y Cundinamarca (Villegas 1998). Las hembras inician el ataque al realizar perforaciones laterales en la nuez, hasta alcanzar la almendra donde depositan sus huevos, de los que emergen las larvas que consumen la almendra casi en su totalidad, encontrando que el daño se produce tanto en los frutos verdes que se empiezan a secar en el árbol como en los frutos que se caen al suelo (Beardsley 1990; Jones *et al.* 1992; Villegas 1998). Además del daño mecánico directo ocasionado por la Falsa Broca al alimentarse y destruir las almendras, los orificios de entrada y de salida realizados por el insecto en los frutos son la puerta de entrada a esporas de hongos saprofitos que contaminan la nuez, causando mayores pérdidas de calidad y disminución del valor comercial de la almendra (Jones *et al.* 1992). En el caso del cultivo de café, *H. hampei* ataca y daña los frutos que son comercializados, reduce la producción por la destrucción de los granos (pérdida de peso), provoca la caída de frutos, deprecia el café en su clasificación por tipo al aumentar los granos perforados y quebrados en el beneficio y además, altera el sabor de la bebida (Duque y Chaves 2000).

Una de las características biológicas de la Broca del Café es su comportamiento reproductivo altamente endogámico, la broca fundadora produce una progenie compuesta principalmente por hembras, en una proporción de 10:1 con respecto a los machos, estos últimos ápteros y de menor tamaño, los cuales permanecen dentro del fruto apareándose con las hembras de su misma progenie (consanguíneos) (Bustillo 2008; Benavides 2008). Una vez apareadas, las hembras emergen para buscar nuevos frutos de café para ovipositar de manera que la mayor parte del ciclo el insecto ocurre dentro del fruto.

La disponibilidad de dietas artificiales desarrolladas para la cría de la Broca del Café (Villacorta y Barrera 1993; Portilla 1999; Vega *et al.* 2009) ha permitido el mantenimiento de poblaciones por varias generaciones sucesivas para adelantar estudios de biología y genética en condiciones de laboratorio. Los estudios de genética de la Broca del Café muestran que esta especie es funcionalmente haplodiploide, ya que en exámenes citogenéticos de células somáticas de hembras y machos se evidenció que ambos eran diploides; sin embargo, los machos fallaron en expresar genes de resistencia a insecticidas e incluso parece que no pueden transmitir sus cromosomas paternos a su descendencia; esta característica podría ser denominada pseudoarrenotoquia (Brun *et al.* 1995).

La haplodiploidía ha evolucionado al menos unas 17 veces en animales, incluyendo los taxones Rotifera, Nematoda, Arachnida e Insecta (Mable y Otto 1998). En los artrópodos existen dos formas de llegar a ser un macho haploide en las especies haplodiploides: en organismos *arrenotocos* los machos se desarrollan a partir de huevos no fertilizados haploides; mientras que en *pseudoarrenotocos*, los machos se desarrollan de huevos fertilizados diploides, pero luego el genoma paterno es eliminado. En el último caso, existen dos formas de perder el genoma paternal: (i) el set de cromosomas paterno es eliminado durante los estados tempranos del desarrollo embrionario y el macho se convierte en un individuo somáticamente haploide; o (ii) el set cromosómico paterno es inactivado y retenido al interior de las células somáticas como una masa condensada de cromatina y eliminados durante la espermatogénesis. En ambos casos, el set cromosómico materno es génicamente expresado y cromosómicamente transmitido a su progenie. A la fecha, la pseudoarrenotoquia ha sido estudiada en cócidos (Hemiptera) (Nur 1980), ácaros de la familia Phytoseiidae (Acari) (Nelson-Rees *et al.* 1980; Schulten 1985; Perrot-Minnot *et al.* 2000) y en la Broca del Café (Coleoptera) (Brun *et al.* 1995; Borsa y Kjellberg 1996).

En vista de que el ciclo de vida de *H. obscurus* no está descrito completamente y que esta especie parece cercana a *H. hampei*, surgió la necesidad de hacer este estudio comparativo para determinar las diferencias biológicas, morfológicas, citogenéticas y genéticas existentes entre estas dos especies pertenecientes al mismo género, pero contrastantes en hábitos y comportamientos, que podría ayudar a entender las razones biológicas y genéticas que posee la Broca del Café para ser una especie tan especializada en alimentarse, desarrollarse y reproducirse únicamente en plantas del género *Coffea* spp.

## Materiales y Métodos

**Aspectos biológicos de *H. obscurus* y *H. hampei*.** Para avanzar en el conocimiento de la biología de la Falsa Broca y la Broca del Café, se realizaron estudios comparativos sobre la cría de estos dos insectos en frutos de macadamia, granos de café y dietas artificiales. También se estudió el daño y el modo de penetración de *H. obscurus* en frutos de macadamia. Para el desarrollo de una dieta artificial para la cría de *H. obscurus* en confinamiento, se estudió la dieta Cenibroca (Portilla 1999) usada para la cría de la Broca del Café, donde se reemplazó el café molido por endospermo y pericarpio de macadamia.

El modo de penetración y el daño de la Falsa Broca se registraron mediante observación directa en cultivos de ma-

cadamia de la Estación Experimental Paraguacito de Cenicafé, localizada a 1.200 m de altitud, en el departamento del Quindío, Colombia. Se recolectaron 100 frutos brocados del suelo de una parcela de 180 árboles productivos, que contenían una perforación de entrada en la corona. Estos frutos se mantuvieron en condiciones ambientales controladas de  $26\pm 1^\circ\text{C}$  y  $80\pm 2\%$  de HR durante 60 días en cajas plásticas de 30 x 25 x 10cm con tapa y dos orificios de ventilación de 5cm de diámetro cubiertos con muselina blanca. Una vez se obtuvieron los adultos se establecieron colonias del insecto mediante la cría en dieta artificial.

En laboratorio se realizó un ensayo de alimentación de *H. obscurus* y *H. hampei* con frutos y granos de café. Inicialmente se tomaron 100 cerezas de café (*Coffea arabica* var. Colombia) con 22 a 30 semanas de desarrollo y se depositaron sobre cajas plásticas. Estos frutos se infestaron en una proporción de 1:1 con 100 hembras adultas de Falsa Broca provenientes de la colonia en dieta artificial de macadamia (Cenibroca modificada). Del mismo modo, otros 100 frutos de café con las mismas características se infestaron con hembras fértiles de Broca del Café criadas sobre café pergamino del 47% de humedad. En otro experimento, granos de café pergamino del 47% de humedad se individualizaron en 80 viales de vidrio borosilicato (12 x 35mm) con tapa plástica y se infestaron con un adulto hembra de *H. obscurus* y de *H. hampei* (40 repeticiones/especie). Estas muestras se mantuvieron en condiciones de laboratorio de  $26\pm 1^\circ\text{C}$  de temperatura y  $80\pm 2\%$  de humedad relativa (HR).

Los frutos y granos de café se disecaron 12 días después. Se registró el número de frutos y granos perforados, la posición de los adultos de cada especie en frutos y granos de café y la presencia de estados inmaduros.

Con el fin de describir el ciclo de vida (huevo a adulto) de las dos especies de *Hypothenemus*, se realizó un experimento con dietas artificiales. La unidad experimental estuvo conformada por un vial de vidrio (60 x 25mm) esterilizado con 1 g de dieta artificial Cenibroca (café) y Cenibroca modificada (macadamia), conteniendo una hembra fértil de cada especie en cuatro tratamientos (Tabla 1): T1 dieta de macadamia con *H. obscurus*, T2 dieta de macadamia con *H. hampei*, T3 dieta de café con *H. obscurus* y T4 dieta de café con *H. hampei*. La infestación de las dietas se realizó con adultos de Falsa Broca y Broca del Café desinfectados con una solución al 3% de hipoclorito de sodio con tres lavados durante tres minutos y un enjuague con agua destilada para evitar contaminación en las dietas. Los viales se ubicaron dentro de cajas plásticas de color negro sobre estantes metálicos para evitar la entrada de luz y semejar los hábitos crípticos del insecto. Este experimento se mantuvo en las mismas condiciones de laboratorio descritas anteriormente. Por cada tratamiento se tuvieron 30 repeticiones, asignadas bajo un diseño completamente aleatorio. Se evaluó la oviposición de las hembras y el número de estados biológicos de cada especie en las dietas artificiales a los 28 y 35 días después de infestadas. Los datos se analizaron por medio de la estimación del promedio y del coeficiente de variación por tratamiento, con un análisis de varianza al 5% bajo un modelo con un diseño completamente aleatorio y prueba de Tukey ( $p < 5\%$ ) entre tratamientos. Se determinó la duración del ciclo de vida de ambas especies a partir de las unidades experimentales de los tratamientos (T1) y (T4).

### Comparación morfológica entre *H. obscurus* y *H. hampei*.

Se tomaron fotografías mediante Microscopía Electrónica de Barrido (MEB), para lo cual los adultos de ambas especies se fijaron en solución de glutaraldehído (2,5%) con buffer fosfato (0,1M; pH7,4) por 48 horas y luego se sometieron a deshidratación en una serie gradual de diferentes concentraciones de etanol (80, 90 y 100%) durante 20 minutos; luego las muestras se sumergieron en etanol:xileno (1:1) durante 12 horas y después se transfirieron a etanol 100% por 20min. El secado por punto crítico con  $\text{CO}_2$  se realizó en una cámara de vacío Tousimis 780 (Rockville, MD). Los especímenes adultos se colocaron sobre un portaobjeto adherido con cinta transparente de doble faz en posición lateral, dorsal y ventral, con 10 individuos por cada especie. Las muestras se sometieron a fase de metalizado con Oro y Paladio de 18nm cubiertas con un pulverizador y visualizadas en el Microscopio Electrónico de Barrido (JEOL JSM-820, Tokio), de la Unidad de Virología del CIAT, Palmira, Colombia.

Igualmente se realizaron comparaciones usando Microscopía de Luz (ML). Para esto, individuos adultos de *H. hampei* y *H. obscurus* se fijaron y aclararon en una solución de KOH (10%) por ocho días, después se lavaron en etanol (95%) y se montaron sobre portaobjetos de vidrio con bálsamo de Canadá y se visualizaron con un microscopio de luz Nikon modelo SM2 1500, equipado con un dispositivo de iluminación con luz blanca (Digital Sight DS-U1), usando un software (NIS-Elements-BR- Nikon Corporation, Tokio). Las mediciones se realizaron a 100 individuos de cada estado para cada especie con la ayuda de una reglilla milimétrica acoplada al ocular del microscopio de luz.

**Evaluación de partenogénesis.** Para determinar si *H. obscurus* y *H. hampei* presentaron sistema de reproducción partenogénica, por especie se individualizaron 50 pupas hembras en viales de vidrio con dieta de macadamia y café respectivamente. La diferenciación de sexos en las pupas de ambas especies se logró gracias a que ambas especies presentaron claro dimorfismo sexual, siendo los machos más pequeños, con cuerpo más recurvado y ápteros. Los viales se mantuvieron bajo condiciones controladas de temperatura de  $26\pm 1^\circ\text{C}$  y humedad relativa de  $80\pm 2\%$  en cajas multiusos plásticas de color negro. Se tomaron lecturas cada semana hasta 50 días después para contabilizar y determinar la presencia o ausencia de posturas y el desarrollo de las progenies.

**Análisis citogenético de *H. hampei* y *H. obscurus*.** Para comparar células somáticas de *H. hampei* y *H. obscurus*, larvas y pupas de ambas especies se prepararon tejidos procedentes de la unidad de cría de broca en el laboratorio de Entomología de CENICAFE, Colombia. Se usó el método de microcentrifugación de Camargo *et al.* (2006) con algunas modificaciones. Cada individuo se sumergió en solución hipotónica (NaCl 44mM;  $\text{CaCl}_2$  0,90 mM; KCl 1,34mM;  $\text{NaHCO}_3$  1,19mM; Colchicina 1%) durante 2h, después de la primera hora, los individuos se maceraron suavemente usando un pistilo plástico para obtener una suspensión celular. Posteriormente, las suspensiones celulares fueron fijadas en Carnoy (4 etanol: 1 ácido acético). La suspensión celular fue preparada por medio de dispersión mecánica de los tejidos, haciendo entre ocho y 10 movimientos suaves con una micropipeta. Las células fueron colectadas por centrifugación durante 4 min a 3000rpm en una microcentrífuga a temperatura

ambiente, el sobrenadante se descartó y el botón celular fue resuspendido en fijador fresco. Esta suspensión se centrifugó nuevamente y se resuspendió en 15  $\mu$ L de fijador fresco. Después, 10 mL de la suspensión fue goteada desde una altura de 20 a 30 cm sobre láminas de porta objetos limpias y enfriadas en agua-hielo. Las láminas goteadas se secaron por flameo y después se tiñeron por 5 min con solución Giemsa (5% en H<sub>2</sub>O). Las bandas C se prepararon usando el procedimiento descrito por Schwarzacher *et al.* (1980) con algunas modificaciones. Las láminas goteadas se hidrolizaron después de tres días con una solución de ácido acético (45%) a 60°C por 10 minutos. Posteriormente, se incubaron en Ba(OH)<sub>2</sub> a 25°C por 10 min y en buffer 2xSSC (pH 7,0) a 60°C por 80 min. Las láminas secas se tiñeron con Giemsa (4%) por 5 minutos. Todas las observaciones y las fotomicrografías se realizaron en un microscopio Nikon Eclipse 90i, las imágenes se capturaron con la cámara integrada usando un software Lucia v5.3 y se procesaron en el programa Adobe Photoshop CS3.

**Desarrollo de perfiles genéticos.** Los perfiles genéticos de ambas especies se obtuvieron mediante la técnica de AFLP (Polimorfismos Amplificados de Longitud de Fragmentos), utilizando el sistema de análisis II de AFLP (GIBCO Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) según la metodología de Vos *et al.* (1995). Para estos ensayos se usaron tres combinaciones de cebadores específicos *EcoRI/MseI* (AC/CTG, AA/CTG, AA/CTC) a partir de ADN de 10 adultos para cada especie. El ADN fue extraído con el kit Dneasy Tissue-Qiagen (Valencia, CA, USA.). Los amplificados se visualizaron en geles de poliacrilamida (5%) preparados en cámaras de electroforesis vertical (OWL Thermo Fisher Scientific Inc, Portsmouth, NH) y se revelaron por tinción con AgNO<sub>3</sub> según la metodología de Bassam *et al.* (1991).

## Resultados y Discusión

**Aspectos biológicos de *H. obscurus* y *H. hampei*.** Las hembras de *H. obscurus* perforan el pericarpio del fruto de macadamia a través de la corona o cicatriz del cáliz floral cuando el fruto aún está verde y no en la parte lateral del endocarpo como fue reportado anteriormente (Jones *et al.* 1992; Villegas 1998) (Fig. 1A); posteriormente, ellas perforan el endocarpo inmaduro para poder entrar en el endospermo o nuez, donde barrenan y forman galerías y cámaras en su interior. Una vez adentro, ovipositan entre 10 y 30 huevos y completan su ciclo de vida (Fig. 1C). Posteriormente se aparearon y las hembras rompieron la parte lateral del endocarpo, abriendo varios orificios circulares por donde emergieron los adultos en busca de nuevos frutos para colonizar (Fig. 1E). La textura externa lisa y dura del endocarpo, la cual no permite apoyo y fricción al insecto, podría ser la explicación para que no pueda penetrar lateralmente. Una situación diferente se presenta cuando los frutos están secos, ya que el endocarpo se vuelve extremadamente duro y se dificulta la salida de las hembras de la nueva generación. En este estudio se observó que más del 80% de las hembras muertas halladas dentro de frutos secos presentaron los dientes de las mandíbulas completamente desgastados y un gran número de perforaciones parciales no finalizadas de adentro hacia afuera del endocarpo en frutos colectados del campo (Fig. 1D).

Además del daño mecánico directo ocasionado por el insecto al alimentarse y destruir las almendras, los orificios de entrada y de salida son la puerta de entrada a esporas de



**Figura 1.** Sitio de penetración y daño de Falsa Broca *Hypothenemus obscurus* en frutos de macadamia. **A.** frutos verdes mostrando el cáliz floral (cf) o corona. **B.** frutos secos mostrando el canal de penetración (cp), pericarpio (p), endocarpo (e), endospermo (almendra) (a). **C.** galerías en la almendra. **D.** perforaciones parciales no finalizadas de adentro hacia afuera en el endocarpo. **E.** fruto seco mostrando el orificio de entrada (oe) en la corona, y orificio de salida (os) en la parte lateral del endocarpo.

hongos saprofitos que contaminan la nuez, causando mayores pérdidas de calidad y disminución del valor comercial de la almendra, tal como lo reporta Jones *et al.* (1992).

*H. obscurus* logró perforar 59% de las cerezas de café, pero sólo el 3% logró roer los granos superficialmente. No se observaron galerías dentro de los granos y sólo un huevo fue depositado en el interior de un grano. *H. hampei* por el contrario, perforó el 96% de las cerezas de café, el 66% de los granos y ovipositó en el 8% de ellos a los 12 días de la infestación. Sobre café cereza se encontraron estados inmaduros en el 32,5% de los frutos infestados con Falsa Broca, con un promedio de 5,3 estados por fruto alimentándose de pulpa y mucílago en el espacio que separa los dos granos; estos estados larvales lograron desarrollarse hasta adulto. La totalidad de los frutos de café perforados por *H. hampei* contenían estados inmaduros en el interior de las almendras con un promedio de 40 estados por grano. Estos resultados confirman las observaciones previas (Vélez 1997; Bustillo 2006). Estos resultados indican que bajo las condiciones de laboratorio, *H. obscurus* tuvo la capacidad de perforar y desarrollarse en cerezas de café, alimentándose del mucílago y pulpa de las cerezas sin realizar daño a las almendras. Se confirman los hábitos polípagos de *H. obscurus*, incluido el café, tal como lo reportan Vélez (1997) y Wood (2007). A pesar de que estas pruebas se realizaron en laboratorio y los insectos fueron expuestos a una sola posibilidad de alimento, no se esperaría en condiciones naturales en Colombia que la Falsa Broca ofrezca una amenaza al cultivo del café, ya que los registros citados de Falsa Broca en frutos de café en otros países tampoco reportan daño a las almendras (Wood 2007).

Las evaluaciones de cría de *H. obscurus* en dieta artificial Cenibroca modificada (macadamia) permitieron observar que la adición de sólo endospermo, producía una película lipídica que no permitía el normal desarrollo de los estados del insecto. La proporción de los componentes provenientes de macadamia que permitieron la cría de la Falsa Broca

**Tabla 1.** Componentes de la dieta artificial Cenibroca (Portilla 1999) (café) para la cría de *Hypothenemus hampei* y de la dieta artificial Cenibroca modificada (macadamia) para la cría de *Hypothenemus obscurus*.

Ingredientes	<i>H. obscurus</i>	<i>H. hampei</i>
Agua	200 ml	200 ml
Agar	5,6 g	5,6 g
Nuez de macadamia molida	6 g	--
Pericarpio de macadamia molida	20 g	--
Café molido	--	26 g
Sucrosa	3,7 g	3,7 g
Caseína	5,3 g	5,3 g
Levadura torula	5,3 g	5,3 g
Acido benzoico	0,21 g	0,21 g
Benomil	0,4 g	0,4 g
Vitaminas de Vanderzant	0,133 g	0,133 g
Nipagin	0,26 g	0,26 g
Colesterol	0,16 g	0,16 g
Acido sorbico	0,06 g	0,06 g
Sales de Wesson	0,53 g	0,53 g
Etanol	2,66 ml	2,66 ml
Formaldehido 37%	0,53 ml	0,53 ml

fue de 20% de endospermo con 80% de pericarpio molidos (Tabla 1).

En la dieta de café, *H. obscurus* ovipositó en solo 10% de las unidades experimentales, en contraste con la dieta de macadamia donde ovipositó en la totalidad de ellas. El análisis de varianza mostró diferencias significativas en la capacidad reproductiva de esta especie entre la dieta de macadamia y la dieta de café a los 28 y a los 35 días ( $n=30$ ;  $gl=6$ ;  $P=0,0001$ ) (Tabla 2). Lo mismo se observó para *H. hampei*, donde esta especie no ovipositó en dieta de macadamia ( $n=30$ ;  $gl=6$ ;  $P=0,0001$ ) (Tabla 2). Estos resultados confirman los hábitos polífagos de *H. obscurus* y monófagos de *H. hampei* tanto en dieta artificial Cenibroca (macadamia) y Cenibroca (café) como en frutos de café, mientras que Vélez (1997) solo lo reportó en frutos de café.

El ciclo de vida desde huevo hasta adulto de *H. obscurus*

**Tabla 2.** Número de huevos (promedio  $\pm$  error estándar) depositados por hembras de *Hypothenemus obscurus* y de *Hypothenemus hampei* en dieta artificial de café (Cenibroca) y macadamia (Cenibroca modificada) a los 28 y 35 días de infestadas (DDI) ( $n=30$ ).

#### *Hypothenemus obscurus*

DDI	Café	Macadamia
28	13,1 $\pm$ 4,3 a	36,4 $\pm$ 5,8 b
35	14,7 $\pm$ 4,7 a	42,1 $\pm$ 5,5 b

#### *Hypothenemus hampei*

DDI	Café	Macadamia
28	29,4 $\pm$ 6,1 a	0,0 $\pm$ 0,0 b
35	32,2 $\pm$ 6,4 a	0,0 $\pm$ 0,0 b

Medias  $\pm$  error estándar seguidas de la misma letra no difieren estadísticamente según la prueba de Tukey ( $p \leq 0,05$ ) entre los tratamientos.

en dieta artificial de macadamia fue un poco más largo que el de *H. hampei* (Tabla 3). Estos resultados registran por primera vez la cría de *H. obscurus* en dieta artificial bajo condiciones de laboratorio. Se encontró una proporción sexual (macho: hembra) de 1:12 en *H. obscurus* y 1:10 en *H. hampei*. Estas diferencias de radio sexual podrían estar relacionadas con la probacteria *Wolbachia* y su efecto en la determinación sexual de estas especies, de la manera como ha sido reportada como distorsionador de la determinación sexual en varios insectos (Benavides 2008) y su presencia en la Broca del Café fue confirmada (Vega *et al.* 2002). Se presume que en la Falsa Broca se podría presentar esta misma situación. Entre los mecanismos reportados como un distorsionador en la determinación sexual de insectos está la feminización o conversión sexual en el cual individuos genéticamente machos se convierten en hembras funcionales (Rousset *et al.* 1992) y la incompatibilidad citoplasmática, en al cual la fertilidad depende de la ausencia o la presencia de la probacteria en el macho o la hembra (O'Neill *et al.* 1997; Benavides 2008).

#### Comparación morfológica entre *H. obscurus* y *H. hampei*.

Los huevos de las dos especies son de color blanco hialino, lisos y de forma elíptica (Figs. 2A, F), siendo un poco más grandes en *H. hampei* en longitud y grosor (Tabla 4). Las larvas son blanco crema, de tipo curculioniforme, eucéfalas, ápodas y encorvadas. La cabeza es marrón claro con mandíbulas bien desarrolladas (Figs. 2B, G). Pasan por dos etapas de crecimiento o instares larvales (L1 y L2). Las pupas de ambas especies son del tipo exarata, de color blanco recién formadas y se tornan de color crema al cabo de dos días. La cabeza está cubierta completamente por el pronoto (Figs. 2 C, H) vistas dorsalmente bajo un Microscopio de Luz (ML).

Los adultos de *H. obscurus* son negro brillante, de forma cilíndrica (vistos dorsalmente), el cuerpo está recubierto de setas achatadas en forma de bate en su extremo. Las formas adultas jóvenes recién formadas, cuando la cutícula del cuerpo aún no está completamente melanizada, son de color castaño claro acaramelado, pero al cabo de dos días se tornan de color negro. Las hembras son de mayor tamaño que el macho (Tabla 4) (Figs. 2 I, J) y presentan alas membranosas bien desarrolladas y funcionales. Los machos carecen de alas membranosas y permanecen todo el tiempo dentro de los frutos apareándose con las hembras de su misma progenie. En *H. hampei*, los adultos son más grandes que *H. obscurus* y presentaron setas filiformes (Figs. 2 D, E) vistos con un Microscopio de Luz (ML). La forma del pronoto es semicircular en *H. obscurus* como en *H. hampei* pero con la superficie reticulada y rugosa que es lisa en *H. hampei*. El pronoto visto en forma dorsal, cubre completamente la cabeza en los dos sexos de ambas especies. La hembra de *H. obscurus*, de perfil, muestra una línea dorsal más o menos recta, mientras que en *H. hampei* es levemente curvada (Figs. 2 D, I). En los machos, en cambio presentan un arco más pronunciado y comprende todo el perfil del borde anterior del protórax y la extremidad apical de los élitros (Figs. 2 E, J) siendo más pronunciado en *H. hampei* que en *H. obscurus*. Según Wood (2007), un carácter diagnóstico de la Falsa Broca es la frente de la cabeza de forma convexa y amplia, con un surco profundo y estrecho en el área medial desde el nivel superior de los ojos hasta el borde del epistoma; sin embargo, este es un carácter débil frente a *H. hampei*.

Las mandíbulas en las dos especies, son estructuras fuertemente esclerotizadas, articuladas dorsolateralmente, situa-

**Tabla 3.** Duración en días (promedio  $\pm$  error estándar) de los diferentes estados de desarrollo de *Hypothenemus obscurus* y *Hypothenemus hampei* en dieta artificial de macadamia y café, respectivamente (n=100).

Estado de desarrollo	<i>H. obscurus</i>	<i>H. hampei</i>
Huevo	4,1 $\pm$ 1,2	5,1 $\pm$ 1,0
Larva 1	7,2 $\pm$ 2,1	6,4 $\pm$ 1,5
Larva 2	9,2 $\pm$ 1,5	6,6 $\pm$ 1,1
Prepupa	2,0 $\pm$ 0,2	2,2 $\pm$ 0,1
Pupa	6,0 $\pm$ 1,3	6,5 $\pm$ 1,2
Total	28,5 $\pm$ 1,3	26,8 $\pm$ 1,0

das en la región anterior de la cabeza y de forma triangular (Figs. 3 A, B); poseen dos regiones, una región ventral, en donde se observan tres incisivos diseñados para cortar y en la región dorsal un molar amplio que facilita la trituración del material alimenticio. El tercer incisivo en *H. obscurus* es más desarrollado y visible al que presenta *H. hampei* (Figs. 4 A, B).

Las hembras de *H. hampei* presentan en promedio un número aproximado de 115 omatidios (Fig. 3 C), mientras que el ojo compuesto de *H. obscurus* exhibe alrededor de 150 omatidios (Fig. 3 D) vistos con un Microscopio Electrónico de Barrido (MEB). Este carácter diagnóstico que no estaba documentado para *H. obscurus*, puede servir para separar ambas especies adultas.

El flagelo de la antena está conformado en las dos especies por ocho flagelómeros que se encuentran fusionados, los primeros cuatro y el pedicelo forman el funículo y los cuatro restantes de la región distal forman una porra o clava ovalada, que presenta una serie de setas a lo largo de las suturas que unen los flagelómeros, estas setas de la porra en *H. hampei* son de menor longitud comparadas con las de *H. obscurus* (Figs. 5 C y 6 D). Wood (2007) describe que el funículo antenal del género *Hypothenemus* presenta de tres a cinco segmentos, de acuerdo con lo registrado en este trabajo, las especies *H. hampei* y *H. obscurus* presentan cuatro segmentos flagelares y solamente en la región distal del cuarto flagelo se observan entre seis a ocho setas (Figs. 5 A y 5 B).

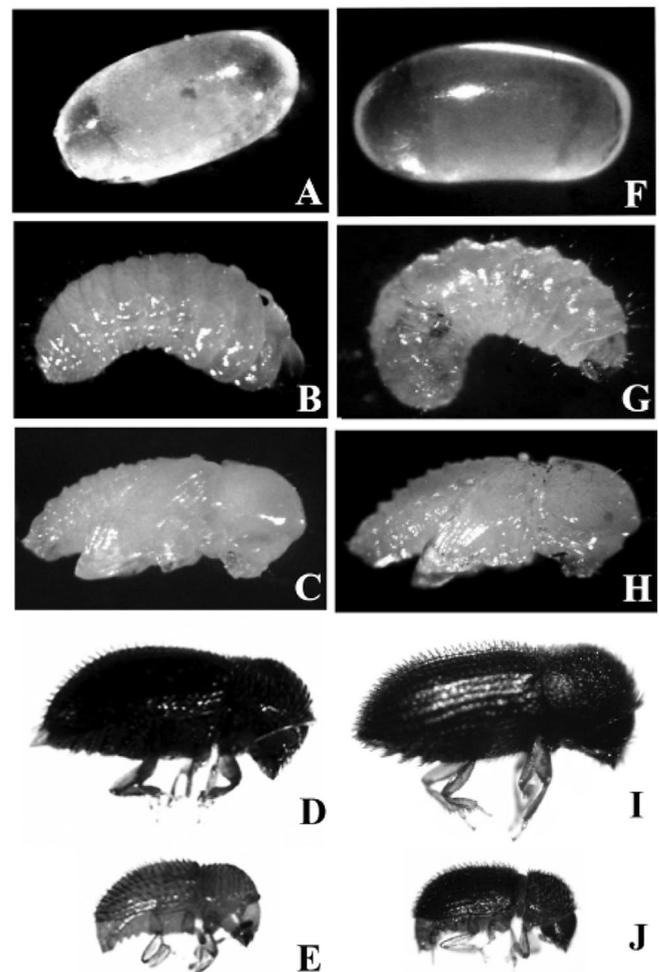
Visto dorsalmente, el pronoto de los dos insectos se inclina en la zona posterior y contiene una gran cantidad de asperezas simétricas, en tipo espiral que presentan setas de diferentes formas y tamaños. Estas setas son largas, cilíndricas y de forma filiforme en *H. hampei*, mientras que en *H. obscurus* son redondeadas en su extremo, en forma de bate y se caracterizan por tener seis a siete estrías longitudinales en la punta (Figs. 6 A a la D) vistas con un Microscopio Electrónico de Barrido (MEB). Con un Microscopio de Luz (ML) las estrías no se alcanzan a visualizar bien, solo se puede apreciar la forma de las setas. La superficie de los élitros en la Broca del Café y en la Falsa Broca es lisa y brillante, las diferencias que presentan están relacionadas en cuanto al número de estrías y la forma de las setas en las interestrías. Los élitros en las hembras de *H. obscurus* cuentan con 10 interestrías y nueve estrías dispuestas longitudinalmente, mientras que en *H. hampei* éstos presentan 11 interestrías y 10 estrías dispuestas longitudinalmente vistos con un Microscopio de Luz (ML) (Figs. 7 A y 7 B).

La tibia en las dos especies se encuentra recubierta de setas y presenta en la región anterior una serie de dientes que

**Tabla 4.** Longitud (promedio  $\pm$  error estándar) en milímetros de cada estado de desarrollo de *Hypothenemus obscurus* y *Hypothenemus hampei* en dieta artificial de macadamia y café, respectivamente (n=100).

Estado	<i>H. obscurus</i>	<i>H. hampei</i>
Huevo	0,65 $\pm$ 0,05 x 0,26 $\pm$ 0,01	0,70 $\pm$ 0,02 x 0,30 $\pm$ 0,02
Larva 1	0,63 $\pm$ 0,01 x 0,3 $\pm$ 0,01	0,70 $\pm$ 0,02 x 0,33 $\pm$ 0,02
Larva 2	2,0 $\pm$ 0,03 x 0,5 $\pm$ 0,02	2,2 $\pm$ 0,04 x 0,6 $\pm$ 0,03
Pupa	1,65 $\pm$ 0,02 x 0,64 $\pm$ 0,03	1,68 $\pm$ 0,03 x 0,68 $\pm$ 0,02
Adulto macho	1,10 $\pm$ 0,04 x 0,50 $\pm$ 0,02	1,12 $\pm$ 0,05 x 0,53 $\pm$ 0,03
Adulto hembra	1,75 $\pm$ 0,06 x 0,76 $\pm$ 0,03	1,85 $\pm$ 0,05 x 0,82 $\pm$ 0,04

difieren en las dos especies, para el caso de *H. hampei* la tibia presenta una serie de seis o siete espinas en la margen distal, mientras en *H. obscurus* se observan ocho espinas (Figuras 7 C y 7 D). Este carácter diagnóstico no fue reportado por Wood (2007). En las dos especies estas espinas son más evidentes en las patas pro y mesotorácicas, pero en las patas metatorácicas son pequeñas y ovaladas. El abdomen en *H. hampei* y *H. obscurus* es completamente curvado en la parte dorsal, debido a que en esta región se pliegan las alas posteriores



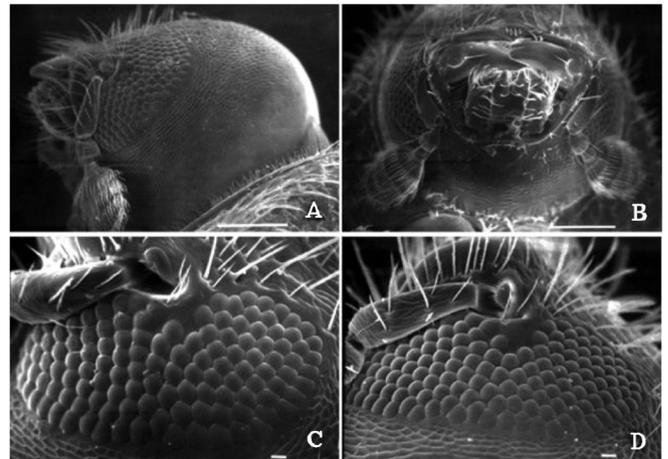
**Figura 2.** Estados de desarrollo de *Hypothenemus hampei* A. huevo. B. larva 2. C. pupa. D. hembra. E. macho. Estados de desarrollo de *Hypothenemus obscurus*. F. huevo. G. larva 2. H. pupa. I. hembra. J. macho.

que se resguardan en los élitros. En posición ventral, las dos especies muestran cinco esternitos o placas abdominales muy diferenciadas, pero en *H. hampei* se presenta mayor cantidad de setas en la región ventral del abdomen.

**Estudio de partenogénesis.** Hubo oviposición en el 70% de los viales para *H. obscurus* y en más del 90% en los viales para *H. hampei*. El total promedio acumulado de huevos fue de  $42,1 \pm 5,5$  por hembra en *H. obscurus* y  $32,4 \pm 6,4$  huevos en *H. hampei*. Al día 50 las hembras fueron retiradas y se hizo seguimiento a las posturas durante dos meses. De un total de 1.750 huevos ovipositados por *H. obscurus* en 50 días y de 1.458 huevos ovipositados por *H. hampei* en el mismo periodo, ninguno de los huevos eclosionaron, confirmando en este estudio que *H. hampei* ni *H. obscurus* presentaron partenogénesis; esto concuerda con los trabajos de Álvarez y Cortina (2004) en Colombia y Barrera *et al.* (1995) en Méjico para la Broca del Café y se encuentra en contraste con los resultados de Muñoz (1989) en Honduras, y Montoya (1992), Montoya y Cárdenas (1994) en Colombia, donde una pequeña proporción de hembras no fertilizadas produjeron huevos fértiles ( $< 0,3\%$ ).

**Estudio citogenético.** El estudio de las metafases de *H. hampei* y de *H. obscurus* evidenció un número diploide de  $2n=14$  en las hembras y un sistema de determinación sexual en el que un set cromosómico se encuentra condensado en los machos de ambas especies (Figs. 8C, 8D). De acuerdo con las observaciones en las preparaciones cromosómicas, las hembras de *H. hampei* y de *H. obscurus* presentaron una fórmula cariotípica formada por cinco pares de cromosomas submetacéntricos y dos pares acrocéntricos. El tamaño de los cromosomas se distribuye para las dos especies, desde 5 a  $1 \mu\text{m}$  aproximadamente, tres de ellos poseen tamaños similares (Figs. 8A, 8B). Las células pro-metafásicas de machos de *H. hampei* y *H. obscurus* evidenciaron una masa condensada de uno de los componentes haploides, acompañadas de siete cromosomas (Figs. 8C, 8D). Las células interfásicas de hembras de las dos especies se caracterizaron por la presencia de cromómeros; manchas conspicuas e intensamente teñidas que se relacionaron con un alto grado de condensación de la cromatina (Figs. 8E, 8F). El análisis cariotípico de los machos de estas dos especies revelaron que el set heterocromático haploide visto durante la metafase forma un cromocentro que usualmente está acompañado de varias manchas heteropicnóticas (Figs. 8G, 8H).

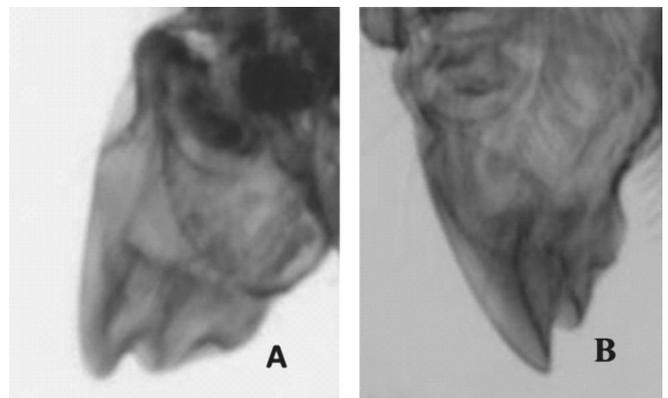
Dado que algunos cromosomas de una misma metafase presentaron similitudes macro que dificultaron su análisis, fue necesario realizar bandedo-C. Esta técnica permitió revelar selectivamente las regiones de heterocromatina constitutiva y ofreció mejor información sobre la arquitectura de los cromosomas para una mejor caracterización de los cariotipos (Fig. 9). Adicionalmente, en este estudio se confirma que el cariotipo de *H. hampei* y *H. obscurus* son muy parecidos, de hecho, ambas especies se caracterizaron por poseer una fórmula cromosómica idéntica. Podría argumentarse que *H. obscurus* también desarrolla el sistema genético de heterocromatización de un set cromosómico. En todos los machos de ambas especies se observó un tipo de masa heterocromática acompañada de numerosos puntos heteropicnóticos en células interfásicas y de siete cromosomas en células metafásicas. Además, las manchas heteropicnóticas observadas en interfase no necesariamente corresponden a centrómeros, debido a



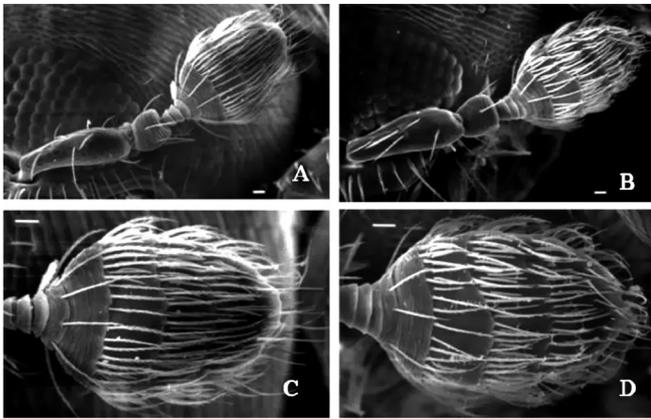
**Figura 3.** A. Cabeza en vista lateral de *Hypothenemus hampei*, escala=  $100 \mu\text{m}$ , 230X; B. Aparato bucal de *H. hampei*, escala  $100 \mu\text{m}$ , 230X; C. Ojo compuesto de *H. hampei* mostrando el número de omatidias, escala =  $10 \mu\text{m}$ , 500X; D. Ojo compuesto de *H. obscurus*, escala =  $10 \mu\text{m}$ , 500X.

que el número de manchas sobrepasa en muchas ocasiones al número de centrómeros presentes en *Hypothenemus*. En general, entre *H. hampei* y *H. obscurus* no se lograron observar diferencias cromosómicas evidentes, esto indicaría que las diferencias citogenéticas entre estas dos especies yacen a un nivel estructural muy fino y que su divergencia evolutiva radica en rearrreglos cromosómicos muy pequeños, tales como microdeleciones, microduplicaciones, microinversiones, o incluso efectos epigenéticos dados por modificaciones en la estructura de la cromatina independientes de la secuencia del ADN.

La haplodiploidía verdadera (arrenotoquia) ha sido documentada dentro de la subfamilia Scolytinae en las tribus Xyleborini y Dryocoetini (Kirkendall 1993), representando al menos el 70% de las especies de esta subfamilia. Sin embargo, la haplodiploidía funcional en Scolytinae ahora podría ser descrita en una especie más: *H. obscurus*, (Cryphalini), sumándose a la Broca del Café. Todas las especies haplodiploides en Scolytinae, incluyendo las especies del género *Hypothenemus*, comparten varias características ecológicas y reproductivas como la endogamia extrema, relación sexual basada en las hembras, machos desprovistos de alas y de



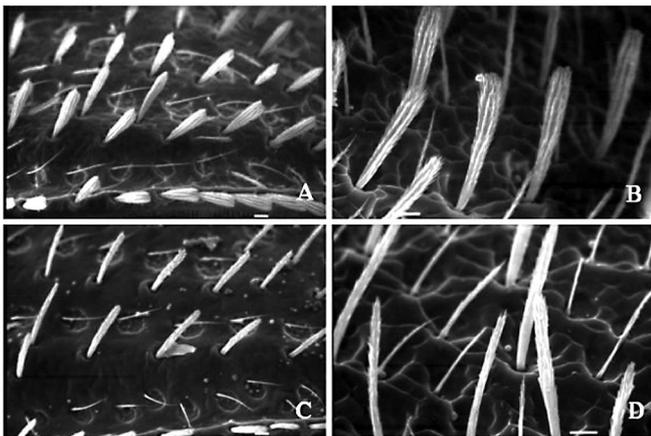
**Figura 4.** Mandíbula izquierda de una hembra adulta. A. *Hypothenemus hampei*. B. *Hypothenemus obscurus*.



**Figura 5.** Antena de hembras de *Hypothenemus obscurus* A. y *Hypothenemus hampei* B. Escala =10µm a 400X. Porra de la antena de *H. obscurus* C y *H. hampei* D. Escala =10µm a 800X.

sarrollo de vida en galerías construidas en diversos órganos vegetales (Kirkendall 1993). Análisis filogenéticos proponen que la haplodiploidía bajo arrenotoquia evolucionó una sola vez dentro de Scolytinae para conformar un clado claramente reconocible; Xyleborini y Dryocoetini (Normark *et al.* 1999). Basados en esta hipótesis, la haplodiploidía funcional pudo aparecer una vez en la tribu Cryphalini dentro de un clado formado por los géneros *Hypothenemus*, *Cryptocarenus*, *Trischidias* y *Periocryphalus* (en Cryphalini se describen cerca de 25 géneros), conocidos como endogámicos y con radios sexuales basados en las hembras (Wood 2007). A pesar que en *Cryptocarenus*, *Trischidias* y *Periocryphalus* no existen datos citogenéticos que soporten la haplodiploidía funcional, es probable que este sistema genético esté presente en estos géneros dado que comparten las características ecológicas y reproductivas con otras especies haplodiploides en Scolytinae (Vega *et al.* 2002).

**Desarrollo de perfiles genéticos de *H. obscurus* y *H. hampei*.** Las especies compartieron el 14,9% de los 254 marcadores generados con las combinaciones evaluadas; sin



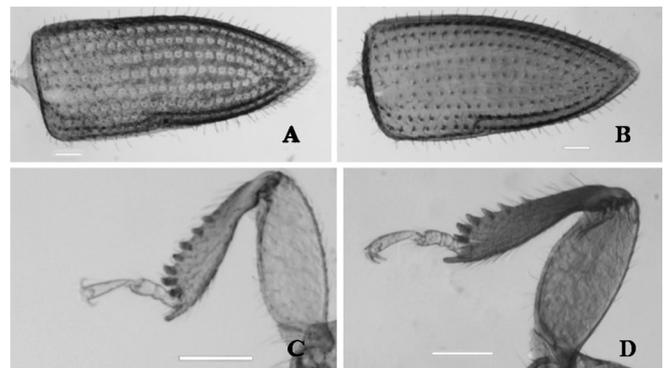
**Figura 6.** A. Setas de los élitros de *Hypothenemus obscurus*. Escala =10µm a 500X. B. Setas en el pronoto de *H. obscurus*. Escala =10µm a 950X. C. Setas de los élitros de *H. hampei*. Escala =10µm a 500X. D. Setas en el pronoto de *H. hampei*. Escala =10µm a 950X.

embargo, el agrupamiento generado a partir del análisis de distancia realizado bajo el algoritmo de UPGMA, identificó las especies. El índice de similitud de Jaccard se calculó utilizando la información generada mediante AFLP, encontrando valores de similitud de tan solo 0,184/1,0, los cuales son bastante bajos y comunes en individuos de especies distintas (Fig.10).

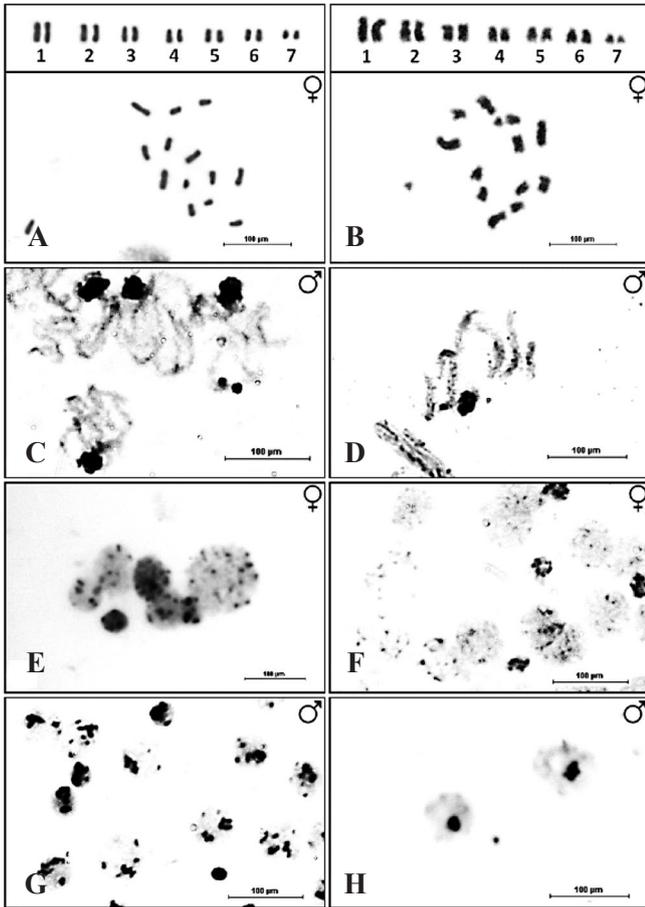
### Conclusiones

A pesar de que *H. hampei* y *H. obscurus* provienen de diferentes centros de origen, África y América, y que atacan diferentes cultivos de importancia económica como son café y macadamia, la similitud en sus características morfológicas, biológicas y genéticas son sorprendentes. Los estudios morfológicos entre los adultos de estas dos especies permitieron identificar caracteres no documentados previamente (Vélez 1997; Wood 2007); el número de estrias longitudinales en los élitros, la cantidad de omatidios en los ojos compuestos, las espinas en las tibias de las patas protorácicas y la forma de los dientes en las mandíbulas, se convierten en caracteres diagnósticos de estas especies. A nivel biológico, se documentó el modo de alimentación y penetración de las hembras de *H. obscurus* en frutos de macadamia, el cual controvierte los reportes previos (Jones *et al.* 1992; Villegas 1998). Se determinó en este estudio el ciclo de vida completo de *H. obscurus*, por primera vez en una dieta artificial de macadamia, en condiciones de laboratorio. Se confirman los hábitos polívoros de *H. obscurus* y monófagos de *H. hampei*. A nivel genético, aunque los perfiles genéticos indicaron clara diferenciación de especies, ninguna especie evidenció partenogénesis; los estudios citogenéticos y reproductivos documentados aquí por primera vez para *H. obscurus*, indican que son similares a los reportados para *H. hampei*, como el número y estructura cromosómica, la condensación de un juego cromosómico en los machos, pseudoarrenotoquia y un alto grado de endogamia.

El estudio de una especie tan cercana a la Broca del Café es importante para determinar las condiciones biológicas y genéticas que la llevaron a adquirir una alta especialización al cultivo del café. Las diferencias entre estas especies yacen en caracteres moleculares mínimos que han ofrecido respuestas

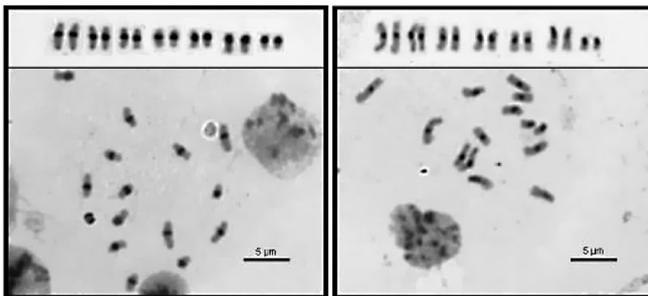


**Figura 7.** A. Élitro derecho de una hembra de *Hypothenemus obscurus* con 10 interestrias y 9 estrias dispuestas longitudinalmente. B. Élitro derecho de una hembra de *H. hampei* con 11 interestrias y 10 estrias dispuestas longitudinalmente. C. Pata protorácica de *H. obscurus* con 8 espinas tibiales. D. Pata protorácica de *H. hampei* con 7 espinas tibiales. Escala= 0,1mm, 40X, 80X.

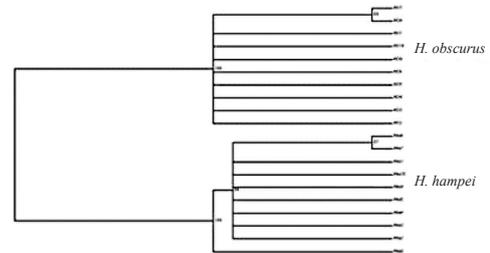
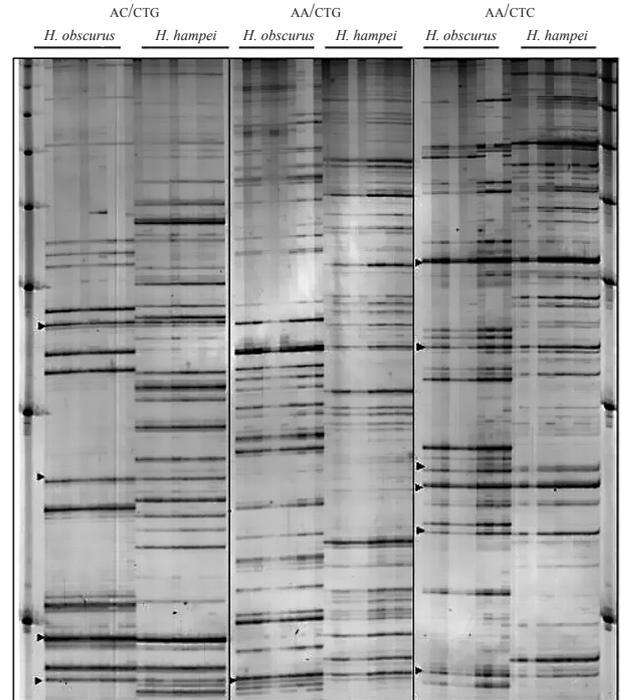


**Figura 8.** Patrones de condensación de cromatina en células de *Hypothenemus hampei* y *H. obscurus*. Metafase y cariotipo en hembras de *H. hampei* A. y *H. obscurus* B. prometafase en machos de *H. hampei* C. y *H. obscurus* D. Interfases en hembras de *H. hampei* E. y *H. obscurus* F. Interfases en machos de *H. hampei* G. y *H. obscurus* H. Escala=100μm

adaptativas y evolutivas complejas. Le proseguirá a esta investigación el análisis de la expresión génica de ambas especies criadas en café para identificar los genes y rutas metabólicas necesarias en la broca durante su desarrollo y reproducción sobre granos de café, paso intermedio en la exploración de nuevas estrategias de control genético y etológico para el manejo de ambas plagas.



**Figura 9.** Bando-C para detectar la heterocromatina constitutiva en células de *Hypothenemus hampei* y *Hypothenemus obscurus*. A. Metafase y cariotipo en hembras de *H. hampei*; y B. *H. obscurus*.



**Figura 10. A.** Perfiles AFLP de *Hypothenemus hampei* e *Hypothenemus obscurus* con tres combinaciones de cebadores específicos *Eco* RI/*Mse* I, (AC/CTG, AA/CTG, AA/CTC). Las flechas indican bandas compartidas. **B.** Dendrograma con el análisis de distancia realizado bajo el algoritmo de UPGMA mediante el índice de similitud de Jaccard para *H. obscurus* y *H. hampei*.

### Agradecimientos

Los autores expresan sus agradecimientos a Jhon Jairo García, Disciplina de Entomología, CENICAFE por la ayuda en el mantenimiento de las crías de broca, al Dr. Juan Carlos Herrera y a Gloria Camayo, Disciplina de Mejoramiento Genético, CENICAFE por su asistencia en las fotografías microscópicas de citogenética, a Walforth Sánchez y Diego Montoya, subestación experimental Paraguaicito por la consecución de adultos de Falsa Broca, a Juan Carlos Ortiz, CENICAFE, por su asistencia en la toma de fotografías de luz, a José A. Arroyave, CIAT, por la toma de las fotografías de microscopía electrónica de barrido y a dos evaluadores anónimos por sus valiosas sugerencias que contribuyeron a mejorar el manuscrito final. Este estudio fue co-financiado por el Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural.

### Literatura citada

ALONZO-PADILLA, F. 1984. El problema de la broca (*Hypothenemus hampei* Ferrari) (Coleoptera: Scolytidae) y la caficultura.

- Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura. 242 p.
- ALVAREZ, J.H.; CORTINA, H. 2004. ¿Presenta partenogénesis *Hypothenemus hampei* (Coleoptera:Curculionidae: Scolytinae)? Fitotecnia Colombiana 4(1): 107-111.
- ARCILA, J.P. 2007. Factores que determinan la productividad del cafetal. Capítulo 3, pp. 62-86. En: Arcila, J.P.; Farfán, F.; Moreno, A.; Salazar, L.F.; Hincapié, E. (eds.) Sistemas de producción de café en Colombia. FNC- Cenicafé, Chinchiná (Colombia). 309 p.
- BARRERA, J.F.; GOMEZ, J.; ALAUZET, C. 1995. Can the coffee berry borer (*Hypothenemus hampei*) reproduce by parthenogenesis? Entomologia Experimentalis et Applicata 77: 351-354.
- BASSAM, B. J.; ANOLLÉS, G. C.; GRESSHOFF, P. M. 1991. Fast and sensitive silver staining of DNA in polyacrylamide gels. Analytical Biochemistry 196: 80-83.
- BEARDSLEY, J.W. 1990. *Hypothenemus obscurus* (Fabricius) (Coleoptera: Scolytidae), a new pest of macadamia nuts in Hawaii. Proceedings of the Hawaiian Entomological Society 30: 147-150.
- BENAVIDES, P. 2008. Aspectos genéticos relacionados con la Broca del Café, *Hypothenemus hampei* (Ferrari), Capítulo 17, pp. 284 -297. Editor A. E. Bustillo P. En: Los insectos y su manejo en la caficultura colombiana. FNC - Cenicafé, Chinchiná (Colombia). Editorial Blanecolor Ltda., Manizales, 466 p.
- BORSA, P.; KJELLBER, G. F. 1996. 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.; STUART, J.; GAUDICHON, V.; ARONSTEIN, K.; FRENCH-CONSTANT, R.H. 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 (21): 9861-9865.
- BUSTILLO, A. E. 2006. Una revisión sobre la Broca del Café, *Hypothenemus hampei* (Coleoptera: Curculionidae: Scolytinae). Revista Colombiana de Entomología 32 (2): 101-116.
- BUSTILLO, A. E. 2008. La Broca del Café, pp. 387-418. Editor A. E. Bustillo. En: Los Insectos y su manejo en la caficultura colombiana. FNC- Cenicafé, Chinchiná (Colombia) Editorial Blanecolor Ltda, Manizales, 466 p.
- CAMARGO, M.; DUQUE-CORREA, M.A.; BERRÍO, A. 2006. A micro-spreading improvement for spermatogenic chromosomes from Triatominae (Hemiptera-Reduviidae). Memorias do Instituto Oswaldo Cruz 101 (3): 339-340.
- DUQUE, H.; CHAVES, B. 2000. Estudio sobre la adopción del manejo integrado de la Broca del Café. Cenicafé, Chinchiná, Colombia. 90 p.
- JONES, V.P.; BURNAB-LARISH, L.; CAPRIO, L.C. 1992. Effect of harvest interval and cultivar on damage to macadamia nuts caused by *Hypothenemus obscurus* (Coleoptera: Scolytidae). Journal of Economic Entomology 85 (5): 1878-1883.
- KIRKENDALL, L. R. 1993. Ecology and evolution of biased sex ratios in bark and ambrosia beetles, pp. 235-345. En: Wreath, D. L.; Mercedes, A. E. (eds). Evolution and Diversity of Sex Ratio in Insects and Mites. Chapman & Hall. New York. USA. 630 p.
- MABLE, B. K.; OTTO, S. P. 1998. The evolution of life cycles with haploid and diploid phases. BioEssays 20: 453-462.
- MONTOYA, A. S. 1992. Ciclo de vida de la broca *Hypothenemus hampei* sobre frutos en diferentes estados de desarrollo. Universidad Nacional de Colombia, Facultad de Agronomía. 78 p. (Tesis: Ingeniero Agrónomo).
- MONTOYA, A.S.; CARDENAS, R. 1994. Biología de *Hypothenemus hampei* (Ferrari) en frutos de café de diferentes edades. Revista Cenicafé 45: 5-13.
- MUÑOZ, R. 1989. Ciclo biológico y reproducción partenogénica de la broca del fruto del caféto *Hypothenemus hampei* (Ferrari). Turrialba 39 (3): 415-421.
- NELSON-REES, W. A.; HOY, M. A.; ROUSH, R. T. 1980. Heterochromatinization, chromatin elimination and haploidization in the parahaploid mite *Metaseiulus occidentalis* (Nesbitt) (Acarina: Phytoseiidae). Chromosoma 77: 263-276.
- NORMARK, B. B.; JORDAL, B. H.; FARRELL, B. D. 1999. Origin of a haplodiploid beetle lineage. Proceedings of the Royal Society of London Biological series 266: 2253-2259.
- NUR, U. 1980. Evolution of unusual chromosome system in scale insects (Coccoidea: Homoptera), pp. 97-117. En: Blackman, R. L.; Hewitt, G. M.; Ashburner, M. (eds). Insect Cytogenetics. Xth Symposia of the Royal Entomological Society of London. Blackwell Scientific Publications. Oxford. UK. 437 p.
- O'NEILL, S.L.; HOFFMANN, A. A.; WERREN, J. H. 1997. Influential passengers: inherited microorganisms and arthropod reproduction. Oxford University Press, New York. 214 p.
- PERROT-MINNOT, M. J.; LAGNEL, J.; MIGEON, A.; NAVAJAS, M. 2000. Tracking paternal genes with DALP markers in a pseudoarrhenotokous reproductive system: biparental transmission but haplodiploid-like inheritance in the mite *Neoseiulus californicus*. Heredity 84: 702-709.
- PORTILLA, M. 1999. Desarrollo y evaluación de una dieta artificial para criar masivamente *Hypothenemus hampei* (Coleoptera: Scolytidae). Cenicafé 50 (1): 24-38.
- ROUSSET, F.; BOUCHON, D.; PINTUREAU, B.; JUCHAULT, P.; SOLIGNAC, M. 1992. *Wolbachia* endosymbionts responsible for various alterations of sexuality in arthropods. Proceedings of the Royal Society Biological Sciences 250 (1328): 91-98.
- RUBIO, J. D. 2003. Aspectos morfológicos de la Broca del Café *Hypothenemus hampei* (Ferrari) (Coleoptera: Scolytidae), una búsqueda de estructuras de mycangia. Universidad de Caldas, Facultad de Ciencias Agropecuaria. 182 p (Tesis: Ingeniero Agrónomo).
- SCHWARZACHER, T.; AMBROS, P.; SCHWEIZER, D. 1980. Application of Giemsa banding to orchid karyotype analysis. Plant Systematics and Evolution 134: 293-297.
- SCHULTEN, G. G. 1985. Pseudoarrhenotoky, pp. 67-71. En: Helle, W.; Sabelis M. W. (eds). Spider Mites, Their Biology, Natural Enemies and Control World Crop Pests. Vol. 1B. Elsevier. Amsterdam. Holanda. 458 p.
- VEGA, F.E.; BENAVIDES, P.; STUART, J.; O'NEILL, S. 2002. *Wolbachia* infection in the coffee berry borer (Coleoptera: Scolytidae). Annals of the Entomological Society of America 95:374-378.
- VEGA, F.; 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.
- VELEZ, R.A. 1997. *Hypothenemus hampei* (Ferrari) Coleoptera: Scolytidae, pp. 169-181. En: Plagas Agrícolas de Impacto económico en Colombia: Bionomía y manejo integrado. Editorial Universitaria de Antioquia. Medellín. Colombia. 455 p.
- VILLEGAS, C. 1998. Manejo de insectos y ácaros asociados a las estructuras reproductivas de la macadamia. Cenicafé, Avances Técnicos No. 250. Chinchiná. Colombia. 8 p.
- VILLEGAS, C.; SANCHEZ, W. 2008. Estudio de los hemipteros plaga en el cultivo de la macadamia. Sus enemigos naturales y alternativas de manejo. FNC- Cenicafé, Chinchiná (Colombia) Editorial Blanecolor Ltda, Manizales, 32 p.
- VILLACORTA, A.; BARRERA, J. 1993. Dieta meridica para criação de sucesivas geracoes de *Hypothenemus hampei* (Ferrari) (Coleoptera: Scolytidae). Anais da Sociedade Entomológica do Brasil 14(2):316-319.
- VOS, P.; HOGERS, R.; BLEEKER, M.; REIJANS, M.; VAN DE LEE, T.; HORNES, M.; FRIJTERS, A.; POT, J.; PELEMAN, J. 1995. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. Nucleic Acids Research 23 (21): 4407- 4414.
- WOOD, S.L. 2007. Bark and Ambrosia Beetles of South America (Coleoptera: Scolytidae). Monte L. Bean Science Museum, Brigham Young University, Provo, Utah. 900 p.