CENTRO UNIVERSITÁRIO UNIVATES
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO *STRICTO SENSU*
MESTRADO EM BIOTECNOLOGIA

CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA, MOLECULAR E COMPATIBILIDADE REPRODUTIVA DE *Panonychus ulmi* (Acari: Tetranychidae) PROVENIENTE DE MACIEIRAS E VIDEIRAS

Joseane Moreira do Nascimento

Lajeado, março de 2016

Joseane Moreira do Nascimento

CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA, MOLECULAR E COMPATIBILIDADE REPRODUTIVA DE *Panonychus ulmi* (Acari: Tetranychidae) PROVENIENTE DE MACIEIRAS E VIDEIRAS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, do Centro Universitário UNIVATES, como parte da exigência para a obtenção do grau de Mestre em Biotecnologia, área de concentração Biotecnologia Agroalimentar, linha de pesquisa Biotecnologia na Produção Primária de Alimentos.

Orientador: Dr. Noeli Juarez Ferla
Coorientadora: Dra. Liana Johann

Lajeado, março de 2016

Joseane Moreira do Nascimento

CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA, MOLECULAR E COMPATIBILIDADE REPRODUTIVA DE *Panonychus ulmi* (Acari: Tetranychidae) PROVENIENTE DE MACIEIRAS E VIDEIRAS

A Banca examinadora abaixo aprova a Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, do Centro Universitário UNIVATES, como parte da exigência para a obtenção do grau de Mestre em Biotecnologia, na área de concentração Biotecnologia Agroalimentar.

Prof. Dr. Noeli Juarez Ferla - Orientador
Centro Universitário UNIVATES

Profa. Dra. Liana Johann - Coorientadora
Centro Universitário UNIVATES

Prof. Dr. Raul Antônio Sperotto
Centro Universitário UNIVATES

Profa. Dra. Claudete Rempel
Centro Universitário UNIVATES

Dra. Renata Santos de Mendonça
FUNAPE - Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

Lajeado, março de 2016

Dedico este trabalho aos meus pais, Antônio e Neuza, minha irmã Diane e ao esposo Romeu, pelo amor, incentivo e apoio em todas minhas escolhas e decisões.

AGRADECIMENTOS

Ao Professor Dr. Noeli Juarez Ferla, meu orientador, pela disponibilidade em me orientar, pelo incentivo para pesquisa e realização do mestrado e pelo apoio e confiança para realização do trabalho no Laboratório de Acarologia;

À Professora Dra. Liana Johann, pelo apoio desde o primeiro dia até o último, em qualquer dia e horário, sempre disposta a me passar confiança e acreditar que tudo daria certo e por disponibilizar material para o desenvolvimento do projeto;

À todos os Professores do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da UNIVATES pelos ensinamentos e pela colaboração no desenvolvimento do trabalho;

Às pesquisadoras Dra. Denise Navia e Dra. Renata Santos de Mendonça, pelo apoio e disponibilidade na realização do estágio na Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Agradeço em especial à Dra. Renata pelos ensinamentos, atenção e auxílio constantes, ao Dr. Marcelo Lopes da Silva pela orientação do estágio, Dr. Norton Polo Benito pelo auxílio nas análises estatísticas e Dra. Abi Marques pelo auxílio no método de criação em folhas de videira e aos demais integrantes da equipe Cenargen pela amizade e acolhida durante o estágio.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e Centro Universitário UNIVATES pela concessão da bolsa, que proporcionou dedicação exclusiva no desenvolvimento do projeto;

Aos colegas do Laboratório de Acarologia pelo auxílio nos experimentos, troca de ideias e construção do conhecimento, em especial às colegas Darliane Evangelho Silva, Malena Senter e Andréia Brentano, pela amizade, apoio e consolo nos momentos difíceis e ao colega Maicon Toldi por ser o motorista das coletas e pelas longas conversas no caminho;

À estagiária Franciele Sonaglio pela ajuda fundamental durante e até mesmo

após o estágio, além da amizade construída neste período;

À Morgane Toigo do Nascimento de Vacaria (RS) e à Vinícola Miolo por disponibilizarem o local para as coletas em campo;

Aos pesquisadores Dr. Tetsuo Gotoh do Japão, Dr. Ken Pringle da África do Sul, Dr. Serge Kreiter da França (Montpellier SupAgro), Dr. Roberto Trincado do Chile e Dr. Hans Klompen dos Estados Unidos pela disponibilidade das coletas e envio das amostras para análise molecular;

Aos afilhados Pedro Henrique, Isabel, Miguel e Isadora por serem meu incentivo e responsáveis pelos momentos de descontração e pela compreensão nas ausências em momentos importantes de vocês;

Às amigas e amigos Raquel Bagatini, Letícia Merlo, Roseli Citron, Jacira Turatti, Luiza Fontana, Salete Castoldi, Silvia De Conto, Nádia Giacomolli, Camila Beckmann, Debora Togni, Micheli e Carlos Bagatini pela amizade de uma vida inteira e compreensão das ausências e falta de tempo para estar com vocês;

Às amigas que o mestrado me trouxe, obrigada por compreenderem e dividirem as angústias;

À toda minha família, pelo amor constante mesmo à distância, e por saber que mesmo longe, vocês estarão sempre ao meu lado. Aos meus pais Antônio e Neuza Nascimento e minha irmã Diane pelo amor incondicional, em todas as fases do mestrado e pela paciência nas horas difíceis. Vocês são a minha vida!

Ao meu esposo Romeu Cornelius Junior, por ser essa pessoa fundamental em minha vida e minha trajetória, por entender minhas ausências, me apoiar nos maiores desafios e nas angústias, por estar sempre disponível para me amar e consolar e por ser meu companheiro de todas as horas. Te amo muito!

À Deus por me dar saúde para enfrentar os desafios, serenidade para entendê-los e superá-los e por colocar as pessoas certas em meu caminho.

Agradeço sinceramente e infinitamente a todos.

RESUMO

Panonychus ulmi (Koch) (Acari: Tetranychidae) é um ácaro fitófago que causa danos ao cultivo de macieiras e recentemente foi encontrado em videiras no estado do Rio Grande do Sul, Brasil. A presente dissertação de mestrado teve como objetivo verificar a ocorrência de biótipos associados a estes dois hospedeiros, realizada pela caracterização morfológica, molecular e verificação da compatibilidade reprodutiva. A caracterização morfológica ocorreu através de medições de fêmeas de 17 áreas de amostragem, sendo dez de videiras e sete de macieiras, sendo que se obteve sobreposição das populações de macieiras e videiras na análise dos componentes principais. Para caracterização molecular, foram analisados três fragmentos: a região intergênica ITS do DNA ribossômico e dois fragmentos do gene *citocromo c oxidase I* (COI) do DNA mitocondrial. Os resultados para *COI* demonstraram a ocorrência de linhagens distintas em macieiras e videiras. A divergência intraespecífica foi baixa, 1,1%, indicando tratar-se de uma mesma espécie. Para verificação da compatibilidade reprodutiva, foram realizados cruzamentos entre uma população de macieiras proveniente de Vacaria (RS) e uma população de videiras proveniente de Bento Gonçalves (RS). Foram realizados cruzamentos e retrocruzamentos, nos quais se observou diferença significativa no potencial reprodutivo da população proveniente de macieiras, embora tenha havido compatibilidade reprodutiva entre as populações analisadas. Os resultados indicaram que as populações de *Panonychus ulmi* proveniente de macieiras e videiras consistem em uma mesma espécie, e sugeriram a ocorrência de biótipos ou *host race* ligada ao hospedeiro, com melhor desempenho em macieiras. Os resultados obtidos demonstraram a importância da caracterização de biótipos, pois estas informações são essenciais para o planejamento e aplicação em programas de controle biológico nas culturas avaliadas, ao nível de campo.

Palavras-chave: Ácaro vermelho europeu, biótipos, *host races*, controle biológico.

ABSTRACT

Panonychus ulmi (Koch) (Acari: Tetranychidae) is a phytophagous mite that causes damage to apple orchards and was recently found on vines in the state of Rio Grande do Sul, Brazil. This dissertation aimed to verify the occurrence of biotypes associated with these two hosts, conducted by morphological, molecular and verification of reproductive compatibility. The morphological characterization was carried out through measurements of females from 17 sampling areas, ten on vines and seven on apple trees, and obtained complete overlap of populations of apple trees and vines in principal components analysis. For molecular characterization, we analyzed three fragments: the intergenic region (ITS) of the ribosomal DNA and two fragments of the gene *cytochrome c oxidase I* (COI) of the mitochondrial DNA. The results for COI demonstrated the occurrence of different strains on apples and vines. The intraspecific divergence was low, 1.1%, indicating the presence of the same species. To verify the reproductive compatibility were performed crosses between a population of apple trees from Vacaria (RS) and a population of vines from Bento Gonçalves (RS). Crosses and backcrosses were performed, in which significant difference was observed in the reproductive potential of population from apple trees, although there were reproductive compatibility between populations analyzed. The results indicated that the populations of *Panonychus ulmi* from apple trees and vines consist in the same species, and suggested the occurrence of biotypes or host race connected to the host, with better performance in apple trees population. The results showed the importance of characterization of biotypes, as this information is essential for planning and application in biological control programs to crops evaluated at the field level.

Key words: European red mite, biotypes, host races, biological control.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Fêmea de *Tetranychus urticae,* vista dorsal 19

Figura 2 – Fêmea de *Panonychus ulmi*.....21

Figura 3 – Fêmea de *Panonychus citri* 21

Figura 4 – *Panonychus ulmi* em diferentes fases móveis: A – Larva; B – Protoninfa; C – Deutoninfa; D – Fêmea adulta; E – Macho adulto e F – Dimorfismo sexual entre macho adulto (esquerda) e fêmea adulta (direita). 22

Figura 5 – Ovos de inverno de *P. ulmi*.....23

Figura 6 – Ovos de verão de *P. ulmi* 23

Figura 7 – Fêmea de *Tetranychus evansi*, vista dorsal 26

Figura 8 – Vista dorsal das setas do corpo de *P. ulmi*.....34

Figura 9 – Vista ventral das setas do corpo de *P. ulmi* 34

Figura 10 – Vista dorsal de fêmea adulta de *Panonychus ulmi*, apresentando a coloração do corpo e as setas dorsais inseridas em tubérculos brancos. 47

Figura 11 – Plotagem da comparação dos resultados das medições das características responsáveis pela maior variação na análise dos componentes principais, das populações de *Panonychus ulmi* de videiras (código 1) e macieiras (código 2). 61

Figura 12 – Padrão de bandas visualizadas em gel de agarose 1% após a PCR para os fragmentos ITS, *COI* Navajas e *COI* Folmer de *Panonychus ulmi*. 64

Figura 13 – Árvore filogenética ML (Tamura 3 parâmetros) inferida a partir de sequências de *COI* (LCO1490 e HCO2198) de *Panonychus ulmi* obtidas nesse

estudo. O número de vezes que cada haplótipo foi encontrado nas amostras está entre parênteses. Os valores de *bootstrap* estão localizados sobre os ramos.....69

Figura 14 – Árvore filogenética ML (Tamura 3 parâmetros) inferida a partir de sequências de *COI* (C1J1718 e 773) de *Panonychus ulmi* obtidas nesse estudo. O número de vezes que cada haplótipo foi encontrado nas amostras está entre parênteses. Os valores de *bootstrap* estão localizados sobre os ramos.....75

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Relação das populações de *Panonychus ulmi* de macieiras e videiras analisadas na caracterização morfológica, código da população e código na análise morfológica, hospedeiros, locais, datas e coordenadas geográficas das coletas. 35

Tabela 2: Abreviação e descrição detalhada das estruturas analisadas na caracterização morfológica de *Panonychus ulmi*. 36

Tabela 3 - Relação das populações de *Panonychus ulmi* analisadas na caracterização molecular, código da população, hospedeiros, locais, datas e coordenadas geográficas das coletas. 38

Tabela 4 - Fragmentos amplificados e *primers* utilizados nas reações de PCR e no sequenciamento do DNA nuclear e mitocondrial dos espécimes de *Panonychus ulmi* analisados. 41

Tabela 5 – Valores médios ($\bar{x}$) em micrômetros (µm), desvio padrão (DP), valores mínimos (min) e máximos (max) dos caracteres morfológicos avaliados nas populações de *Panonychus ulmi* provenientes de macieiras e videiras. 49

Tabela 6 - Percentual de variação encontrado através de ACP (análise dos componentes principais) através de análise das setas dorsais e conjunto de setas h. 60

Tabela 7 - Quantidade de DNA estimada em espectrofotômetro Nanodrop 2000 valores da relação 260/280 por amostra analisada após extração de DNA de *Panonychus ulmi.* 65

Tabela 8 – Identificação dos haplótipos e distribuição das amostras de *Panonychus ulmi* em cada haplótipo, com hospedeiros e locais de coleta, baseada na análise de sequências *COI* de Folmer obtidas, incluídos os grupos interno e externo. 67

Tabela 9 - Distâncias dentro dos grupos e entre os grupos com base nas sequências de *COI* Folmer, incluindo os grupos interno e externo. 71

Tabela 10 - Identificação dos haplótipos e distribuição das amostras de *Panonychus ulmi* em cada haplótipo, com hospedeiros e locais de coleta, baseada na análise de sequências *COI* de Navajas obtidas, incluídos os grupos interno e externo. 72

Tabela 11 - Distâncias dentro dos grupos e entre os grupos com base nas sequências de *COI* Navajas, incluindo os grupos interno e externo. 76

Tabela 12 - Percentual de oviposição, número total de ovos por cruzamento, dias de oviposição por fêmea, número de ovos/fêmea/ dia, viabilidade dos ovos, razão sexual e taxa de sobrevivência dos cruzamentos de *Panonychus ulmi* de macieiras e videiras. 81

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACP – Análise dos Componentes Principais

CENARGEN - Centro Nacional de Pesquisa de Recursos Genéticos e Biotecnologia

COI - *Citocromo c oxidase* I

DNA - *Deoxyribonucleic Acid*

EMBRAPA - Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária

ITS - *Internal Transcribed Spacer*

ML - *Maximum-Likelihood*

mtDNA – DNA mitocondrial

NCBI - *National Center for Biotechnology Information*

NJ - *Neighbor Joining*

PCR - *Polymerase Chain Reaction*

rDNA – DNA ribossômico

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 16
2 REFERENCIAL TEÓRICO 18
2.1 Ácaros 18
2.1.1 Tetranychidae 19
2.2 Cultura de macieiras e videiras no Brasil 20
2.3 *Panonychus ulmi* (Koch) 21
2.4 Identificação e disseminação de ácaros 25
2.5 Caracterização morfológica 27
2.6 Caracterização molecular 28
2.7 Compatibilidade reprodutiva 31
3 PROCEDIMENTOS METODOLÓGICOS 33
3.1 Caracterização morfológica 33
3.2 Caracterização molecular 38
3.2.1 Alinhamento das sequências 43
3.2.2 Análises filogenéticas 43
3.2.3 Distância genética 44
3.3 Compatibilidade reprodutiva 45
3.3.1 Criações estoque de *Panonychus ulmi* 45
3.3.2 Testes de cruzamentos 46
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO 47
4.1 Caracterização morfológica 47
4.2 Caracterização molecular 64

4.2.1 Fragmento do gene *COI* de Folmer 66
4.2.2 Fragmento do gene *COI* de Navajas.....71
4.3 Compatibilidade reprodutiva 81
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS 89
REFERÊNCIAS.....91

1 INTRODUÇÃO

Panonychus ulmi (Koch) (Acari: Tetranychidae), também conhecido como ácaro vermelho europeu, é um ácaro fitófago associado ao cultivo de macieiras, responsável por danos expressivos nesta cultura. Apesar de também ser encontrado em videiras em diversos locais do mundo, apenas em 2006 foi relatado em videiras no Rio Grande do Sul, Brasil. Nos anos seguintes, esteve relacionado entre os principais agentes causadores de danos em algumas cultivares de videiras do país.

Devido ao fato de já ter sido encontrado em macieiras no mesmo estado anteriormente e pela proximidade geográfica das áreas de cultivo de macieiras e videiras na região da Serra Gaúcha, sugere-se a adaptação a um novo hospedeiro ou a introdução através de trânsito de material vegetativo contaminado. A existência de biótipos distintos associados a macieiras e videiras é uma possibilidade, visto que em campo observou-se um desempenho reprodutivo diferente.

Os tetraniquídeos são reconhecidos por sua capacidade de adaptação a acaricidas e a novos hospedeiros. Devido à proximidade entre as regiões produtoras de maçã e de uva na Serra Gaúcha, o cruzamento entre os possíveis biótipos provenientes das duas culturas poderia aumentar a variabilidade genética e consequentemente a resistência a acaricidas, dificultando o controle e o manejo de *P. ulmi*, nas culturas de macieiras e videiras. Além disso, a importância de se conhecer o comportamento deste ácaro em cruzamentos entre espécimes provenientes de duas culturas diferentes consiste no entendimento do potencial de invasão dessa espécie, e aprimoramento dos programas de controle biológico aplicado.

Através do controle biológico, é possível reduzir os custos produtivos, melhorar a qualidade de vida dos produtores, dos alimentos produzidos e de seus derivados, pois atualmente ocorre uma maior procura por produtos sem resíduos de pesticidas. O presente estudo possui relevância, pois é necessário identificar e distinguir corretamente as espécies de ácaros que atingem as lavouras e pomares das mais diversas culturas, como no caso específico de *P. ulmi*, para que seja possível desenvolver programas de controle biológico eficientes deste ácaro em macieiras e videiras.

Este trabalho teve como objetivo verificar a ocorrência de biótipos distintos de *P. ulmi* provenientes de macieiras e videiras, através de caracterização morfológica, molecular e verificação da compatibilidade reprodutiva entre indivíduos provenientes de ambas as culturas. Possui abrangência mundial, caráter científico, tecnológico e inovador, visto que não foram publicados até o momento trabalhos sobre *P. ulmi* com relação à comparação entre indivíduos provenientes dos dois hospedeiros estudados e quanto à ocorrência de biótipos distintos desta espécie.

A caracterização morfológica ocorreu através de medições de fêmeas de 17 populações, sendo dez de videiras e sete de macieiras; a caracterização molecular pelo sequenciamento da região intergênica ITS do DNA ribossômico e de dois fragmentos do gene *COI* do DNA mitocondrial de fêmeas de 19 populações, provenientes de videiras do Rio Grande do Sul e macieiras do Rio Grande do Sul, Santa Catarina, África do Sul, Chile, Estados Unidos, Japão e Marrocos; e verificação da compatibilidade reprodutiva, através de testes de cruzamentos entre machos e fêmeas de *Panonychus ulmi* de macieiras da cultivar Gala, de Vacaria (RS) e videiras da cultivar Merlot, de Bento Gonçalves (RS).

Serão apresentados os resultados de acordo com os testes realizados, caracterização morfológica e molecular e compatibilidade reprodutiva, e estes resultados fornecerão subsídios para um melhor manejo deste ácaro em campo.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Ácaros

A subclasse Acari inclui os ácaros e carrapatos, um grupo muito diversificado de quelicerados que difere dos demais pela divisão corporal e por não apresentar segmentação aparente (KRANTZ, 2009). Os ácaros podem ser predadores, alimentar-se de microrganismos, matéria orgânica em decomposição, diferentes partes vegetais ou parasitarem vertebrados e invertebrados. São encontrados em ecossistemas terrestres e aquáticos (FLECHTMANN, 1975).

Prostigmata e Mesostigmata compreendem os ácaros relacionados com as culturas de plantas de maior importância econômica (EVANS, 1992). Entre os Prostigmata estão os fitófagos Tarsonemidae, Tenuipalpidae, Eriophyidae e Tetranychidae (JEPPSON et al., 1975) e entre os predadores de fitófagos pertencentes à Mesostigmata, destacam-se os Phytoseiidae como o principal grupo (DEMITE et al., 2014).

Os ácaros fitófagos alimentam-se por exsudação do fluido celular vegetal, utilizando peças bucais com estruturas adaptadas denominadas estiletes (WALTER; PROCTOR, 1999), inserindo-os no tecido da folha e removendo o conteúdo da célula, resultando na destruição dos cloroplastos, perda de clorofila e redução da taxa fotossintética. Estas lesões podem danificar processos fisiológicos da planta, levando a alterações na intensidade do crescimento, floração e rendimento (TOMCZYK; KROPCZYNSKA, 1985).

Os danos causados na planta são influenciados pela interação de fatores

como a cultivar, o vigor da planta, a densidade populacional, o tempo de alimentação, tempo da colheita e as condições climáticas (MARINI et al., 1994).

2.1.1 Tetranychidae

Os tetraniquídeos são fitófagos que tecem teias sobre as folhas das quais se alimentam, conhecidos também na literatura como "*spider mites*". Adaptam-se facilmente a diversos hospedeiros e possuem variações na coloração do corpo, sendo que no Brasil, seis espécies possuem importância econômica (MORAES; FLECHTMANN, 2008).

Entre os ácaros fitófagos pertencentes à Tetranychidae, *Tetranychus urticae* (Koch), conhecido como "ácaro-rajado" (Figura 1), é a espécie mais polífaga, alimentando-se de mais de 1.000 espécies diferentes de plantas das mais diversas variedades, sendo esta uma característica única entre os artrópodes (DORKELD; MIGEON, 2013). É conhecido também por sua capacidade de desenvolver resistência a acaricidas (VAN LEEUWEN et al., 2010).

Figura 1 – Fêmea de *Tetranychus urticae,* vista dorsal

Fonte: http://www.promip.agr.br/pragas_interna.php?cID=2

A facilidade de adaptação e mudança de hospedeiros tem colaborado para sua disseminação (YANINEK; MORAES, 1991). Pode ser originário da Eurasia, pois ocorre em grande quantidade e variedade de hospedeiros na região, e pode ter se disseminado para diversos lugares do mundo através da ação dos ventos e do homem e pelo transporte de plantas (NAVAJAS, 1998).

Esta capacidade de adaptação a novos hospedeiros pode favorecer o aparecimento de biótipos, que são populações com características biológicas particulares, em virtude do isolamento reprodutivo (BUSH, 1975).

2.2 Cultura de macieiras e videiras no Brasil

O Brasil é um dos dez maiores produtores de maçã do mundo, com uma produção anual de mais de um milhão de toneladas. Os estados do Rio Grande do Sul (RS) e de Santa Catarina (SC), apresentam características ambientais favoráveis à cultura, destacando-se os municípios de Fraiburgo (SC) e Vacaria (RS) como referência no setor, que produziu na safra de 2014 1,16 milhão de toneladas, distribuídas em 36 mil hectares de pomares (KIST, 2015).

Além da produção de maçãs, no estado do Rio Grande do Sul destaca-se também a vitivinicultura. Possui grande importância econômica, sendo a produção na safra 2013-2014 de 507,84 milhões de litros de vinhos, sucos e derivados (MELLO, 2015). O cultivo de videiras está presente em muitas regiões do mundo (SOUSA, 1996). É uma atividade econômica recente no Brasil, no qual o Rio Grande do Sul é o principal produtor, representando em torno de 95% do total de uvas processadas (MELLO, 2003). Deste total, aproximadamente 90% destina-se à agroindústria para produção de derivados da uva, como vinhos e sucos (MELLO, 2008). *Vitis vinifera* L., também conhecida como videira europeia, inclui as cultivares que apresentam as melhores características para vinhos (SOUSA, 1996).

Os produtos utilizados para controle de pragas e doenças nestas culturas tornam-se um problema, pois afetam as populações dos inimigos naturais, causam contaminação ambiental e deixam resíduos nas frutas e em seus derivados, tornando-se fundamental a implantação de um sistema de manejo integrado eficaz (KOVALESKI et al., 2000).

Em um sistema de manejo integrado, as pragas são monitoradas diretamente no pomar, visando estabelecer o melhor momento para seu controle, sendo importante o conhecimento do ciclo de vida dos agentes causadores dos danos econômicos e também dos predadores, etapa importante para a implantação do controle biológico (PINTO JR. et al., 2005).

No Brasil, mais de 20 espécies de ácaros fitófagos causam danos a plantas cultivadas, gerando interesse e a necessidade de se conhecer estes organismos, para se poder reduzir os danos por eles causados (MORAES; FLECHTMANN, 2008). Estes ácaros perfuram as células vegetais e alimentam-se do seu conteúdo citoplasmático (ANDRADE et al., 2011). Entre as espécies acarinas fitófagas que se destacam, *Panonychus ulmi* (Koch) (Acari: Tetranychidae) possui importância pelos

prejuízos causados em macieiras (*Malus* sp.) e videiras (*Vitis* spp.) (RODRIGUES, 2005).

2.3 *Panonychus ulmi* (Koch)

Duas espécies no gênero *Panonychus* são de maior interesse econômico devido aos danos causados: *Panonychus ulmi* (Figura 2) e *Panonychus citri* (McGregor) (Figura 3) (JEPPSON et al., 1975).

Figura 2 – Fêmea de *Panonychus ulmi*

Figura 3 – Fêmea de *Panonychus citri*

Fonte: https://www1.montpellier.inra.fr/CBGP/spmweb/gallery.php?gallery=gallery

Panonychus ulmi foi descrito inicialmente por Koch no ano de 1835 como *Tetranychus ulmi* (BLAIR; GROVES, 1950). Posteriormente, com a reorganização dos grupos, foi incluído no gênero *Panonychus,* recebendo a nomenclatura atual. Tem como hospedeiros principais frutíferas e arbustos da família Rosaceae (BAKER; TUTTLE, 1994; BOLLAND et al., 1998)

O ciclo de vida se caracteriza pela fase de ovo e por mais quatro fases móveis: larva (Figura 4-A), protoninfa (Figura 4-B), deutoninfa (Figura 4-C) e adulto. Machos e fêmeas passam pelas mesmas fases de desenvolvimento, apresentando dimorfismo sexual (Figura 4-F) entre a fêmea adulta (Figura 4-D) e o macho adulto (Figura 4-E).

Em cada fase, o ácaro passa por um período onde se alimenta intensamente, passa por um período de repouso, seguido da ecdise. Altas temperaturas e clima seco favorecem sua reprodução e multiplicação (CUTHBERTSON; MURCHIE, 2005).

Figura 4 – *Panonychus ulmi* em diferentes fases móveis: A – Larva; B – Protoninfa; C – Deutoninfa; D – Fêmea adulta; E – Macho adulto e F – Dimorfismo sexual entre macho adulto (esquerda) e fêmea adulta (direita).

Figura 4 – A

Figura 4 – B

Figura 4 – C

Figura 4 – D

Figura 4 – E

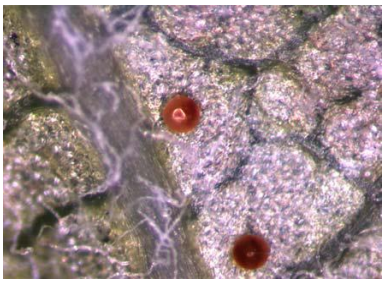
Figura 4 – F

Fonte: Acervo Laboratório de Acarologia UNIVATES

Os ovos podem ser de dois tipos: ovos de inverno (Figura 5), de coloração laranja dos quais eclodem as primeiras gerações anuais e ovos de verão (Figura 6), de coloração vermelha e destes eclodindo as demais gerações (RODRIGUES, 2005). Os ovos de inverno são depositados predominantemente nos galhos da planta e são diapáusicos, enquanto os ovos de verão são colocados nas folhas da planta sem interrupção. O tipo de ovo a ser colocado é regulado pelo fotoperíodo, temperatura e estado nutricional da fêmea (CUTHBERTSON; MURCHIE, 2010).

Figura 5 – Ovos de inverno de *P. ulmi*

Figura 6 – Ovos de verão de *P. ulmi*



Fonte: Rodrigues, 2005, p. 13 e 14.

As formas móveis de *Panonychus ulmi* perfuram as células da planta com os estiletes e o conteúdo celular é exsudado devido à pressão de turgescência. Nos locais onde se alimenta formam-se pontos regulares, e quando aglutinam-se, surgem áreas cloróticas características denominadas como bronzeamento das folhas (CUTHBERTSON; MURCHIE, 2010).

Populações elevadas de *P. ulmi* podem levar ao bronzeamento e queda prematura das folhas e a produção de frutos pequenos e com coloração alterada (HUFFAKER et al., 1969). Em longo prazo, estes danos reduzem o acúmulo de nutrientes e os danos persistem na temporada seguinte de cultivo das frutas (BOTHA et al., 2005). Entretanto, são poucas as informações disponíveis na literatura, até o momento, quantificando os dados causados por *P. ulmi* em macieiras e videiras. A única informação encontrada foi de macieiras com populações de 100 ou mais ácaros/folha representando perdas de 40 a 65% de produção na Ucrânia (BULGAK, 1979).

Esta espécie atinge o nível de dano econômico na cultura da maçã em pomares de todo o mundo (YIN et al., 2013). No Brasil, o primeiro registro em maçãs de procedência argentina foi realizado por Flechtmann (1967). Em 1972, Bleicher (1974) observou em um pomar de maçã em Fraiburgo (SC) grande infestação de ácaros identificados como *P. ulmi*, sendo este o primeiro relato da espécie no Brasil (FERREIRA, 1997), onde é considerado uma das principais pragas de rosáceas. O primeiro registro em videiras no Brasil foi realizado por Ferla e Botton (2008), na cultivar Merlot em Bento Gonçalves, RS, safra 2005-2006. Em 2006, o segundo registro em *Vitis vinifera* foi relatado por Mendonça (2009), em Pirapora, MG.

Este fitófago, conhecido pelo dano causado em macieiras e videiras na Europa, foi relatado como importante praga na cultura de videira desde seu primeiro

relato, sendo registrada novamente por Johann et al. (2009) como a espécie fitófaga mais abundante nas cultivares Cabernet Sauvignon e Pinot Noir, na safra 2006-2007, no município de Bento Gonçalves.

A ocorrência de altas infestações de *P. ulmi* em videiras causa manchas na face superior das folhas com aspecto de bronzeamento e queda prematura destas (FERLA; BOTTON, 2008). Em macieiras, as folhas apresentam aspecto prateado, passando a bronzeado, devido à morte das células (RODRIGUES, 2005). Conforme Helle e Sabelis (1985), estas lesões provocam menor atividade fotossintética e redução do acúmulo de reservas nos frutos da safra seguinte.

Panonychus ulmi não foi listado por Navia et al. (1998), em seu trabalho sobre introdução no Brasil de ácaros fitófagos associados à cultura da videira pois já havia sido relatado em macieiras, o que impediu a inclusão da espécie como sendo de importância quarentenária. Entretanto, não é conhecida a razão pela qual essa espécie não era encontrada em videiras no Brasil, visto que está presente em macieiras desde 1967. É possível que isso se deva a uma diferença biológica entre as populações que aqui ocorrem e populações encontradas na Europa, onde *P. ulmi* é considerado uma praga de videiras (MORAES; FLECHTMANN, 2008). Já em 2008, estes autores enfatizavam a necessidade de atenção para evitar a introdução da população europeia no Brasil, sendo que naquele ano Ferla e Botton (2008) relataram a presença desta espécie em videiras do Rio Grande do Sul.

A invasão de novas áreas por *P. ulmi* é favorecida por sua alta taxa reprodutiva e modo de reprodução arrenótoco (fêmeas diploides produzidas a partir de ovos fecundados e machos haploides provenientes de ovos não fertilizados), possibilitando que um pequeno número ou mesmo uma única fêmea possa iniciar uma colônia com rápido crescimento (HELLE; SABELIS, 1985). Também favorecem a dispersão o seu pequeno tamanho e a ocorrência de diapausa, através do transporte de ramos das plantas afetadas com ovos de inverno.

Com relação ao controle biológico de *P. ulmi*, o conhecimento do potencial de aumento populacional e comportamento em campo das populações de macieiras e videiras auxilia a escolha do predador correto, com comportamento adequado para o controle efetivo. Já são conhecidas espécies de predadores que realizam este controle, principalmente *Phytoseiulus persimilis* Athias-Henriot (GERSON et al., 2008) e no Brasil, a liberação periódica de *Neoseiulus californicus* (McGregor) para o

controle de *P. ulmi* em macieiras tem apresentado resultados satisfatórios (MONTEIRO, 2002).

2.4 Identificação e disseminação de ácaros

A correta identificação taxonômica é importante em todos os grupos animais e vegetais (ROSEN et al., 1978). No entanto, em acarologia, alguns grupos possuem caracteres taxonômicos limitados para diferenciação entre espécies, e o efetivo controle de pragas agrícolas depende do conhecimento do status taxonômico das espécies envolvidas (KNAPP, 2003).

Além disso, um número crescente de espécies causadoras de danos está sendo transportado para novas regiões biogeográficas a cada ano, e o conhecimento dos padrões de variação geográfica das espécies podem ser úteis na detecção de introduções acidentais (NAVAJAS et al., 1994).

São consideradas como biótipos cepas biológicas que diferem fisiologicamente dentro de espécies, são morfologicamente distintas e têm diferentes capacidades para sobreviver em plantas com diferentes genes de resistência (PAINTER, 1951).

Com relação a insetos e ácaros de importância agrícola, identificar e conhecer a existência de biótipos é fundamental para o manejo integrado (GALLO et al., 2002). O estudo de populações de fitófagos associados a hospedeiros tem implicações na resistência a acaricidas e conhecimento do fluxo gênico entre populações (FYTROU; TSAGKARAKOU, 2014). Este conhecimento também é de interesse em estudos evolutivos do processo de diferenciação genética. Mudanças no hospedeiro podem rapidamente gerar novas espécies, com isolamento reprodutivo de seus progenitores (BUSH, 1975).

O termo biótipo pode ser associado a diversos termos semelhantes, como raça biológica, subespécie, espécie críptica e raça hospedeiro especialista (*host race*). O uso de técnicas moleculares tem facilitado a distinção e variação intraespecífica entre artrópodes de modo geral (SILVA, 2005). A categoria de biótipo que necessita de uma cuidadosa definição é a de raça hospedeiro especialista (*host race*). Bush (1969) definiu este conceito como populações que demonstram preferência por um hospedeiro diferente dos hospedeiros preferenciais de outras

populações da mesma espécie. Diehl e Bush (1984) definiram o conceito mais amplamente utilizado para essa situação, que seria uma população parcialmente isolada de outras populações de mesma espécie, devido ao processo de adaptação ao hospedeiro. Esta diferença por vezes é difícil de determinar, sendo necessário definir se existe isolamento reprodutivo e o fluxo gênico entre as populações (DIEHL; BUSH, 1984).

Estas raças hospedeiro especialistas, ou *host races,* apresentam variação contínua entre formas que cruzam livremente entre si e outras que não realizam troca gênica com frequência. Nas populações que utilizam recursos alimentares diferentes, há um menor fluxo gênico do que entre populações que usam o mesmo recurso alimentar (SILVA, 2005). A formação de *host races,* que reduz a variação em nível de populações e aumenta em nível de espécies, é comum entre os ácaros devido à forte associação com hospedeiros, acasalamento associado ao hospedeiro, altas taxas reprodutivas e gerações curtas (MAGALHÃES et al., 2007). Para Drés e Mallet (2002), existem quatro critérios de detecção de raças hospedeiro especialistas: fidelidade ao hospedeiro, simpatria, diferenciação genética e fluxo gênico entre as populações.

Uma pesquisa sobre causas de surgimento de novas doenças de plantas, concluiu que 56% resultam de introduções associadas ao comércio de plantas e produtos vegetais e à circulação de pessoas (ANDERSON et al., 2004). Os ácaros são facilmente transportados dentro de mercadorias, devido ao seu tamanho. Além disso, a presença de uma única fêmea pode iniciar uma invasão, devido à partenogênese e alta taxa de reprodução (SABELIS, 1985). Um exemplo recente é a introdução de *Tetranychus evansi* (Baker & Pritchard) (Figura 7) na Europa e África. Esta espécie provavelmente nativa da América do Sul (MIGEON et al., 2009) demonstra natureza invasora na agricultura mundial (BOUBOU et al., 2012).

Figura 7 – Fêmea de *Tetranychus evansi*, vista dorsal

Fonte: https://www1.montpellier.inra.fr/CBGP/spmweb/img/tetranychusevansi.jpg

O aumento no trânsito de pessoas e mercadorias favorece internacionalmente a propagação de organismos para fora de suas origens, e estas espécies exóticas, em áreas recém colonizadas, acabam causando danos diversos, com sérias consequências para a biodiversidade, agricultura e saúde humana (BOUBOU et al., 2011). Várias espécies foram introduzidas em nosso ambiente, como: *Raoiella indica* Hirst em Roraima (NAVIA et al., 2011), *Aceria tosichella* Keifer no Rio Grande do Sul em 2006 (PEREIRA et al., 2009) e *Schizotetranychus hindustanicus* (Hirst) em 2008 (NAVIA; MARSARO, 2010). A possibilidade de novas introduções de ácaros no Brasil, devido à entrada de produtos potencialmente infestados e a movimentação de material vegetal, pode resultar na introdução de biótipos nocivos às plantas cultivadas no país (MENDONÇA et al., 2011).

2.5 Caracterização morfológica

A descrição morfológica tem sido amplamente utilizada para fins taxonômicos em acarologia e as técnicas envolvidas geralmente utilizam a observação direta das diferenças fenotípicas entre os organismos (NAVAJAS; FENTON, 2000). Para ácaros tetraniquídeos, a identificação morfológica é considerada difícil, pois o número de caracteres é limitado, devido ao seu tamanho reduzido e os caracteres principais apresentarem grande plasticidade fenotípica. Além disso, em tetraniquídeos a identificação específica baseia-se no formato do aedeago do macho adulto. Como resultado, muitas espécies não podem ser diferenciadas com base somente na morfologia externa (EHARA, 1999). A análise morfológica pode ser complementada pelo estudo de aspectos ecológicos, biológicos e características moleculares, para a distinção de espécies próximas (NORONHA, 2002).

Algumas espécies de ácaros fitófagos e insetos possuem formas similares ou idênticas, mas que diferem uma da outra na preferência pelo hospedeiro (DIEHL; BUSH, 1984). Existem populações que apresentam similaridade morfológica, mas podem ser incompatíveis reprodutivamente e consequentemente constituírem espécies diferentes (GONDIM JR.; MORAES, 2002). Muitas vezes, os critérios comumente utilizados para distinção de espécies são frágeis e podem se sobrepor para as duas formas estudadas, impossibilitando a separação em duas espécies distintas (MENDONÇA, 2009).

Caracteres morfológicos como tamanho do corpo, comprimento das setas dorsais, quetotaxia das pernas, forma e tamanho da espermateca e comprimento das quelíceras são bastante utilizados em acarologia (SOURASSOU et al., 2012). Estes caracteres são usados historicamente em estudos evolutivos e taxonômicos. No entanto, a falta de diferenças morfológicas qualitativas entre espécies crípticas torna difícil estabelecer as características morfológicas de diagnóstico entre elas. Entretanto, em muitos casos, as variações de traços quantitativos morfométricos são suficientes para a discriminação de espécies intimamente relacionadas (MOREETEAU et al., 2003, MORAES et al., 2004).

Algumas estruturas morfológicas variam para melhorar a função do organismo, sendo causadas por processos de desenvolvimento das espécies e favorecidas por seleção natural. Estas mudanças têm consequências para a aptidão do organismo e são fundamentais para estabelecer a ligação entre os processos de desenvolvimento e evolutivos (KLINGENBERG, 2002).

O uso de análise multivariada em morfometria é uma ferramenta muito utilizada em biologia evolutiva, para verificar hipóteses filogenéticas, detectar variação de caracteres quantitativos e para avaliar padrões de relacionamento entre as espécies (REIS, 1988). Também pode fornecer informações sobre a variabilidade intra e interespecífica, e contribui para o conhecimento taxonômico do grupo estudado (NAVIA et al., 2009).

Para organismos cuja taxonomia depende de poucos caracteres morfológicos, o uso de ferramentas moleculares para estimar a variação genética pode detectar a presença de diferentes genótipos, que se agrupam em grupos monofiléticos distintos (CATERINO et al.; 2000, NAVIA et al., 2005; MAHANI et al., 2009).

2.6 Caracterização molecular

Estudos moleculares em acarologia permitem o conhecimento sobre a estrutura de populações, filogenia e variabilidade genética, auxiliando na correta identificação e distinção entre espécies (MENDONÇA, 2009). Métodos moleculares são utilizados também para determinar a origem da invasão de tetraniquídeos em novos hospedeiros (NAVAJAS et al., 1994).

A utilização de marcadores moleculares para o estudo de carrapatos e ácaros

é recente, e gerou novas descobertas sobre suas estruturas populacionais e relações taxonômicas. Os grupos de ácaros mais estudados molecularmente incluem Tetranychidae, Eriophyidae e Phytoseiidae (NAVAJAS; FENTON, 2000).

Somente nos anos 90 surgiram os primeiros trabalhos utilizando marcadores moleculares em acarologia. Conforme Kaliszewski et al. (1992), a técnica de PCR (*Polymerase Chain Reaction*) foi utilizada para amplificar e sequenciar o DNA de 17 espécies de ácaros de diversos grupos taxonômicos, e os resultados indicaram que esta técnica poderia ser utilizada em acarologia para a obtenção de sequências de ácaros de diferentes espécies, e contribuir para os estudos filogenéticos.

A comparação de dados do DNA é aplicada atualmente para detectar variação genética em quaisquer níveis taxonômicos e para medir o parentesco entre organismos. Sequências de DNA são úteis para estabelecer relações filogenéticas em tetraniquídeos (NAVAJAS et al., 1992; 1996). O uso de marcadores moleculares para elucidar limites de distinção entre espécies previamente não reconhecidas pode facilitar significativamente a compreensão da especificidade do hospedeiro (KNEE et al., 2012).

Os dois marcadores moleculares mais informativos e utilizados em acarologia nas pesquisas com sistemática, filogenia e evolução são o fragmento do DNA mitocondrial, região codificadora *Citocromo oxidase* I (COI) e a região do genoma nuclear *"Internal Transcribed Spacer"* (ITS) do DNA ribossômico (MENDONÇA, 2009).

Genes mitocondriais são utilizados para verificar a história e evolução das populações, pois sofrem efeitos de mudanças genéticas aleatórias mais severamente do que os genes nucleares (BROWER et al., 1996). A utilização do fragmento *COI* do mtDNA como marcador é muito útil na análise de relações de parentesco entre tetraniquídeos, em níveis intraespecíficos (XIE et al., 2006).

O genoma mitocondrial dos artrópodes é uma molécula de DNA circular, de aproximadamente 18,5 kb. Em geral, cada mitocôndria possui de duas a 10 cópias do genoma mitocondrial. Cada célula contém centenas de mitocôndrias, portanto muitas cópias dos genes mitocondriais ocorrem em uma célula (XIE et al., 2006).

Este fragmento possui características genéticas peculiares como herança materna, estrutura simples e estável, elevado polimorfismo e uma taxa de evolução rápida. Esses recursos fornecem as condições ideais para PCR e a região *COI*

mostrou ser bem adequada para análise intraespecífica, devido ao elevado grau de polimorfismo nas espécies (XIE et al., 2006). Navajas et al. (1998), demonstraram que as sequências de *COI* poderiam distinguir duas linhagens distintas.

Um dos mais populares marcadores usados para inferir relações filogenéticas é o DNA ribossomal. Em organismos eucariontes, rDNA consiste nas 3 subunidades codificantes 18S, 5.8S e 28S. Entre estes genes, existe o espaço interno transcrito 1 (ITS1, entre as subunidades 18S e 5.8S) e o espaço interno transcrito 2 (ITS2, entre as subunidades 5.8S e 28S) (HILLIS; DIXON, 1991).

Devido à sua presença em todos os artrópodes, tamanho e taxa de evolução lenta em geral, o gene 18S do rRNA é a sequência mais frequentemente utilizada de todos os marcadores moleculares na filogenia molecular de todos os táxons (DABERT, 2006). Os espaços internos evoluem rapidamente e são, portanto, úteis na diferenciação de táxons intimamente relacionados. Polimorfismos nos espaçadores internos tem sido explorados para diferenciar organismos estreitamente relacionados (NAVAJAS et al., 1998, 1999) e tem sido utilizados com sucesso em diagnósticos de espécies (GOTOH et al., 1998).

Com relação aos tetraniquídeos, o avanço nos estudos moleculares contribuiu para possibilitar o acesso às informações sobre variabilidade genética, filogenia e estrutura de populações. O genoma do ácaro-rajado *Tetranychus urticae* foi recentemente sequenciado, o que representa o primeiro genoma completo de quelícerados e de uma praga agrícola de elevada polifagia (WYBOUW, 2012). O sequenciamento do genoma de *T. urticae* abre novos caminhos para a compreensão dos fundamentos de interações planta-herbívoro, o desenvolvimento de novas estratégias de manejo e produção de novos materiais na escala nanométrica. Com um tamanho de genoma estimado de cerca de 90 Mb, o genoma de *T. urticae* é o menor genoma artrópode sequenciado até o momento (GRBIĆ et al., 2011)

A utilização de um grande número de sequências de ácaros a partir das regiões ITS1 e ITS2 do DNA ribossomal e do gene citocromo c oxidase I (COI) do DNA mitocondrial (NAVAJAS et al., 1996, 1998), pode servir como base para o desenvolvimento de um método molecular que poderia simplificar a identificação ácaros, visando a utilização de sequências específicas de DNA para fins de diagnóstico como 'códigos de barras biológicos', ou DNA *barcoding* (BEN DAVID et al., 2007).

O DNA *barcoding* é projetado para fornecer identificação rápida, precisa e automatizada de espécies, utilizando regiões de genes curtos, padronizados, através de marcadores moleculares utilizados comumente em acarologia (GUO et al., 2015).

Conforme Ben David et al. (2007), a comparação de sequências de DNA *barcoding* a partir de uma amostra não identificada poderia informar se existem sequências de DNA similares no banco de dados, que foram previamente obtidas a partir de amostras *voucher*, simplificando a identificação da amostra. O espaço interno transcrito ITS2 demonstrou ser eficaz como DNA *barcoding* para recuperar agrupamentos biologicamente significativos ou espécies.

Os marcadores moleculares desenvolvidos ao longo dos anos para detectar variação entre táxons auxiliam os estudos de muitas questões biológicas, desde a genética de populações até a reconstrução filogenética e taxonomia. O advento de técnicas de biologia molecular, em especial inovações como a amplificação do DNA utilizando PCR (MULLIS, 1992) e métodos de sequenciamento de DNA automatizado exerceram uma grande influência sobre a disponibilidade e custos da aplicação de marcadores moleculares com base nas sequências de nucleotídeos (CABERT, 2006).

A análise filogenética também é usada para determinar padrões de distribuição geográfica, que é importante para a avaliação de rotas de migração e históricos de colonização, e também pode ser utilizada para identificar a origem de introduções acidentais (ROS; BREEUWER, 2007).

2.7 Compatibilidade reprodutiva

O sistema reprodutivo dos tetraniquídeos é arrenótoco, em que as fêmeas são diploides e os machos desenvolvem-se a partir de ovos não fertilizados com um conjunto haploide de cromossomos; ou telítoco, em que as fêmeas podem ser haploides ou diploides e os machos não são produzidos (SABELIS, 1985).

A dispersão é um elemento importante na biologia destes ácaros, sendo baseada na alta capacidade reprodutiva das fêmeas jovens. Devido ao fato de o primeiro acasalamento ser eficaz para a fertilização, os machos realizam comportamento de guarda com as fêmeas para garantir o acasalamento (HERBERT; BUTLER, 1975).

Experimentos de cruzamentos e retrocruzamentos são realizados para verificar a compatibilidade reprodutiva entre ácaros tetraniquídeos, como foi realizado entre *Tetranychus kanzawai* Kishida e *Tetranychus hydrangeae* Pritchard & Baker, provenientes de diferentes hospedeiros, para definir o status taxonômico destas espécies (GOTOH, 1986).

Para afirmar que as populações são associadas a um hospedeiro é necessário saber o fluxo gênico entre elas. Portanto, experimentos de cruzamentos são essenciais para afirmar a existência de *host races* em ácaros (GOMI; GOTOH, 1996). Mayr (1940) define uma espécie como um grupo de organismos capazes de cruzar e produzir descendentes férteis de ambos os sexos, separados de outros grupos com os quais a consanguinidade normalmente não acontece (SOURASSOU et al., 2012).

Incompatibilidade reprodutiva parcial entre populações de diferentes localidades e de diferentes hospedeiros é um fenômeno comum entre tetraniquídeos (GOTOH, 1986). Experimentos de cruzamentos entre diferentes populações de ácaros tetraniquídeos da mesma espécie, muitas vezes revelam o isolamento reprodutivo parcial entre essas populações. Diminuição da compatibilidade genética entre diferentes populações dentro de espécies tem sido relatada em espécies como *Tetranychus urticae, Tetranychus pacificus* McGregor, *Tetranychus neocaledonicus* Andre, *Tetranychus lombardini* Baker & Pritchard e *Panonychus citri* (OVERMEER; VAN ZON, 1976).

3 PROCEDIMENTOS METODOLÓGICOS

3.1 Caracterização morfológica

O estudo da caracterização morfológica de *Panonychus ulmi* foi conduzido no Laboratório de Acarologia da UNIVATES. Foram realizadas medições de dez fêmeas de cada uma das 17 populações analisadas, sendo sete populações de macieiras e dez populações de videiras, coletadas na safra de 2012-2013 e 2014-2015 (Tabela 1). Somente foram realizadas medições de fêmeas das populações com número de indivíduos suficientes para análise morfológica, pois algumas populações foram analisadas somente pela caracterização molecular, devido à escassez de indivíduos.

Os caracteres morfológicos avaliados foram: comprimento e largura do escudo dorsal; comprimento das setas dorsais (*v2*, *sc1*; *sc2*; *c1*; *c2*; *c3*; *d1*; *d2*; *e1*; *e2*; *f1*; *f2* e *h1*); distâncias entre as setas do escudo dorsal (*v2-v2*; s*c1*-s*c1*; s*c2*-s*c2*; *c1-c1*; *d1-d1*; *e1-e1*; *f1-f1 e h1-h1*) (Figura 8); comprimento das setas do escudo genital (*ag*; *g1*; *g2*; *ps1*; *ps2*; *h2*; *h3*); distâncias entre as setas do escudo genital (*ag-ag*; *g1-g1*; *g2-g2*; *ps1-ps1*; *ps2-ps2*; *h2-h2*; *h3-h3*) (Figura 9); comprimento dos segmentos das pernas (coxa, trocânter, fêmur, genu, tíbia e tarso) e das setas das pernas I, II, III e IV. A nomenclatura das setas foi baseada em Baker e Tuttle (1994).

Também foram realizadas medições da distância da base do tarso da perna I até a base da seta dúplice, bem como o comprimento e a largura do estilóforo. A abreviação e descrição detalhada de cada um dos caracteres analisados encontra-se na Tabela 2. Todas as medições foram realizadas manualmente em microscópio óptico com contraste de fases Leica DMLS e ocular graduada, com aumento de 40X.

Figura 8 – Vista dorsal das setas do corpo de *P. ulmi*

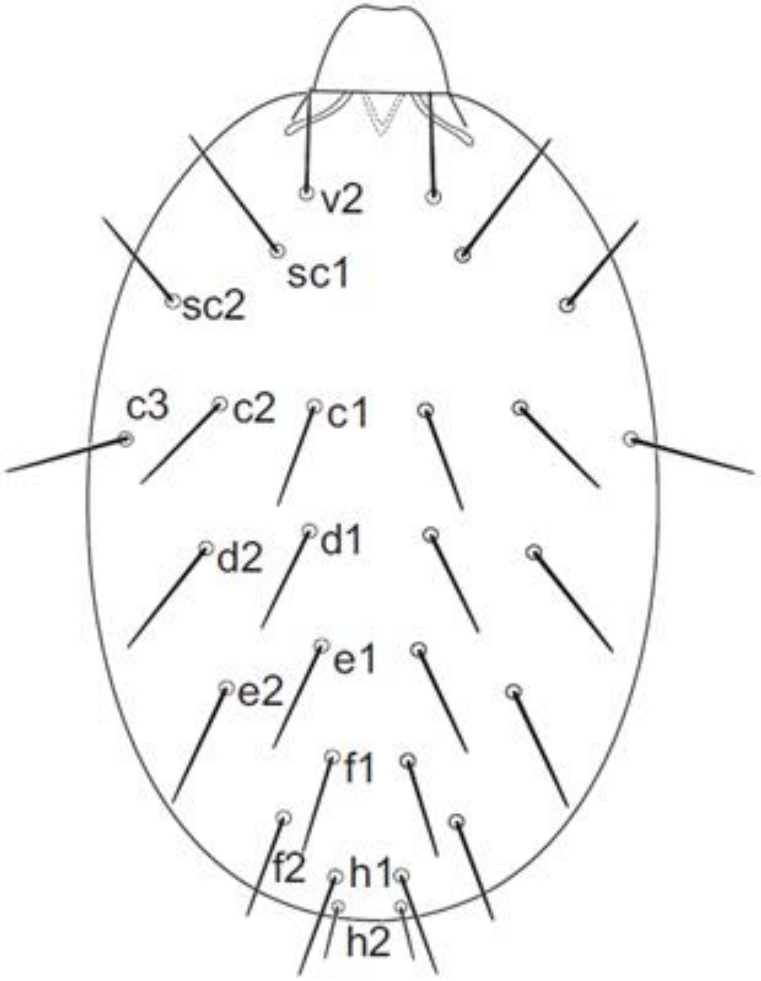
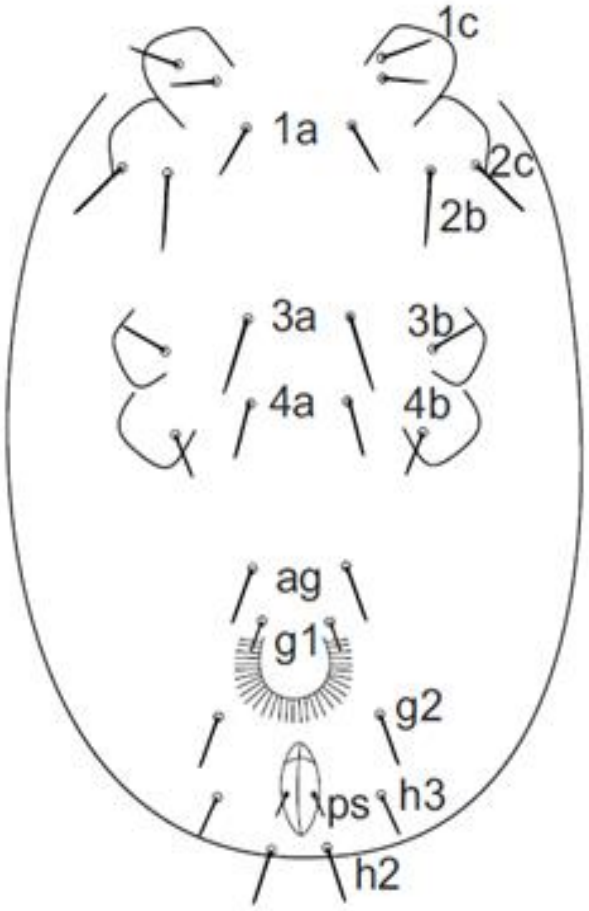


Figura 9 – Vista ventral das setas do corpo de *P. ulmi*



Fonte: Baker e Tuttle, 1994, p. 13 e 14

Tabela 1 - Relação das populações de *Panonychus ulmi* de macieiras e videiras analisadas na caracterização morfológica, código da população e código na análise morfológica, hospedeiros, locais, datas e coordenadas geográficas das coletas.

Código população*	**Código na análise morfológica****	**Hospedeiro**	**Local Coleta**	**Data da Coleta**	**Coordenadas geográficas**
P1UMST	1	*Vitis vinifera* - Merlot	Santa Tereza (RS)	29/01/2013	29°09'14.3"S 51°42'38.3"W
P4UMBG	1	*V. vinifera* - Mesa	São Gabriel - Bento Gonçalves (RS)	29/01/2013	29°11'38.4"S 51°34'03.2"W
P7UTBG	1	*V. vinifera* - Trebbiano	Bento Gonçalves (RS)	06/02/2013	29°11'07.9"S 51°34'40.2"W
P10UMMB	1	*V. vinifera* - Merlot	Monte Belo (RS)	06/02/2013	29°10'33.0"S 51°37'22.2"W
P14UMBG	1	*V. vinifera* - Merlot	Bento Gonçalves (RS)	06/02/2013	29°11'35.0"S 51°34'53.3"W
P16UMBG	1	*V. vinifera* - Merlot	Bento Gonçalves (RS)	06/02/2013	29°13'23.2"S 51°33'28.6"W
P18UCSBG	1	*V. vinifera* - Cabernet Sauvignon	Bento Gonçalves (RS)	06/02/2013	29°11'46.3"S 51°34'53.3"W
P20UPNBG	1	*V. vinifera* - Pinot Noir	Bento Gonçalves (RS)	06/02/2013	29°13'22.9"S 51°33'26.5"W
P25UTM	1	*V. vinifera* - Trebbiano	Marcorama (RS)	15/02/2013	29°16'23.4"S 51°38'17.4"W
P54ULG	1	*V. labrusca*	Garibaldi (RS)	04/03/2015	29°16'44.0"S 51°34'25.1"W
P22MFPB	2	*Malus domestica* - Fuji	Pinto Bandeira (RS)	07/02/2013	29°08'10.2"S 51°24'30.6"W
P28MGU	2	*M. domestica* - Gala	Urubici (SC)	18/02/2013	27°56'01.3"S 49°34'4.17"W
P31MGSJ	2	*M. domestica* - Gala	São Joaquim (SC)	18/02/2013	28°16'02.5"S 49°57'05.6"W
P34MFU	2	*M. domestica* - Fuji	Urubici (SC)	16/02/2013	28°02'48.4"S 49°25'11.5"W
P42MGU	2	*M. domestica* - Gala	Urubici (SC)	16/02/2013	28°03'19.0"S 49°26'0.33"W
P47MCOE	2	*M. domestica*	Columbus – Ohio – EUA	02/07/2013	39°57'55.6"N 82°59'46.1"W
P51MGV	2	*M. domestica* - Gala	Vacaria (RS)	17/12/2014	28°34'5.40"S 50°52'1.53"W

* P= População; Nº=Código da coleta; U=Uva; M=Maçã; Letra seguinte: Cultivar; Abreviação local da coleta

** 1= Todas as populações de videira; 2=Todas as populações de macieira

Tabela 2: Abreviação e descrição detalhada das estruturas analisadas na caracterização morfológica de *Panonychus ulmi*.

Abreviação	Descrição detalhada	Abreviação	Descrição detalhada	Abreviação	Descrição detalhada
Corcom	Comprimento do corpo	**Comcox4**	Comprimento coxa 4	**nsetgen1**	Nº de setas genu 1
Corlar	Largura do corpo	**nsetcox1**	Nº de setas coxa 1	**nsetgen2**	Nº de setas genu 2
v2	Comprimento seta v2	**nsetcox2**	Nº de setas coxa 2	**nsetgen3**	Nº de setas genu 3
sc1	Comprimento seta sc1	**nsetcox3**	Nº de setas coxa 3	**nsetgen4**	Nº de setas genu 4
sc2	Comprimento seta sc2	**nsetcox4**	Nº de setas coxa 4	**Comtib1**	Comprimento tíbia 1
c1	Comprimento seta c1	**Comtroc1**	Comprimento trocanter 1	**Comtib2**	Comprimento tíbia 2
c2	Comprimento seta c2	**Comtroc2**	Comprimento trocanter 2	**Comtib3**	Comprimento tíbia 3
c3	Comprimento seta c3	**Comtroc3**	Comprimento trocanter 3	**Comtib4**	Comprimento tíbia 4
d1	Comprimento seta d1	**Comtroc4**	Comprimento trocanter 4	**nsettib1**	Nº de setas tíbia 1
d2	Comprimento seta d2	**nsettro1**	Nº de setas trocanter 1	**nsettib2**	Nº de setas tíbia 2
e1	Comprimento seta e1	**nsettro2**	Nº de setas trocanter 2	**nsettib3**	Nº de setas tíbia 3
e2	Comprimento seta e2	**nsettro3**	Nº de setas trocanter 3	**nsettib4**	Nº de setas tíbia 4
f1	Comprimento seta f1	**nsettro4**	Nº de setas trocanter 4	**Comtar1**	Comprimento tarso 1
f2	Comprimento seta f2	**Comfem1**	Comprimento fêmur 1	**Comtar2**	Comprimento tarso 2
h1	Comprimento seta h1	**Comfem2**	Comprimento fêmur 2	**Comtar3**	Comprimento tarso 3
ag	Comprimento seta ag	**Comfem3**	Comprimento fêmur 3	**Comtar4**	Comprimento tarso 4
g1	Comprimento seta g1	**Comfem4**	Comprimento fêmur 4	**nsettar1**	Nº de setas tarso 1
g2	Comprimento seta g2	**nsetfem1**	Nº de setas fêmur 1	**nsettar2**	Nº de setas tarso 2
ps2	Comprimento seta ps2	**nsetfem2**	Nº de setas fêmur 2	**nsettar3**	Nº de setas tarso 3
ps1	Comprimento seta ps1	**nsetfem3**	Nº de setas fêmur 3	**nsettar4**	Nº de setas tarso 4
h3	Comprimento seta h3	**nsetfem4**	Nº de setas fêmur 4	**dbtarstd**	Distância base tarso seta dúplice perna I
h2	Comprimento seta h2	**Comgenu1**	Comprimento genu 1	**Comestil**	Comprimento estilóforo
Comcox1	Comprimento coxa 1	**Comgenu2**	Comprimento genu 2	**Largesti**	Largura estilóforo
Comcox2	Comprimento coxa 2	**Comgenu3**	Comprimento genu 3		
Comcox3	Comprimento coxa 3	**Comgenu4**	Comprimento genu 4		

Os caracteres morfológicos medidos foram analisados através de estatística multivariada, pela análise do componente principal (ACP), utilizando o programa PAST (HAMMER et al., 2001). A análise dos componentes principais foi realizada para avaliar os padrões de variação morfológica entre as populações e verificar os caracteres morfológicos que mais contribuem para diferenciação morfológica entre as 17 populações analisadas. Para cada população e característica analisada, foram obtidas a média, desvio padrão e valores mínimos e máximos.

Dados faltantes, duvidosos devido à montagem, disposição no plano horizontal da lâmina ou pela posição dorso-lateral foram retirados das análises, para que não interferissem nos resultados.

Todas as medidas apresentadas estão em micrômetros (µm), com a conversão do valor da medida realizada em 40X, multiplicada por 2,5, para atingir o valor correspondente às medidas em 100X.

3.2 Caracterização molecular

Para caracterização molecular, foram utilizadas dez fêmeas de cada uma das 19 populações analisadas, sendo dez populações de macieiras, sete de videiras, uma população de *Prunus amygdalus* Batsch e uma população de *Pyrus communis* L., coletadas nas safras de 2012-2013 e 2014-2015, conforme Tabela 3.

Tabela 3 - Relação das populações de *Panonychus ulmi* analisadas na caracterização molecular, código da população, hospedeiros, locais, datas e coordenadas geográficas das coletas.

Código	Hospedeiro	Local Coleta	Data Coleta	Coordenadas geográficas
Pu2	*Vitis vinifera* - Merlot	Santa Tereza (RS)	29/01/2013	29°09'14.3"S 51°42'38.3"W
Pu4	*V. vinifera* - Trebbiano	Bento Gonçalves (RS)	06/02/2013	29°11'07.9"S 51°34'40.2"W
Pu6	*V. vinifera* - Merlot	Bento Gonçalves (RS)	06/02/2013	29°11'35.0"S 51°34'53.3"W
Pu9	*V. vinifera* - Pinot Noir	Bento Gonçalves (RS)	06/02/2013	29°13'22.9"S 51°33'26.5"W
Pu11	*V. vinifera* - Trebbiano	Marcorama (RS)	15/02/2013	29°16'23.4"S 51°38'17.4"W
Pu25.1	*V. labrusca*	Garibaldi (RS)	04/03/2015	29°16'44.0"S 51°34'25.1"W
Pu21	*V. vinifera* - Merlot	Bento Gonçalves (RS)	26/11/2014	29°11'32.6"S 51°34'22.2"W
Pu20	*Prunus amygdalus*	Curacavì, Santiago - Chile	01/03/2013	33°23'54.3"S 71°06'53.5"W
Pu23	*Pyrus communis*	Yamagata - Japão	11/06/2014	38°37'28.3"N 140°10'52.1"E
Pu10	*Malus domestica* - Fuji	Pinto Bandeira (RS)	07/02/2013	29°08'10.2"S 51°24'30.6"W
Pu12	*M. domestica* - Gala	Urubici (SC)	18/02/2013	27°56'01.3"S 49°34'4.17"W
Pu13	*M. domestica* - Gala	São Joaquim (SC)	18/02/2013	28°16'02.5"S 49°57'05.6"W
Pu19.1	*M. domestica*	Columbus – Ohio – Estados Unidos	02/07/2013	39°57'55.6"N 82°59'46.1"W
Pu22.2	*M. domestica* - Gala	Vacaria (RS)	17/12/2014	28°34'5.40"S 50°52'1.53"W
Pu24	*M. pumila*	Nagano - Japão	10/06/2014	36°09'55.8"N 138°05'55.0"E
Pu26	*M. domestica* - Gala	Oulmes - Marrocos	05/07/2014	33°25'30.6"N 6°00'06.0"W
Pu28	*M. domestica*	Cohyaique - Chile	04/02/2013	45°34'15.6"S 72°04'02.8"W
Pu29	*M. domestica*	Western Cape – Elgin - África do Sul	12/02/2013	19˚2´35˝E 34˚8´44˝S
Pu30	*M. domestica*	Western Cape – Elgin - África do Sul	12/02/2013	19˚3´10˝E 34˚9´10˝S

* Pu=*Panonychus ulmi*; Nº=Código atribuído para população

O estudo da caracterização molecular foi realizado no Laboratório de Diagnóstico Molecular da Quarentena de Germoplasma Vegetal da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília (DF). O DNA extraído de cada uma das fêmeas foi utilizado para amplificação por PCR e as melhores amostras obtidas de cada população foram enviadas para sequenciamento, sendo enviadas em média cinco amostras por população.

As amostras de *P. ulmi* de macieiras provenientes do exterior foram gentilmente coletadas e enviadas pelos pesquisadores Dr. Tetsuo Gotoh do Japão, Dr. Ken Pringle da África do Sul, Dr. Serge Kreiter da França (Montpellier SupAgro), Dr. Roberto Trincado do Chile e Dr. Hans Klompen dos Estados Unidos. Nas amostras do Chile, além de amostras de macieira, vieram também indivíduos encontrados em amêndoas, espécie *Prunus amygdalus* Batsch, assim como ocorreu com as amostras provenientes do Japão, na qual vieram indivíduos provenientes de pêra, espécie *Pyrus communis* L, sendo que estas mesmo não sendo provenientes de macieiras ou videiras, foram analisadas para fins de comparação.

Três fragmentos de DNA foram amplificados por PCR e sequenciados para cada indivíduo: a região espaçadora transcrita interna um e dois (ITS1 e ITS2) do DNA ribossômico (18S parcial, ITS1, 5.8S, ITS2, 28S parcial) e dois fragmentos do gene *citocromo c oxidase I* (COI) do DNA mitocondrial, um amplificado com os *primers* C1J1718 e 773 (NAVAJAS; BOURSOUT, 2003) e outro com os *primers* LCO1490 e HCO2198 (FOLMER et al., 1994). Este segmento está localizado na região padrão do código de barras da vida para a maioria dos animais e é denominado fragmento de “Folmer”.

Os ácaros foram armazenados em álcool absoluto 100% e à -20°C. A extração de DNA total dos ácaros foi realizada por método não destrutivo, com a utilização de kit de extração DNeasy Blood & Tissue Kit (QIAGEN®, EUA), conforme protocolo adaptado de Dowling et al. (2011) e Mendonça (2011). Após a extração, os espécimes foram recuperados e montados em lâminas de microscopia em meio de Hoyer e depositados na coleção do Laboratório de Acarologia e Entomologia, da Quarentena de Germoplasma Vegetal, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília (DF), como espécimes *voucher*.

Conforme o protocolo utilizado, os ácaros foram individualizados em microtubo estéril de 1,5 mL juntamente com uma solução composta por 10 µL de

proteinase K e 90 µL de tampão ATL (QIAGEN). O microtubo contendo o ácaro e a solução foi incubado em banho-maria, temperatura de 56°C, *overnight,* por um período de 21 a 24 horas.

Após a retirada do banho-maria, os microtubos foram centrifugados por 1 minuto a 8000 rpm. Adicionou-se, então, 100 µL de tampão AL (QIAGEN) aos microtubos, que foram homogeneizados em vórtex e incubados novamente em banho-maria, temperatura de 70°C, por um período de 10 minutos. Ao retirá-los foram adicionados 100 µL de álcool absoluto em cada microtubo, procedendo-se nova homogeneização em vórtex seguida de uma centrifugação por 1 minuto a 8000 rpm. Nesta etapa, a mistura composta de 300 µL de solução foi transferida para as colunas de extração fornecidas no kit QIAGEN. Nessa etapa, o exoesqueleto do ácaro foi deixado no tubo original para posterior montagem das lâminas.

As colunas contendo a solução foram centrifugadas por 1 minuto a 8000 rpm em temperatura de 10ºC. Após a centrifugação o tubo coletor com o sobrenadante foi retirado e novos tubos coletores foram acoplados às colunas, que receberam 250 µL de *buffer* AW1 (QIAGEN). As colunas foram centrifugadas novamente, por 1 minuto a 8000 rpm em temperatura de 10ºC. Após a centrifugação o tubo coletor com o sobrenadante foi descartado e novos tubos coletores foram acoplados às colunas, que receberam 250 µL de *buffer* AW2 (QIAGEN). Nesta etapa as colunas foram centrifugadas por 3 minutos a 13.000 rpm em temperatura de 10ºC, para secar a membrana da coluna. Após a centrifugação, retirou-se o excesso de solução do anel da coluna de extração com o auxílio de uma micropipeta P10 e nova centrifugação foi realizada nas mesmas condições anteriores.

Após esta centrifugação, a mini coluna foi transferida para um novo microtubo estéril de 1,5mL, e na última etapa, foram depositados 50 µL de água ultra pura sobre a membrana da mini coluna, que permaneceu incubada no gelo por dez minutos. Em seguida, foram realizadas duas centrifugações a 8000 rpm por 1 minuto. Após este processo, foi retirada uma alíquota de 2 µL de cada amostra de DNA para a quantificação em espectrofotômetro Nanodrop 2000, marca ThermoFisher. O microtubo contendo o DNA molde restante foi armazenado em freezer a -20ºC.

Os *primers* utilizados nas reações de PCR e no sequenciamento encontram-se descritos na Tabela 4.

Tabela 4 - Fragmentos amplificados e *primers* utilizados nas reações de PCR e no sequenciamento do DNA nuclear e mitocondrial dos espécimes de *Panonychus ulmi* analisados.

Fragmento	**Comp. (pb)**	***Primers***	**Referências**	***Primers***	**Uso**
ITS (rDNA)	1200	18S	BEN DAVID et al., 2007	5'-AGAGGAAGTAAAAGTCGTAACAAG-3'	PCR e Sequenciamento
		28SC	NAVAJAS et al.,1998	5'-ATATGCTTAAATTCAGCGGG-3'	PCR e Sequenciamento
COI (mtDNA)	900	CIJ 1718	SIMON et al.,1994	5'-GGAGGATTTGGAAATTGATTAGTTCC-3'	PCR e Sequenciamento
		773	NAVAJAS et al., 1992	5'-TACAGCTCCTATAGATAAAAC-3'	PCR e Sequenciamento
COI (mtDNA)	700	LCO1490	FOLMER et al., 1994	5'-GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG-3'	PCR e Sequenciamento
		HC02198	FOLMER et al., 1994	5'-TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA-3'	PCR e Sequenciamento

As reações de PCR foram realizadas nos seguintes termocicladores: Bio Rad Termocycler Applied Biosystems, Eppendorf Mastercycler Pro e Eppendorf Mastercycler Pro S, disponíveis no laboratório da EMBRAPA.

Para a região *COI* (FOLMER et al., 1994) utilizou-se na reação de PCR 2 µL de DNA, em uma concentração média de 5,9 ng/µL, 0,12 µL de Taq DNA polimerase 5 uni/µL, 1,0 µL a 2,5 mM de dNTPs (adenina, citosina, guanina e timina), 0,175 µL a 10 mM de cada *primer* (LCOI1490 e HCOI2198), 0,1 µL BSA (10mg/ml), 2,5 µL $MgCl_2$ (25 mM), 2,5 µL de Tp 10x, 3,93 µL de água ultra pura e 12,5 µL de Trehalose 10%, em um total de 25 µL.

O programa de amplificação consistiu em um ciclo inicial de desnaturação de 94ºC por um minuto, seguido de 10 ciclos de 1 minuto a 94ºC (desnaturação), 1 minuto e 30 segundos a 45ºC (hibridização) e 1 minuto e 30 segundos a 72ºC (extensão) e de 35 ciclos de 1 minuto a 94ºC (desnaturação), 1 minuto e 45 segundos a 50ºC (hibridização) e 45 segundos a 72ºC (extensão), com

um ciclo final de extensão realizado durante dez minutos a 72ºC, e posteriormente um ciclo de 10ºC (∞), até a retirada das amostras do termociclador.

Para a região *COI* (SIMON et al., 1994; NAVAJAS et al., 1992) a reação de PCR foi composta por 2 µL de DNA (5,9 ng/µL), 0,13 µL de Taq DNA polimerase 5 uni/µL, 2 µL a 2,5 mM de dNTPs (adenina, citosina, guanina e timina), 0,5 µL a 10 mM de cada *primer* (C1J1718 e 773), 0,1 µL BSA (10mg/ml), 2 µL $MgCl_2$ (25 mM), 2,5 µL de Tp 10x e 15,27 µL de água ultra pura, em um total de 25 µL. Foi utilizado programa de amplificação que consistiu em um ciclo inicial de desnaturação de 94ºC por três minutos, seguido por 35 ciclos de 1 minuto a 94ºC (desnaturação), 1 minuto e 30 segundos a 51ºC (hibridização), 2 minutos a 72ºC (extensão) com um ciclo final de extensão realizado por dez minutos a 72ºC e posteriormente um ciclo de 10ºC ∞, até a retirada das amostras do termociclador.

A região ITS (MENDONÇA et al.,2011) foi amplificada em uma reação composta por 2 µL de DNA (5,9 ng/µL), 0,25 µL de Taq DNA polimerase 5 uni/µL, 2 µL a 10 mM de dNTPs (adenina, citosina, guanina e timina), 1,25 µL a 10 mM de cada *primer* (18S e 28SC), 5 µL de solução Q, 2 µL $MgCl_2$ (25 mM), 2,5 µL de Tp 10x e 8,75 µL de água ultra pura, em um total de 25 µL. O programa de amplificação consistiu em um ciclo inicial de desnaturação de 94ºC por três minutos, seguido por 30 ciclos de 1 minuto a 94ºC (desnaturação), 45 segundos a 51ºC (hibridização), 1 minuto e 30 segundos a 72ºC (extensão) com um ciclo final de extensão realizado durante dez minutos a 72ºC e posteriormente um ciclo de 10ºC ∞.

O produto de cada reação de PCR foi analisado por eletroforese em gel de agarose a 1%, corado em solução de GelRed@ (GelRed Nucleic Acid Gel Stain, 10,000X, Biotium), controles negativos foram utilizados para todas as reações. Os géis foram visualizados e fotografados em transluminador BioRad (KodakGel Logic 212 Imaging System).

A seguir as amostras de DNA amplificadas com banda única e que apresentaram melhores resultados no gel foram preparadas e enviadas para sequenciamento direto pelo método “BigDyeTerminator” por sequenciamento capilar em sequenciador de DNA automatizado pela Plataforma ABI PRISM 3730 XL (Macrogen Korea). Antes da realização do sequenciamento, as amostras passaram por processo de purificação realizado diretamente pela Macrogen.

3.2.1 Alinhamento das sequências

As sequências de DNA obtidas foram submetidas ao programa Staden Package versão 1.6-r (BONFIELD et al., 1995) para obtenção das sequências consensos. O programa BioEdit versão 7.0.4 (HALL, 1999) foi utilizado para análise das sequências e para implementação do programa CLUSTAL W *Multiple Alignment* versão 7.09 (THOMPSON et al., 1994), utilizado para alinhamento das mesmas.

Os sítios polimórficos, a composição de nucleotídeos, o número e a diversidade dos haplótipos foram calculados no programa DnaSP versão 5.0 (ROZAS et al., 2003). As sequências obtidas foram comparadas às sequências de *P. ulmi* depositadas no GenBank (TODA et al., 2000; MATSUDA et al., 2014) para confirmação da espécie.

3.2.2 Análises filogenéticas

As análises filogenéticas e moleculares dos fragmentos estudados foram realizadas pelo software MEGA versão 6.0 (*Molecular Evolutionary Genetics Analysis* versão 6.0) (KIMURA, 1980; TAMURA et al., 2013). Inicialmente foi testado e selecionado o melhor modelo de substituição de nucleotídeos para os fragmentos estudados, sendo que os arquivos de sequências foram submetidos separadamente às análises filogenéticas.

As árvores filogenéticas foram estimadas por máxima verossimilhança (Maximum-Likelihood estimation - ML) baseado nas distâncias das sequências calculadas pelo método de correção de Tamura 3-parâmetros (*Tamura three parameter correction method*) (TAMURA, 1992) e a construção e edição também foi executada no software MEGA versão 6.0 (TAMURA et al., 2013). Para a determinação dos limites de confiança nas ramificações geradas na construção das filogenias, os dados foram submetidos ao teste de *bootstrap* (FELSENSTEIN, 1985) para 1000 replicações e os valores foram apresentados em porcentagem, próximos aos ramos das árvores.

Os valores de *bootstrap* inferiores a 50% não foram apresentados na árvore. Para a edição da árvore e melhor apresentação, uma sequência representante de cada amostra foi incluída no alinhamento. Se a amostra apresentou diferentes

haplótipos, eles também foram incluídos na análise separadamente, sendo que o número de vezes que um haplótipo se repetiu foi colocado entre parênteses, ao lado do código da amostra. Esse número indica quantas sequências idênticas foram encontradas no conjunto de dados para cada uma das amostras analisadas. A divisão das amostras em cada haplótipo foi obtida através das análises realizadas no software MEGA 6.0.

Uma sequência *COI* conhecida de *P. ulmi* foi incluída como referência nas análises filogenéticas para cada fragmento estudado (Folmer e Navajas). Os respectivos fragmentos foram recuperados do GenBank, com o código da sequência NC012571 que representa o número do acesso do genoma mitocondrial completo revisado pela equipe do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) e depositado no referido banco por Van Leeuwen et al. (2008). Da mesma forma, uma sequência de cada fragmento *COI* de *P. citri* foi incluída nas análises como grupo interno. Esses fragmentos constituem porções do genoma mitocondrial completo de *P. citri*, recuperado do GenBank sob o número de acesso HM189212, depositado por YUAN et al., 2010. *Tetranychus urticae* (EU345430) (VAN LEEUWEN et al. 2008) foi escolhido como grupo externo por ser o único ácaro fitófago com genoma completo já sequenciado (GRBIC et al., 2011). Foi utilizado o termo linhagem para identificar as populações de *P. ulmi* que formaram agrupamentos na árvore filogenética.

3.2.3 Distância genética

O programa MEGA versão 6.0 (TAMURA et al., 2013) foi utilizado para estimar a distribuição e a frequência da distância genética entre os pares ordenados de nucleotídeos para os dois fragmentos *COI* sequenciados para todas as amostras estudadas.

3.3 Compatibilidade reprodutiva

3.3.1 Criações estoque de *Panonychus ulmi*

O trabalho foi conduzido no Laboratório de Acarologia da UNIVATES. Foram estabelecidas criações estoque de *Panonychus ulmi* proveniente de macieiras e videiras, a partir de coletas realizadas nos meses de novembro e dezembro de 2014 e janeiro, fevereiro e março de 2015. As coletas em macieiras foram em *Malus domestica* Borkh, cultivar Gala, no município de Vacaria (RS) (28°34'5.40"S 50°52'1.53"W), 854 metros de altitude; e em videiras *Vitis vinifera* cultivar Merlot, em Bento Gonçalves (RS), (29°11'32.6"S 51°34'22.2"W), 545 metros de altitude.

Os indivíduos de ambas as culturas foram mantidos em arenas com folhas de macieira sem aplicação de pesticidas, provenientes de uma propriedade particular em Bento Gonçalves (RS) e sem presença de ácaros. Foram montadas arenas no interior de bandejas de isopor de 24 cm de comprimento e 18 cm de largura, nas quais foi colocado um pedaço de espuma com densidade 28 com papel germinativo.

Em cada bandeja, duas folhas de macieira foram dispostas com a face abaxial sobre o papel germinativo e a espuma, com as bordas e parte do pecíolo cobertas com algodão hidrófilo umedecido. Diariamente, enquanto foi mantida a criação, foi adicionado água destilada às bandejas para manter o algodão e a espuma umedecidos, e o vigor das folhas. As populações de ácaros foram trocadas de arenas quando as folhas apresentaram coloração amarelada, indicando estarem inadequadas para manutenção das colônias. Esta troca de arenas foi realizada em média a cada 20 dias, que foi o período de duração das folhas.

Em cada folha foram colocadas 20 fêmeas e dez machos, provenientes das respectivas coletas. A mesma metodologia de criação foi utilizada para espécimes provenientes de macieiras e videiras, mas a criação de ácaros de macieiras foi iniciada somente em dezembro, quando os mesmos foram encontrados em campo. As criações dos diferentes hospedeiros foram isoladas para evitar a contaminação e foram mantidas em ambientes com temperatura controlada em 25±3°C, 14 horas de fotoperíodo e umidade relativa do ar de 75±5%. A metodologia de criação foi adaptada de Herbert (1981) e Johann (2014). As criações estoque foram mantidas ao longo de todo experimento, para fornecer os ácaros nas fases de

desenvolvimento necessárias para os cruzamentos.

A opção pela utilização de folhas de maçã se deu em função da durabilidade foliar maior deste hospedeiro, pois foi necessário avaliar a oviposição por dez dias, e as folhas de videira duram apenas de três a quatro dias. Além disso, pela necessidade da escolha de um hospedeiro para os cruzamentos entre as duas populações.

A autorização para coletas dos ácaros para todos os experimentos realizados foi fornecida pelo Ministério do Meio Ambiente, SISBIO, sob forma de autorização para atividade com finalidade científica, registrada sob número 28042-1, em nome da pesquisadora Dra. Liana Johann.

3.3.2 Testes de cruzamentos

Os testes de cruzamentos foram realizados obedecendo às combinações: **C1**: ♂ Macieira X ♀ Macieira; **C2**: ♂ Videira X ♀ Videira; **C3**: ♂ Macieira X ♀ Videira; **C4**: ♂ Videira X ♀ Macieira; **C5**: ♀ Macieira Isoladas; **C6**: ♀ Videira Isoladas; **C7**: ♂ Videira X ♀ F1 C3; **C8**: ♂ Macieira X ♀ F1 C3; **C9**: ♂ Videira X ♀ F1 C4; **C10**: ♂ Macieira X ♀ F1 C4; **C11**: ♂ F1 C3 X ♀ F1 C3 e **C12**: F1 C4 X ♀ F1 C4.

Nas arenas, as folhas de macieira foram divididas em quatro partes, onde uma fêmea em fase de deutoninfa e um macho adulto provenientes das respectivas criações estoque foram liberados. Foram formados inicialmente dez casais correspondentes às combinações de cruzamentos **C1** (♂ Macieira X ♀ Macieira), **C2** (♂ Videira X ♀ Videira), **C3** (♂ Macieira X ♀ Videira), **C4** (♂ Videira X ♀ Macieira), **C5** (♀ Macieira Isoladas) e **C6** (♀ Videira Isoladas). Para os retrocruzamentos, foram montados o maior número de casais possíveis de acordo com o número de fêmeas e machos originados na F1 dos cruzamentos **C3** e **C4** iniciais.

Os casais foram observados diariamente e as fêmeas observadas por dez dias e então retiradas das arenas. Foram avaliados o percentual de oviposição, o número total de ovos por cruzamento, dias de oviposição por fêmea, número de ovos por fêmea por dia, viabilidade dos ovos, razão sexual e taxa de sobrevivência. O experimento foi conduzido nas mesmas condições das criações estoque.

Os dados dos experimentos foram analisados utilizando o teste T, ao nível de significância de 5%, através do software BioEstat 5.0 (AYRES et al., 2007).

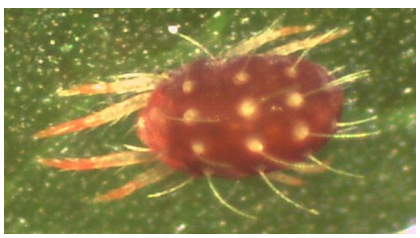
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Caracterização morfológica

O gênero *Panonychus* se diferencia dos demais gêneros de Tetranychidae pela ocorrência de setas dorsais inseridas em tubérculos proeminentes, presentes no corpo das fêmeas adultas (BOLLAND et al., 1998). Espécies deste gênero são chamadas de ácaros vermelhos devido a sua coloração vermelho escura, sendo que diferentes espécies apresentam variações na tonalidade da cor do corpo ou somente em partes específicas, como os tubérculos dorsais (EHARA, 1999; ZHANG, 2003).

Foi possível observar visualmente leve variação na tonalidade de vermelho entre fêmeas provenientes de macieiras e videiras, sendo as fêmeas de macieira com tonalidade de vermelho mais claro e as de videira mais escuro. No caso dos espécimes de *P. ulmi* observados neste trabalho, todos apresentavam tubérculos de cor branca, característica da espécie (Figura 10).

Figura 10 – Vista dorsal de fêmea adulta de *Panonychus ulmi*, apresentando a coloração do corpo e as setas dorsais inseridas em tubérculos brancos.



Fonte: Acervo Laboratório de Acarologia UNIVATES.

Dados faltantes nas medições são um problema comum em morfometria de ácaros, pois a técnica padrão de montagem permite medições apenas no plano horizontal da lâmina (KLIMOV et al., 2004). Neste trabalho, de um total de 88 caracteres avaliados, 73 foram utilizados nas análises, sendo eliminados todos os valores de medidas de distâncias entre as setas, pois foram consideradas medidas pouco precisas, assim como os indivíduos que, devido a problemas na montagem, não puderam ser medidos. O resultado das medições das 73 características avaliadas encontra-se na Tabela 5.

O comprimento das setas, bem como a qualidade da montagem do ácaro são características variáveis, pois mesmo com cuidado na montagem podem ocorrer variações (BAUMANN, 2014). Apesar desta dificuldade, os comprimentos das setas são afetados pelas condições ambientais, sendo importante sua medição (JAGERSBACHER-BAUMANN; EBBERMANN, 2013), pois representam uma condição importante para distinção de espécies de tetraniquídeos.

As pernas dos ácaros são compostas por 6 segmentos (da base até o ápice): coxa, trocânter, fêmur, genu, tíbia e tarso (MORAES; FLECHTMANN, 2008). O número das setas presentes no genu da perna IV pode ser utilizado para identificar espécies no gênero *Panonychus*. *Panonychus citri* e *P. ulmi* possuem três setas, enquanto *Panonychus caglei* Mellott possui apenas duas setas no mesmo segmento (JEPPSON et al., 1975). Nas medições realizadas não houve variação nesta característica, sendo que apenas alguns indivíduos apresentaram duas setas, possivelmente devido à perda no momento da montagem.

Tabela 5 – Valores médios ($\bar{x}$) em micrômetros (µm), desvio padrão (DP), valores mínimos (min) e máximos (max) dos caracteres morfológicos avaliados nas populações de *Panonychus ulmi* provenientes de macieiras e videiras.

Caracteres Morfológicos*	P1UMST*				P4UMBG				P7UTBG				P10UMMB				P14UMBG			
	$\bar{X}$	DP	min	max	$\bar{X}$	DP	min	max	$\bar{X}$	DP	min	max	$\bar{X}$	DP	min	max	$\bar{X}$	DP	min	max
Corcom	357.50	31.84	325.00	412.50	466.50	56.03	390.00	550.00	411.94	37.64	350.00	462.50	432.78	23.80	405.00	487.50	358.89	53.26	300.00	475.00
Corlar	301.50	33.87	262.50	350.00	399.75	55.23	302.50	487.50	388.06	33.00	337.50	425.00	395.83	21.18	375.00	425.00	312.50	32.64	285.00	375.00
v2	55.50	5.37	47.50	62.50	60.50	5.99	50.00	70.00	58.33	3.54	52.50	62.50	65.28	4.04	62.50	75.00	62.78	4.58	57.50	70.00
sc1	152.75	12.83	135.00	172.50	155.25	9.09	137.50	170.00	153.61	9.69	142.50	175.00	173.11	6.56	160.00	183.00	162.50	9.10	147.50	175.00
sc2	100.75	6.46	90.00	112.50	106.75	8.90	95.00	120.00	103.06	10.06	92.50	125.00	116.39	6.74	105.00	127.50	107.78	12.02	92.50	125.00
c1	150.25	9.82	140.00	175.00	149.00	7.92	135.00	157.50	149.44	9.17	135.00	160.00	161.11	5.32	150.00	170.00	157.22	13.08	140.00	175.00
c2	145.75	10.41	127.50	162.50	147.75	7.50	137.50	157.50	148.89	10.24	132.50	165.00	166.39	9.20	145.00	175.00	155.83	17.59	125.00	175.00
c3	80.50	6.21	72.50	92.50	87.25	7.12	75.00	95.00	81.94	6.93	67.50	87.50	97.22	6.18	87.50	107.50	89.22	8.63	77.50	100.00
d1	143.75	10.22	127.50	155.00	148.25	9.72	132.50	160.00	150.31	5.51	142.50	160.00	161.72	5.74	155.00	172.50	162.28	13.36	140.00	180.00
d2	141.75	9.72	130.00	157.50	146.50	8.76	132.50	162.50	139.72	9.14	127.50	157.50	159.17	8.48	150.00	175.00	150.00	14.58	120.00	167.50
e1	132.30	12.07	113.00	155.00	132.50	7.07	120.00	140.00	134.38	8.73	120.00	150.00	145.83	5.45	137.50	155.00	138.89	10.76	125.00	155.00
e2	119.25	9.65	105.00	137.50	123.00	6.43	110.00	135.00	118.89	8.11	107.50	132.50	138.06	6.93	125.00	147.50	126.39	15.72	105.00	155.00
f1	85.25	7.21	75.00	97.50	89.25	4.09	82.50	95.00	87.22	3.63	82.50	92.50	97.78	5.07	90.00	102.50	90.28	8.05	75.00	100.00
f2	52.25	4.78	47.50	60.00	55.25	5.20	47.50	62.50	50.83	6.12	40.00	57.50	60.00	6.37	50.00	67.50	60.28	8.43	45.00	70.00
h1	37.00	2.84	32.50	42.50	39.50	4.53	32.50	47.50	38.89	8.01	30.00	55.00	41.11	4.86	35.00	50.00	38.61	4.53	32.50	47.50
ag	47.22	2.19	45.00	50.00	47.17	2.19	42.50	50.00	50.00	3.54	45.00	57.50	45.28	4.91	37.50	52.50	47.50	2.17	45.00	50.00
g1	31.00	2.93	27.50	35.00	31.25	1.77	30.00	35.00	29.44	1.67	27.50	32.50	31.39	3.56	25.00	37.50	29.72	1.95	27.50	32.50
g2	31.25	1.77	30.00	35.00	34.35	2.48	31.00	37.50	30.56	3.91	22.50	35.00	32.78	2.32	30.00	37.50	34.50	2.51	30.00	38.00
ps2	17.22	2.19	15.00	20.00	19.00	2.69	15.00	22.50	16.67	1.77	15.00	20.00	18.61	2.20	15.00	22.50	17.22	1.95	15.00	20.00
ps1	18.33	1.67	15.00	20.00	19.50	2.30	17.50	22.50	16.11	2.20	12.50	20.00	18.06	3.25	15.00	22.50	17.22	1.50	15.00	20.00
h3	35.25	2.19	32.50	37.50	35.75	2.65	32.50	40.00	31.67	2.17	27.50	35.00	33.44	2.48	30.00	37.50	34.44	1.67	32.50	37.50
h2	32.78	2.19	30.00	35.00	36.11	2.39	32.50	40.00	32.88	3.02	30.00	38.00	34.06	2.48	30.00	37.50	33.06	4.29	27.50	40.00

* P= População; Nº=Código da coleta; U=Uva; M=Maçã; Letra seguinte: Cultivar; Abreviação local da coleta. O detalhamento encontra-se nas Tabelas 1 e 2.

Caracteres morfológicos	P1UMST				P4UMBG				P7UTBG				P10UMMB				P14UMBG			
	$\bar{X}$	DP	min	max	$\bar{X}$	DP	min	max	$\bar{X}$	DP	min	max	$\bar{X}$	DP	min	max	$\bar{X}$	DP	min	max
Comcox1	58.57	4.39	50.00	62.50	44.80	7.81	37.50	62.50	40.63	5.56	35.00	50.00	52.50	10.90	35.00	75.00	54.72	4.23	50.00	62.50
Comcox2	45.37	6.28	35.00	55.00	38.80	8.43	25.00	55.00	42.19	7.44	35.00	57.50	47.50	10.75	37.50	65.00	43.33	5.73	37.50	52.50
Comcox3	40.93	5.64	35.00	50.00	38.11	2.83	35.00	45.00	35.39	5.62	30.00	48.00	38.61	8.21	25.00	52.50	39.17	5.15	32.50	50.00
Comcox4	41.00	4.12	37.50	50.00	36.11	5.29	30.00	47.50	33.33	3.54	30.00	37.50	42.22	7.12	32.50	55.00	38.89	5.46	32.50	47.50
nsetcox1	2.00	0.00	2.00	2.00	1.80	0.42	1.00	2.00	2.00	0.00	2.00	2.00	2.00	0.00	2.00	2.00	1.89	0.33	1.00	2.00
nsetcox2	2.00	0.00	2.00	2.00	2.00	0.00	2.00	2.00	1.89	0.33	1.00	2.00	1.89	0.33	1.00	2.00	1.78	0.44	1.00	2.00
nsetcox3	1.00	0.00	1.00	1.00	1.00	0.00	1.00	1.00	1.00	0.00	1.00	1.00	1.00	0.00	1.00	1.00	1.00	0.00	1.00	1.00
nsetcox4	1.00	0.00	1.00	1.00	1.00	0.00	1.00	1.00	1.00	0.00	1.00	1.00	1.00	0.00	1.00	1.00	1.00	0.00	1.00	1.00
Comtroc1	31.75	3.13	27.50	37.50	29.25	4.57	20.00	35.00	30.56	3.91	25.00	37.50	30.83	3.95	25.00	37.50	30.00	3.06	25.00	35.00
Comtroc2	27.50	2.89	22.50	32.50	27.25	2.49	25.00	30.00	24.69	0.83	22.50	25.00	26.67	1.77	25.00	30.00	25.00	1.77	22.50	27.50
Comtroc3	25.75	3.13	20.00	32.50	26.25	4.29	22.50	35.00	25.06	2.57	20.00	28.00	27.78	3.17	22.50	32.50	26.11	3.33	22.50	32.50
Comtroc4	30.75	4.72	25.00	37.50	28.94	3.84	23.00	35.00	26.17	3.12	20.00	30.00	25.56	3.70	20.00	32.50	25.56	3.25	20.00	32.50
nsettro1	1.00	0.00	1.00	1.00	1.00	0.00	1.00	1.00	1.00	0.00	1.00	1.00	1.00	0.00	1.00	1.00	1.00	0.00	1.00	1.00
nsettro2	1.00	0.00	1.00	1.00	1.00	0.00	1.00	1.00	1.00	0.00	1.00	1.00	1.00	0.00	1.00	1.00	1.00	0.00	1.00	1.00
nsettro3	1.00	0.00	1.00	1.00	1.00	0.00	1.00	1.00	1.00	0.00	1.00	1.00	1.00	0.00	1.00	1.00	1.00	0.00	1.00	1.00
nsettro4	1.00	0.00	1.00	1.00	1.00	0.00	1.00	1.00	1.00	0.00	1.00	1.00	1.00	0.00	1.00	1.00	1.00	0.00	1.00	1.00
Comfem1	87.25	6.71	75.00	97.50	88.50	6.89	77.50	100.00	84.17	8.10	72.50	100.00	88.33	2.80	82.50	92.50	89.78	4.72	80.00	95.00
Comfem2	61.00	3.94	55.00	67.50	60.75	4.87	50.00	65.00	57.78	4.75	50.00	62.50	61.39	2.53	57.50	65.00	60.56	4.29	55.00	70.00
Comfem3	61.25	2.70	57.50	65.00	62.00	3.50	57.50	70.00	57.50	5.00	50.00	62.50	61.11	3.33	55.00	65.00	57.00	4.65	50.00	62.50
Comfem4	71.50	3.76	65.00	75.00	66.75	8.25	55.00	77.50	66.94	6.93	55.00	75.00	71.11	4.86	62.50	77.50	69.22	5.23	60.00	75.00
nsetfem1	7.50	0.71	6.00	8.00	7.90	0.32	7.00	8.00	7.56	0.53	7.00	8.00	7.11	1.27	5.00	8.00	7.78	0.44	7.00	8.00
nsetfem2	4.50	0.53	4.00	5.00	5.10	0.74	4.00	6.00	5.44	1.01	3.00	6.00	4.67	0.50	4.00	5.00	5.00	0.71	4.00	6.00
nsetfem3	2.70	0.48	2.00	3.00	3.00	0.00	3.00	3.00	3.11	0.33	3.00	4.00	3.22	0.67	3.00	5.00	3.11	0.33	3.00	4.00
nsetfem4	1.00	0.00	1.00	1.00	1.00	0.00	1.00	1.00	1.00	0.00	1.00	1.00	1.00	0.00	1.00	1.00	1.00	0.00	1.00	1.00

Caracteres morfológicos	P1UMST				P4UMBG				P7UTBG				P10UMMB				P14UMBG			
	$\bar{X}$	DP	min	max	$\bar{X}$	DP	min	max	$\bar{X}$	DP	min	max	$\bar{X}$	DP	min	max	$\bar{X}$	DP	min	max
Comgenu1	44.00	1.29	42.50	45.00	44.25	3.34	37.50	50.00	41.94	3.00	37.50	47.50	43.94	2.63	40.00	48.00	42.78	2.64	37.50	45.00
Comgenu2	38.00	1.58	35.00	40.00	37.25	1.84	35.00	40.00	36.67	2.17	32.50	40.00	38.89	2.53	37.50	45.00	37.50	4.15	32.50	47.50
Comgenu3	35.75	2.37	32.50	40.00	36.25	2.95	30.00	40.00	32.78	2.32	30.00	37.50	36.11	3.97	30.00	45.00	36.11	4.35	30.00	45.00
Comgenu4	36.00	1.75	32.50	37.50	34.25	3.74	27.50	37.50	33.61	3.77	25.00	37.50	35.56	4.47	25.00	40.00	36.11	3.09	32.50	40.00
nsetgen1	5.00	0.00	5.00	5.00	5.00	0.00	5.00	5.00	5.00	0.00	5.00	5.00	5.00	0.00	5.00	5.00	5.00	0.00	5.00	5.00
nsetgen2	5.00	0.00	5.00	5.00	5.00	0.00	5.00	5.00	4.89	0.33	4.00	5.00	4.89	0.33	4.00	5.00	5.00	0.00	5.00	5.00
nsetgen3	3.00	0.00	3.00	3.00	3.00	0.00	3.00	3.00	2.89	0.33	2.00	3.00	3.22	0.67	3.00	5.00	2.89	0.33	2.00	3.00
nsetgen4	3.00	0.00	3.00	3.00	3.00	0.00	3.00	3.00	2.89	0.33	2.00	3.00	3.00	0.00	3.00	3.00	2.78	0.44	2.00	3.00
Comtib1	47.75	2.19	45.00	50.00	48.75	2.70	45.00	52.50	47.78	3.17	42.50	52.50	48.61	1.32	47.50	50.00	46.94	3.25	40.00	50.00
Comtib2	37.00	1.05	35.00	37.50	39.00	3.76	35.00	47.50	38.06	4.64	32.50	47.50	38.33	2.80	35.00	45.00	36.39	1.32	35.00	37.50
Comtib3	40.00	2.64	37.50	45.00	40.25	4.48	30.00	45.00	42.28	4.52	37.50	50.00	44.44	3.91	37.50	50.00	38.94	7.29	22.50	47.50
Comtib4	46.50	2.11	45.00	50.00	47.00	3.07	42.50	50.00	44.44	6.59	32.50	52.50	48.33	2.17	45.00	52.50	45.28	2.92	42.50	50.00
nsettib1	7.90	0.32	7.00	8.00	7.60	0.52	7.00	8.00	7.33	0.87	6.00	8.00	7.89	0.33	7.00	8.00	7.44	1.01	5.00	8.00
nsettib2	5.00	0.00	5.00	5.00	5.00	0.00	5.00	5.00	5.00	0.00	5.00	5.00	4.89	0.33	4.00	5.00	5.00	0.00	5.00	5.00
nsettib3	5.00	0.00	5.00	5.00	4.90	0.32	4.00	5.00	4.89	0.33	4.00	5.00	5.00	0.00	5.00	5.00	4.89	0.33	4.00	5.00
nsettib4	5.00	0.00	5.00	5.00	4.90	0.32	4.00	5.00	4.78	0.44	4.00	5.00	5.00	0.00	5.00	5.00	5.00	0.00	5.00	5.00
Comtar1	69.50	4.83	62.50	75.00	70.25	6.40	57.50	80.00	66.11	7.08	52.50	75.00	71.94	2.08	70.00	75.00	70.33	4.19	65.00	80.00
Comtar2	60.00	3.91	55.00	65.00	62.00	1.58	60.00	65.00	57.78	4.23	52.50	62.50	60.83	1.77	57.50	62.50	59.72	4.75	50.00	65.00
Comtar3	67.75	5.83	60.00	80.00	72.55	7.58	57.50	80.00	70.00	5.00	62.50	75.00	74.72	3.41	67.50	80.00	70.56	4.29	62.50	75.00
Comtar4	72.25	5.83	62.50	80.00	74.75	3.62	67.50	80.00	70.56	5.70	60.00	75.00	73.06	5.70	62.50	82.50	70.28	5.51	62.50	77.50
nsettar1	20.50	0.85	19.00	22.00	19.90	0.99	19.00	21.00	19.33	0.87	18.00	20.00	20.11	0.93	18.00	21.00	20.11	0.78	19.00	21.00
nsettar2	16.80	0.79	16.00	18.00	17.30	1.16	16.00	19.00	14.67	1.12	13.00	17.00	16.11	0.78	15.00	18.00	16.33	1.32	15.00	18.00
nsettar3	13.70	0.67	12.00	14.00	13.10	1.45	10.00	14.00	12.25	1.79	9.00	14.00	12.67	1.32	10.00	14.00	12.78	1.30	11.00	14.00
nsettar4	13.00	0.94	11.00	14.00	13.50	0.85	12.00	15.00	13.11	1.36	11.00	14.00	12.78	1.20	11.00	14.00	13.56	1.74	10.00	16.00
dbtarstd	47.00	2.30	45.00	50.00	47.25	4.16	40.00	52.50	46.94	3.49	42.50	52.50	49.44	2.08	45.00	52.50	48.33	2.50	42.50	50.00
Comestil	102.25	2.19	100.00	105.00	104.00	5.03	97.50	115.00	100.83	1.77	100.00	105.00	101.67	2.17	100.00	105.00	102.28	3.93	95.00	108.00
Largesti	69.00	11.32	60.00	92.50	90.00	15.99	62.50	105.00	96.94	3.49	90.00	102.50	90.56	13.39	70.00	110.00	86.72	7.17	75.00	98.00

Caracteres morfológicos	P16UMBG				P18UCSBG				P20UPNBG				P22MFPB				P25UTM			
	$\bar{X}$	DP	min	max	$\bar{X}$	DP	min	max	$\bar{X}$	DP	min	max	$\bar{X}$	DP	min	max	$\bar{X}$	DP	min	max
Corcom	450.50	38.33	402.50	525.00	437.00	37.86	392.50	512.50	454.25	67.73	300.00	575.00	568.35	116.57	378.00	700.00	371.39	35.47	312.50	412.50
Corlar	417.00	42.41	362.50	475.00	379.75	28.97	345.00	432.50	400.25	45.27	312.50	450.00	496.55	114.22	327.50	712.50	355.56	37.03	300.00	422.50
v2	64.00	5.30	52.50	70.00	66.50	2.93	62.50	70.00	59.50	4.83	52.50	65.00	63.00	5.37	57.50	72.50	58.33	3.31	52.50	62.50
sc1	168.00	7.71	160.00	182.50	167.25	5.58	160.00	180.00	164.00	10.49	152.50	187.50	163.50	14.30	145.00	180.00	150.28	6.31	140.00	160.00
sc2	112.00	5.87	102.50	117.50	116.25	6.59	105.00	125.00	111.25	7.57	100.00	125.00	108.50	10.55	95.00	125.00	100.56	8.46	90.00	112.50
c1	155.75	7.64	137.50	165.00	161.75	6.88	150.00	170.00	151.75	13.39	130.00	172.50	154.75	11.33	135.00	175.00	145.00	10.90	130.00	162.50
c2	158.00	7.53	147.50	172.50	159.75	8.45	147.50	175.00	156.00	11.62	140.00	175.00	150.75	9.58	140.00	170.00	145.28	12.90	127.50	162.50
c3	90.00	9.13	72.50	102.50	93.75	5.68	87.50	105.00	90.50	7.05	80.00	97.50	85.56	7.89	72.50	102.50	79.72	4.41	72.50	87.50
d1	156.25	6.15	147.50	167.50	163.50	7.28	152.50	175.00	159.00	10.49	145.00	175.00	156.00	10.49	137.50	172.50	145.28	8.97	127.50	160.00
d2	148.75	7.48	137.50	162.50	154.75	8.12	137.50	165.00	148.25	8.00	135.00	160.00	143.25	9.86	127.50	157.50	136.39	8.21	127.50	150.00
e1	142.30	5.33	132.50	150.00	147.25	6.29	135.00	157.50	137.00	6.85	127.50	150.00	144.25	9.58	120.00	152.50	132.22	11.35	122.50	152.50
e2	130.80	8.30	120.00	142.50	130.75	5.78	122.50	137.50	122.50	7.55	112.50	140.00	130.00	8.16	112.50	140.00	120.71	5.96	112.50	130.00
f1	97.50	7.17	82.50	105.00	90.50	7.05	80.00	102.50	90.00	5.77	82.50	100.00	90.50	10.59	70.00	102.50	86.39	4.86	77.50	95.00
f2	58.75	5.92	47.50	65.00	59.50	5.99	50.00	67.50	56.75	6.98	42.50	67.50	57.25	3.62	52.50	62.50	52.50	4.84	42.50	60.00
h1	40.55	4.25	35.00	47.50	39.75	2.75	35.00	45.00	38.25	4.57	27.50	45.00	39.75	1.84	37.50	42.50	36.39	2.83	32.50	42.50
ag	47.65	3.20	42.50	54.00	47.50	3.73	40.00	52.50	44.00	5.68	30.00	50.00	52.00	3.69	45.00	57.50	48.33	1.77	45.00	50.00
g1	32.20	3.13	27.50	37.00	30.50	2.58	27.50	35.00	29.75	3.22	25.00	35.00	34.25	3.13	30.00	37.50	31.11	4.17	25.00	35.00
g2	35.00	3.54	30.00	40.00	33.05	3.94	25.00	38.00	30.75	3.13	25.00	35.00	37.00	2.58	32.50	40.00	32.50	2.50	30.00	37.50
ps2	16.65	1.90	12.50	19.00	17.25	1.84	15.00	20.00	16.25	1.77	12.50	17.50	19.25	1.21	17.50	20.00	17.50	1.77	15.00	20.00
ps1	17.25	2.49	12.50	20.00	17.75	2.49	12.50	20.00	17.75	2.49	12.50	20.00	19.25	3.13	15.00	25.00	16.67	1.25	15.00	17.50
h3	34.06	2.02	30.00	37.50	33.25	4.72	25.00	37.50	31.25	3.17	27.50	37.50	35.75	2.90	32.50	40.00	35.28	1.95	32.50	37.50
h2	31.22	2.30	27.50	36.00	33.75	4.12	25.00	37.50	31.50	3.94	25.00	37.50	36.75	3.13	32.50	42.50	33.06	2.43	27.50	35.00

Caracteres morfológicos	P16UMBG				P18UCSBG				P20UPNBG				P22MFPB				P25UTM			
	$\bar{X}$	DP	min	max	$\bar{X}$	DP	min	max	$\bar{X}$	DP	min	max	$\bar{X}$	DP	min	max	$\bar{X}$	DP	min	max
Comcox1	58.30	6.28	50.00	65.00	54.72	4.32	50.00	62.50	54.00	8.60	42.50	70.00	54.75	7.95	45.00	67.50	56.39	6.63	50.00	65.00
Comcox2	43.25	6.67	35.00	52.50	39.50	4.22	35.00	50.00	36.25	4.45	32.50	45.00	51.25	2.95	45.00	55.00	51.67	4.84	45.00	62.50
Comcox3	38.43	3.72	32.50	47.50	35.83	4.25	25.00	40.00	36.75	4.87	27.50	45.00	41.50	5.80	30.00	50.00	36.67	2.80	32.50	40.00
Comcox4	42.22	7.40	30.00	50.00	35.28	4.16	25.00	40.00	31.11	4.58	25.00	37.50	46.94	5.75	37.50	55.00	36.88	2.72	32.50	42.50
nsetcox1	1.90	0.32	1.00	2.00	2.00	0.00	2.00	2.00	2.00	0.00	2.00	2.00	2.00	0.00	2.00	2.00	2.00	0.00	2.00	2.00
nsetcox2	1.90	0.32	1.00	2.00	2.00	0.00	2.00	2.00	2.00	0.00	2.00	2.00	1.70	0.48	1.00	2.00	1.89	0.33	1.00	2.00
nsetcox3	1.00	0.00	1.00	1.00	1.00	0.00	1.00	1.00	1.00	0.00	1.00	1.00	1.00	0.00	1.00	1.00	1.00	0.00	1.00	1.00
nsetcox4	1.00	0.00	1.00	1.00	1.00	0.00	1.00	1.00	1.00	0.00	1.00	1.00	1.00	0.00	1.00	1.00	1.00	0.00	1.00	1.00
Comtroc1	31.25	4.29	25.00	37.50	29.50	2.30	25.00	32.50	33.50	2.69	30.00	37.50	25.25	5.58	20.00	37.50	30.83	4.84	25.00	40.00
Comtroc2	26.25	4.60	20.00	37.50	24.00	2.69	17.50	27.50	27.75	3.62	25.00	35.00	26.00	3.94	20.00	32.50	26.39	2.53	22.50	30.00
Comtroc3	26.39	2.91	22.50	30.00	26.00	2.11	25.00	30.00	29.50	6.10	20.00	37.50	30.25	5.20	22.50	37.50	25.83	2.80	20.00	30.00
Comtroc4	27.50	5.14	20.00	37.50	25.83	2.36	22.50	30.00	27.00	2.84	22.50	30.00	27.25	3.22	22.50	32.50	25.00	3.06	17.50	27.50
nsettro1	1.00	0.00	1.00	1.00	1.00	0.00	1.00	1.00	1.00	0.00	1.00	1.00	1.00	0.00	1.00	1.00	1.00	0.00	1.00	1.00
nsettro2	1.00	0.00	1.00	1.00	1.00	0.00	1.00	1.00	1.00	0.00	1.00	1.00	1.00	0.00	1.00	1.00	1.00	0.00	1.00	1.00
nsettro3	1.00	0.00	1.00	1.00	1.00	0.00	1.00	1.00	1.00	0.00	1.00	1.00	1.00	0.00	1.00	1.00	1.00	0.00	1.00	1.00
nsettro4	1.00	0.00	1.00	1.00	1.00	0.00	1.00	1.00	1.00	0.00	1.00	1.00	1.00	0.00	1.00	1.00	1.00	0.00	1.00	1.00
Comfem1	90.75	6.88	77.50	100.00	89.50	2.84	85.00	95.00	86.75	4.26	80.00	92.50	91.25	8.60	75.00	102.50	86.17	4.08	80.00	93.00
Comfem2	59.75	5.20	50.00	67.50	62.00	3.87	55.00	65.00	60.25	3.81	52.50	65.00	64.25	4.72	57.50	72.50	59.22	2.87	55.00	63.00
Comfem3	61.25	2.70	55.00	65.00	61.00	5.30	50.00	67.50	59.00	3.37	55.00	62.50	64.75	3.43	60.00	70.00	60.00	3.31	55.00	65.00
Comfem4	69.25	3.92	62.50	77.50	64.75	5.46	55.00	70.00	70.50	4.22	62.50	75.00	67.75	6.50	57.50	77.50	63.33	6.37	57.50	75.00
nsetfem1	7.90	0.32	7.00	8.00	7.70	0.48	7.00	8.00	7.40	0.52	7.00	8.00	8.00	0.00	8.00	8.00	7.89	0.33	7.00	8.00
nsetfem2	5.10	0.99	3.00	6.00	5.00	0.94	4.00	6.00	5.10	0.74	4.00	6.00	5.70	0.48	5.00	6.00	5.44	0.53	5.00	6.00
nsetfem3	3.00	0.00	3.00	3.00	3.10	0.32	3.00	4.00	3.00	0.00	3.00	3.00	3.00	0.00	3.00	3.00	3.11	0.33	3.00	4.00
nsetfem4	1.00	0.00	1.00	1.00	1.10	0.32	1.00	2.00	1.20	0.63	1.00	3.00	1.00	0.00	1.00	1.00	1.00	0.00	1.00	1.00
Comgenu1	45.50	3.29	40.00	50.00	43.25	2.37	40.00	47.50	44.00	2.42	40.00	47.50	45.50	2.84	40.00	50.00	43.89	1.82	42.50	47.50
Comgenu2	39.50	1.58	37.50	42.50	38.00	1.97	35.00	42.50	38.25	1.69	37.50	42.50	37.50	1.18	35.00	40.00	37.22	0.83	35.00	37.50
Comgenu3	35.00	3.54	27.50	40.00	34.50	2.30	30.00	37.50	36.50	3.16	32.50	40.00	36.00	5.92	27.50	47.50	34.72	2.92	30.00	37.50
Comgenu4	37.00	2.58	32.50	40.00	36.50	2.42	30.00	37.50	35.50	2.58	30.00	37.50	36.00	2.69	32.50	40.00	36.94	2.08	32.50	40.00

Caracteres morfológicos	P16UMBG				P18UCSBG				P20UPNBG				P22MFPB				P25UTM			
	$\bar{X}$	DP	min	max	$\bar{X}$	DP	min	max	$\bar{X}$	DP	min	max	$\bar{X}$	DP	min	max	$\bar{X}$	DP	min	max
nsetgen1	5.00	0.00	5.00	5.00	5.00	0.00	5.00	5.00	5.00	0.00	5.00	5.00	5.00	0.00	5.00	5.00	4.89	0.33	4.00	5.00
nsetgen2	4.90	0.32	4.00	5.00	5.00	0.00	5.00	5.00	5.00	0.00	5.00	5.00	4.90	0.32	4.00	5.00	5.00	0.00	5.00	5.00
nsetgen3	3.20	0.63	3.00	5.00	3.00	0.00	3.00	3.00	3.00	0.00	3.00	3.00	3.00	0.00	3.00	3.00	3.00	0.00	3.00	3.00
nsetgen4	2.80	0.42	2.00	3.00	3.00	0.00	3.00	3.00	2.90	0.32	2.00	3.00	3.00	0.00	3.00	3.00	2.78	0.44	2.00	3.00
Comtib1	49.25	1.69	47.50	52.50	48.75	2.12	45.00	52.50	48.50	2.42	45.00	52.50	49.25	2.37	45.00	52.50	48.61	1.82	45.00	50.00
Comtib2	37.50	1.18	35.00	40.00	36.25	1.77	32.50	37.50	37.00	1.05	35.00	37.50	36.25	2.12	32.50	40.00	38.33	2.80	35.00	42.50
Comtib3	44.25	4.87	32.50	50.00	42.50	1.67	40.00	45.00	44.00	3.57	37.50	47.50	45.50	7.25	32.50	55.00	45.28	2.92	40.00	50.00
Comtib4	48.75	2.95	45.00	52.50	43.25	3.55	35.00	47.50	47.25	3.62	42.50	52.50	46.50	3.57	40.00	50.00	43.61	4.17	37.50	50.00
nsettib1	8.00	0.00	8.00	8.00	7.60	0.70	6.00	8.00	7.90	0.32	7.00	8.00	7.90	0.32	7.00	8.00	7.67	0.71	6.00	8.00
nsettib2	5.00	0.00	5.00	5.00	5.00	0.00	5.00	5.00	5.00	0.00	5.00	5.00	5.00	0.00	5.00	5.00	5.00	0.00	5.00	5.00
nsettib3	4.90	0.32	4.00	5.00	5.00	0.00	5.00	5.00	4.90	0.32	4.00	5.00	4.90	0.32	4.00	5.00	4.89	0.33	4.00	5.00
nsettib4	5.00	0.00	5.00	5.00	4.90	0.32	4.00	5.00	4.90	0.32	4.00	5.00	5.00	0.00	5.00	5.00	4.78	0.44	4.00	5.00
Comtar1	71.75	5.41	62.50	80.00	71.25	2.95	67.50	75.00	74.00	5.43	65.00	80.00	71.57	3.72	65.00	75.00	72.78	4.41	62.50	77.50
Comtar2	61.05	4.76	55.00	70.00	61.00	2.42	57.50	65.00	64.50	3.07	60.00	70.00	60.62	9.19	37.50	70.00	60.83	5.59	50.00	67.50
Comtar3	72.25	5.33	62.50	80.00	73.50	5.92	65.00	82.50	75.56	3.29	70.00	82.50	78.00	3.29	72.50	82.50	75.28	2.32	72.50	80.00
Comtar4	73.25	5.90	62.50	85.00	77.55	8.40	62.50	88.00	79.25	3.55	75.00	82.50	82.75	3.81	77.50	87.50	79.17	3.06	75.00	85.00
nsettar1	19.80	1.23	18.00	21.00	20.00	0.94	18.00	21.00	19.90	0.74	19.00	21.00	20.20	1.62	16.00	21.00	20.33	0.71	19.00	21.00
nsettar2	15.80	1.32	14.00	17.00	17.10	1.45	15.00	19.00	16.20	0.42	16.00	17.00	16.76	1.22	14.00	18.00	16.22	0.97	15.00	18.00
nsettar3	11.50	1.96	9.00	14.00	12.90	0.99	11.00	14.00	12.89	1.37	10.00	15.00	13.80	0.63	12.00	14.00	13.33	1.00	12.00	14.00
nsettar4	12.10	2.13	9.00	14.00	13.10	0.88	12.00	15.00	13.70	0.48	13.00	14.00	13.40	0.84	12.00	14.00	13.89	0.60	13.00	15.00
dbtarstd	48.50	2.42	42.50	50.00	49.50	2.84	45.00	52.50	48.55	2.40	45.00	52.50	48.50	6.15	35.00	57.50	46.94	1.67	45.00	50.00
Comestil	101.00	7.56	87.50	115.00	101.30	2.57	100.00	108.00	100.50	4.05	92.50	107.50	108.25	3.74	102.50	112.50	107.50	5.00	100.00	115.00
Largesti	94.38	5.50	82.50	100.00	85.75	9.72	62.50	95.00	89.05	8.52	75.00	100.00	96.50	18.07	50.00	112.50	97.83	6.52	83.00	105.00

Caracteres morfológicos	P28MGU				P31MGSJ				P34MFU				P42MGU				P47MCOE			
	X̄	DP	min	max	X̄	DP	min	max	X̄	DP	min	max	X̄	DP	min	max	X̄	DP	min	max
Corcom	431.00	81.69	312.50	590.00	489.00	54.94	410.00	562.50	412.80	43.76	330.00	488.00	415.25	49.22	325.00	487.50	438.75	35.28	367.50	497.50
Corlar	357.05	51.39	282.50	438.00	454.00	55.85	362.50	525.00	392.75	48.85	325.00	475.00	389.76	44.68	287.50	462.50	443.30	45.47	370.00	500.00
v2	63.50	3.57	57.50	67.50	63.50	5.43	55.00	70.00	62.05	2.75	57.50	65.00	62.00	6.32	52.50	75.00	58.50	3.57	52.50	65.00
sc1	161.50	7.75	152.50	180.00	154.44	6.85	147.50	170.00	161.75	5.90	150.00	170.00	156.25	8.68	145.00	170.00	149.00	5.68	142.50	160.00
sc2	109.50	8.23	90.00	117.50	106.25	7.66	87.50	112.50	107.30	4.39	102.50	115.00	102.00	9.49	85.00	115.00	97.50	5.65	87.50	107.50
c1	153.00	8.40	145.00	170.00	145.75	10.61	122.50	162.50	151.25	7.00	145.00	162.50	148.25	7.55	137.50	160.00	145.56	5.62	135.00	155.00
c2	153.89	5.67	145.00	162.50	149.17	5.89	140.00	160.00	151.00	6.48	137.50	162.50	149.72	8.78	132.50	165.00	148.75	5.92	140.00	157.50
c3	86.75	6.98	72.50	95.00	85.75	7.46	75.00	100.00	84.50	7.53	72.50	95.00	87.00	9.34	75.00	102.50	81.00	5.80	72.50	90.00
d1	155.75	8.08	142.50	167.50	145.31	5.71	137.50	157.50	151.25	7.57	137.50	162.50	153.00	7.98	140.00	165.00	147.50	7.82	135.00	157.50
d2	149.00	7.75	137.50	162.50	145.25	4.78	137.50	152.50	145.75	6.24	137.50	160.00	139.75	8.29	125.00	152.50	140.75	7.64	130.00	152.50
e1	136.50	6.69	125.00	150.00	130.75	6.46	120.00	137.50	133.25	5.01	125.00	140.00	137.25	8.70	122.50	147.50	133.75	5.68	125.00	142.50
e2	124.50	7.53	112.50	140.00	122.75	5.71	115.00	135.00	126.00	7.09	110.00	135.00	123.67	9.69	112.50	143.00	120.75	7.17	112.50	132.50
f1	93.00	5.24	82.50	102.50	90.25	4.63	82.50	97.50	90.50	4.38	82.50	97.50	91.39	7.83	77.50	100.00	92.00	4.05	82.50	97.50
f2	57.25	5.46	50.00	70.00	58.00	6.75	47.50	70.00	58.00	5.87	47.50	67.50	58.25	5.66	50.00	67.50	60.75	5.14	52.50	70.00
h1	40.00	4.08	35.00	50.00	39.00	3.94	32.50	42.50	40.00	3.54	37.50	47.50	38.00	2.30	35.00	42.50	38.75	1.77	37.50	42.50
ag	50.00	7.07	37.50	62.50	50.75	4.42	40.00	55.00	54.00	2.93	50.00	60.00	51.00	2.93	45.00	55.00	53.25	3.55	47.50	57.50
g1	32.50	3.33	27.50	37.50	32.75	2.19	30.00	35.00	33.50	2.11	30.00	37.50	32.75	2.75	27.50	37.50	34.25	3.13	30.00	40.00
g2	35.25	2.75	30.00	37.50	35.75	2.06	32.50	40.00	36.75	3.92	30.00	42.50	37.50	2.36	32.50	40.00	38.00	2.84	35.00	42.50
ps2	18.50	2.42	15.00	22.50	20.75	8.08	15.00	42.50	18.50	1.29	17.50	20.00	18.55	2.22	15.00	23.00	20.00	1.18	17.50	22.50
ps1	17.75	1.84	15.00	20.00	19.75	2.49	17.50	25.00	20.00	2.89	15.00	25.00	20.75	2.37	17.50	25.00	22.75	2.19	20.00	25.00
h3	35.75	2.06	32.50	37.50	36.50	2.69	32.50	40.00	36.50	2.11	32.50	40.00	37.25	1.42	35.00	40.00	37.50	2.36	32.50	40.00
h2	35.00	2.36	30.00	37.50	35.50	3.29	30.00	42.50	32.00	7.15	20.00	40.00	37.00	2.30	32.50	40.00	37.00	2.58	32.50	40.00

Caracteres morfológicos	P28MGU				P31MGSJ				P34MFU				P42MGU				P47MCOE			
	$\bar{X}$	DP	min	max	$\bar{X}$	DP	min	max	$\bar{X}$	DP	min	max	$\bar{X}$	DP	min	max	$\bar{X}$	DP	min	max
Comcox1	58.30	6.28	50.00	70.00	60.50	11.11	50.00	75.00	69.00	9.80	55.00	82.50	60.00	6.35	50.00	70.00	62.00	9.19	50.00	72.50
Comcox2	50.00	6.01	42.50	62.50	55.25	9.39	42.50	67.50	58.55	8.97	43.00	72.50	55.75	5.66	50.00	62.50	57.00	8.48	42.50	70.00
Comcox3	38.33	4.86	30.00	50.00	43.61	5.29	37.50	50.00	43.50	6.79	37.50	55.00	44.00	6.79	37.50	55.00	47.50	7.17	35.00	57.50
Comcox4	43.25	7.36	37.50	57.50	48.00	12.74	32.50	62.50	43.25	9.93	32.50	62.50	42.75	7.68	30.00	52.50	50.25	14.12	37.50	82.50
nsetcox1	2.00	0.00	2.00	2.00	2.00	0.00	2.00	2.00	2.00	0.00	2.00	2.00	2.00	0.00	2.00	2.00	1.90	0.32	1.00	2.00
nsetcox2	2.00	0.00	2.00	2.00	1.90	0.32	1.00	2.00	2.00	0.00	2.00	2.00	1.90	0.32	1.00	2.00	1.90	0.32	1.00	2.00
nsetcox3	1.00	0.00	1.00	1.00	1.00	0.00	1.00	1.00	1.00	0.00	1.00	1.00	1.00	0.00	1.00	1.00	1.00	0.00	1.00	1.00
nsetcox4	1.00	0.00	1.00	1.00	1.00	0.00	1.00	1.00	1.00	0.00	1.00	1.00	1.00	0.00	1.00	1.00	1.00	0.00	1.00	1.00
Comtroc1	30.50	4.38	25.00	37.50	31.00	3.16	25.00	35.00	32.50	4.25	25.00	37.50	32.00	4.38	27.50	40.00	33.00	3.87	27.50	37.50
Comtroc2	27.50	2.89	25.00	32.50	28.25	3.13	25.00	32.50	25.75	1.69	25.00	30.00	28.50	3.16	25.00	35.00	29.00	3.16	25.00	35.00
Comtroc3	29.75	2.75	25.00	32.50	28.00	4.83	22.50	37.50	29.00	3.37	25.00	32.50	28.75	3.95	25.00	37.50	27.00	2.58	25.00	32.50
Comtroc4	29.75	3.22	25.00	35.00	29.25	3.34	25.00	32.50	30.25	5.20	25.00	37.50	28.50	4.12	25.00	35.00	28.25	4.42	20.00	35.00
nsettro1	1.00	0.00	1.00	1.00	1.00	0.00	1.00	1.00	1.00	0.00	1.00	1.00	1.00	0.00	1.00	1.00	1.00	0.00	1.00	1.00
nsettro2	1.00	0.00	1.00	1.00	1.00	0.00	1.00	1.00	1.00	0.00	1.00	1.00	1.00	0.00	1.00	1.00	1.00	0.00	1.00	1.00
nsettro3	1.00	0.00	1.00	1.00	1.00	0.00	1.00	1.00	1.00	0.00	1.00	1.00	1.00	0.00	1.00	1.00	1.00	0.00	1.00	1.00
nsettro4	1.00	0.00	1.00	1.00	1.00	0.00	1.00	1.00	1.00	0.00	1.00	1.00	1.00	0.00	1.00	1.00	1.00	0.00	1.00	1.00
Comfem1	89.50	4.83	82.50	97.50	88.00	5.24	80.00	95.00	89.25	5.28	80.00	100.00	90.00	3.33	85.00	95.00	89.75	3.43	85.00	95.00
Comfem2	62.50	5.40	55.00	70.00	60.25	3.62	55.00	65.00	62.25	4.48	55.00	70.00	59.50	4.38	50.00	65.00	61.50	3.57	55.00	67.50
Comfem3	59.30	6.90	50.00	72.50	60.25	3.43	55.00	65.00	63.30	3.98	57.50	68.00	58.25	7.17	50.00	75.00	59.50	3.07	55.00	62.50
Comfem4	70.05	6.93	57.50	78.00	71.75	6.78	62.50	80.00	68.25	4.57	62.50	75.00	64.25	6.67	55.00	75.00	66.75	4.42	60.00	75.00
nsetfem1	7.90	0.32	7.00	8.00	8.00	0.00	8.00	8.00	8.00	0.00	8.00	8.00	8.00	0.00	8.00	8.00	8.00	0.00	8.00	8.00
nsetfem2	5.80	0.42	5.00	6.00	5.80	0.42	5.00	6.00	6.00	0.00	6.00	6.00	5.90	0.32	5.00	6.00	5.90	0.32	5.00	6.00
nsetfem3	2.90	0.32	2.00	3.00	3.00	0.00	3.00	3.00	3.00	0.00	3.00	3.00	3.00	0.00	3.00	3.00	3.00	0.00	3.00	3.00
nsetfem4	1.00	0.00	1.00	1.00	1.00	0.00	1.00	1.00	1.00	0.00	1.00	1.00	1.00	0.00	1.00	1.00	1.00	0.00	1.00	1.00
Comgenu1	44.00	2.69	40.00	50.00	44.50	3.29	40.00	47.50	44.50	1.97	42.50	47.50	46.25	2.70	42.50	50.00	45.75	2.90	42.50	50.00
Comgenu2	38.50	2.69	35.00	45.00	38.75	2.12	37.50	42.50	39.00	2.11	37.50	42.50	37.75	1.84	35.00	40.00	38.25	1.69	35.00	40.00
Comgenu3	36.25	4.29	30.00	45.00	36.50	3.57	30.00	40.00	36.00	2.93	30.00	40.00	37.25	1.42	35.00	40.00	36.75	2.37	32.50	40.00
Comgenu4	36.75	2.06	32.50	40.00	38.50	5.92	27.50	50.00	38.25	3.34	32.50	45.00	38.00	2.84	35.00	45.00	38.50	3.37	32.50	42.50

Caracteres morfológicos	P28MGU				P31MGSJ				P34MFU				P42MGU				P47MCOE			
	$\bar{X}$	DP	min	max	$\bar{X}$	DP	min	max	$\bar{X}$	DP	min	max	$\bar{X}$	DP	min	max	$\bar{X}$	DP	min	max
nsetgen1	5.00	0.00	5.00	5.00	5.00	0.00	5.00	5.00	5.00	0.00	5.00	5.00	5.00	0.00	5.00	5.00	5.00	0.00	5.00	5.00
nsetgen2	4.60	0.97	2.00	5.00	5.00	0.00	5.00	5.00	4.90	0.32	4.00	5.00	5.00	0.00	5.00	5.00	5.00	0.00	5.00	5.00
nsetgen3	2.80	0.42	2.00	3.00	2.90	0.32	2.00	3.00	3.00	0.00	3.00	3.00	3.00	0.00	3.00	3.00	3.00	0.00	3.00	3.00
nsetgen4	3.00	0.00	3.00	3.00	3.00	0.00	3.00	3.00	3.00	0.00	3.00	3.00	2.90	0.32	2.00	3.00	3.00	0.00	3.00	3.00
Comtib1	47.75	1.84	45.00	50.00	50.00	1.67	47.50	52.50	49.50	1.58	47.50	52.50	50.50	2.30	47.50	55.00	49.25	2.65	45.00	52.50
Comtib2	37.00	1.97	35.00	40.00	39.00	2.69	37.50	45.00	37.75	2.19	35.00	42.50	38.00	3.29	35.00	45.00	37.50	2.36	35.00	42.50
Comtib3	40.00	3.73	35.00	47.50	44.75	3.22	37.50	47.50	43.50	4.74	35.00	50.00	44.25	3.55	37.50	50.00	41.50	3.76	37.50	47.50
Comtib4	46.50	5.03	37.50	55.00	49.00	4.12	40.00	55.00	49.50	3.07	45.00	55.00	45.25	5.95	37.50	57.50	49.50	3.69	40.00	52.50
nsettib1	7.90	0.32	7.00	8.00	7.90	0.32	7.00	8.00	8.00	0.00	8.00	8.00	8.00	0.00	8.00	8.00	8.00	0.00	8.00	8.00
nsettib2	4.90	0.32	4.00	5.00	5.00	0.00	5.00	5.00	5.00	0.00	5.00	5.00	4.90	0.32	4.00	5.00	5.00	0.00	5.00	5.00
nsettib3	4.90	0.32	4.00	5.00	5.00	0.00	5.00	5.00	4.90	0.32	4.00	5.00	5.00	0.00	5.00	5.00	5.10	0.32	5.00	6.00
nsettib4	5.00	0.00	5.00	5.00	4.90	0.32	4.00	5.00	5.00	0.00	5.00	5.00	5.00	0.00	5.00	5.00	5.00	0.00	5.00	5.00
Comtar1	72.00	4.68	65.00	80.00	75.80	3.46	70.00	83.00	75.00	3.91	70.00	85.00	74.00	3.76	65.00	77.50	72.00	4.53	62.50	77.50
Comtar2	61.25	4.89	55.00	70.00	63.55	2.09	60.00	67.50	64.00	2.42	62.50	70.00	62.75	3.43	55.00	67.50	61.00	4.74	50.00	67.50
Comtar3	74.44	3.69	67.50	80.00	74.25	3.92	70.00	82.50	76.75	3.74	70.00	82.50	76.75	4.87	67.50	85.00	72.25	4.63	65.00	77.50
Comtar4	77.00	4.53	72.50	87.50	80.25	3.81	75.00	87.50	82.50	5.65	75.00	95.00	77.25	5.83	65.00	87.50	79.00	6.89	65.00	87.50
nsettar1	20.60	0.97	19.00	22.00	20.70	0.48	20.00	21.00	20.90	0.88	19.00	22.00	20.50	1.08	18.00	21.00	20.90	0.57	20.00	22.00
nsettar2	17.00	0.67	16.00	18.00	17.20	1.03	16.00	18.00	16.20	1.03	15.00	18.00	17.40	0.97	16.00	18.00	17.40	1.07	16.00	19.00
nsettar3	13.33	1.05	11.00	14.00	12.90	0.88	12.00	14.00	13.60	1.26	10.00	14.00	14.10	0.88	13.00	16.00	13.30	0.95	12.00	14.00
nsettar4	13.50	0.71	12.00	14.00	13.10	0.88	12.00	14.00	14.00	0.47	13.00	15.00	14.10	0.57	13.00	15.00	14.00	0.00	14.00	14.00
dbtarstd	46.25	2.12	42.50	50.00	49.50	1.97	47.50	52.50	47.75	2.49	45.00	50.00	48.75	2.12	45.00	52.50	48.25	2.65	42.50	50.00
Comestil	101.00	6.89	85.00	110.00	102.25	3.62	97.50	110.00	105.50	4.68	100.00	112.50	103.25	4.09	97.50	110.00	105.75	5.01	100.00	112.50
Largesti	87.25	12.22	70.00	107.50	103.00	6.43	92.50	112.50	98.75	8.92	87.50	115.00	94.50	11.47	75.00	112.50	107.25	7.50	100.00	125.00

Caracteres morfológicos	P51MGV				P54ULG			
	$\bar{X}$	DP	min	max	$\bar{X}$	DP	min	max
Corcom	423.25	30.60	375.00	470.00	448.00	44.34	350.00	500.00
Corlar	365.00	19.33	325.00	392.50	363.75	27.47	297.50	395.00
v2	66.50	5.30	55.00	72.50	66.50	6.26	57.50	77.50
sc1	165.00	15.18	137.50	185.00	164.00	9.73	140.00	175.00
sc2	107.75	11.75	82.50	120.00	111.00	9.87	92.50	125.00
c1	154.00	11.74	130.00	167.50	156.67	8.50	135.00	165.00
c2	161.00	12.81	137.50	180.00	161.55	10.91	140.00	175.00
c3	92.75	11.75	77.50	117.50	98.00	8.80	87.50	112.50
d1	156.00	11.44	137.50	170.00	161.50	10.94	135.00	172.50
d2	153.75	13.08	125.00	170.00	153.25	10.41	125.00	160.00
e1	142.75	11.63	125.00	155.00	148.61	9.06	125.00	157.50
e2	129.00	8.99	112.50	142.50	131.50	8.35	110.00	140.00
f1	93.25	8.17	82.50	110.00	95.00	7.82	80.00	105.00
f2	55.30	6.35	45.00	63.00	62.75	7.40	50.00	72.50
h1	39.25	2.90	35.00	42.50	40.25	2.19	37.50	42.50
ag	53.75	4.29	47.50	62.50	52.50	2.64	50.00	57.50
g1	34.75	2.49	30.00	37.50	34.25	2.65	30.00	40.00
g2	39.50	3.87	32.50	45.00	38.50	2.69	35.00	42.50
ps2	19.00	1.29	17.50	20.00	19.50	1.58	17.50	22.50
ps1	20.00	2.89	17.50	27.50	19.50	1.58	17.50	22.50
h3	35.50	2.30	32.50	40.00	36.00	2.42	32.50	40.00
h2	35.25	2.49	30.00	37.50	35.50	2.58	30.00	37.50
Comcox1	69.25	10.14	50.00	80.00	69.80	8.24	50.00	77.50
Comcox2	57.25	4.32	50.00	62.50	55.75	3.55	52.50	62.50
Comcox3	50.25	6.61	37.50	62.50	49.25	6.67	40.00	65.00
Comcox4	47.50	4.08	37.50	50.00	52.25	4.16	42.50	57.50
nsetcox1	2.00	0.00	2.00	2.00	2.00	0.00	2.00	2.00
nsetcox2	2.00	0.00	2.00	2.00	2.00	0.00	2.00	2.00
nsetcox3	1.00	0.00	1.00	1.00	1.00	0.00	1.00	1.00
nsetcox4	1.00	0.00	1.00	1.00	1.00	0.00	1.00	1.00
Comtroc1	29.50	3.29	25.00	35.00	28.50	3.37	25.00	35.00
Comtroc2	24.25	2.65	20.00	30.00	25.25	4.16	20.00	32.50
Comtroc3	26.25	3.95	17.50	30.00	27.50	2.64	25.00	32.50
Comtroc4	26.75	4.87	20.00	32.50	25.25	2.75	20.00	30.00
nsettro1	1.00	0.00	1.00	1.00	1.00	0.00	1.00	1.00
nsettro2	1.00	0.00	1.00	1.00	1.00	0.00	1.00	1.00
nsettro3	1.00	0.00	1.00	1.00	1.00	0.00	1.00	1.00
nsettro4	1.00	0.00	1.00	1.00	1.00	0.00	1.00	1.00

Caracteres morfológicos	P51MGV				P54ULG			
	$\bar{X}$	DP	min	max	$\bar{X}$	DP	min	max
Comfem1	91.50	6.79	80.00	100.00	94.25	5.90	85.00	105.00
Comfem2	62.00	3.69	55.00	67.50	65.00	4.25	55.00	70.00
Comfem3	63.75	6.26	52.50	72.50	62.50	7.17	50.00	72.50
Comfem4	69.75	6.17	57.50	77.50	74.50	5.11	62.50	82.50
nsetfem1	7.90	0.32	7.00	8.00	7.90	0.32	7.00	8.00
nsetfem2	6.00	0.00	6.00	6.00	5.80	0.42	5.00	6.00
nsetfem3	3.00	0.00	3.00	3.00	3.00	0.00	3.00	3.00
nsetfem4	1.00	0.00	1.00	1.00	1.00	0.00	1.00	1.00
Comgenu1	45.00	2.36	40.00	47.50	46.75	2.65	42.50	50.00
Comgenu2	39.25	2.90	37.50	45.00	40.50	2.84	35.00	45.00
Com	35.75	2.90	32.50	40.00	39.50	3.50	35.00	47.50
Comgenu4	38.25	2.65	35.00	42.50	40.25	2.19	37.50	42.50
nsetgen1	5.00	0.00	5.00	5.00	5.00	0.00	5.00	5.00
nsetgen2	5.00	0.00	5.00	5.00	5.00	0.00	5.00	5.00
nsetgen3	3.00	0.00	3.00	3.00	3.00	0.00	3.00	3.00
nsetgen4	3.00	0.00	3.00	3.00	3.00	0.00	3.00	3.00
Comtib1	50.75	2.90	45.00	55.00	51.75	2.37	47.50	55.00
Comtib2	37.50	2.04	32.50	40.00	39.50	2.30	37.50	45.00
Comtib3	45.50	1.05	45.00	47.50	45.75	2.90	42.50	50.00
Comtib4	46.75	2.65	42.50	50.00	49.00	5.16	35.00	52.50
nsettib1	7.90	0.32	7.00	8.00	8.00	0.00	8.00	8.00
nsettib2	5.00	0.00	5.00	5.00	5.00	0.00	5.00	5.00
nsettib3	4.90	0.32	4.00	5.00	5.00	0.00	5.00	5.00
nsettib4	5.00	0.00	5.00	5.00	5.00	0.00	5.00	5.00
Comtar1	78.50	5.03	72.50	87.50	82.00	4.22	75.00	87.50
Comtar2	66.00	3.76	62.50	75.00	69.55	2.65	65.00	73.00
Comtar3	79.80	3.67	75.00	85.00	85.00	4.25	77.50	90.00
Comtar4	83.75	6.15	75.00	95.00	87.25	5.95	77.50	95.00
nsettar1	20.90	0.32	20.00	21.00	21.00	0.00	21.00	21.00
nsettar2	17.70	0.67	16.00	18.00	18.00	0.00	18.00	18.00
nsettar3	14.10	0.32	14.00	15.00	14.00	0.00	14.00	14.00
nsettar4	13.90	0.32	13.00	14.00	14.00	0.00	14.00	14.00
dbtarstd	50.75	2.06	47.50	55.00	51.25	2.12	47.50	55.00
Comestil	109.00	4.44	100.00	112.50	104.00	3.16	100.00	110.00
Largesti	92.75	2.75	87.50	95.00	91.50	5.68	85.00	100.00

O estudo de morfologia comparativa é uma ferramenta útil para a separação de grupos problemáticos. Nos últimos anos, esta abordagem tem obtido avanços importantes em estudos taxonômicos (LATTIG et al., 2007). Técnicas estatísticas são, hoje, rotineiramente aplicadas a este tipo de estudos, por exemplo, em uma série de dados morfométricos, através da análise de medidas lineares (PRIETO et al., 2009).

A utilização de análise multivariada em morfometria pode fornecer informações sobre a variabilidade intra e interespecífica e contribui para o conhecimento taxonômico do grupo de ácaros estudado (NAVIA et al, 2009). A análise dos componentes principais (ACP) é utilizada para avaliar padrões de variação morfológica e identificar os caracteres morfológicos que mais contribuem para a diferenciação morfológica entre populações (SOURASSOU et al., 2011). A utilização da ACP foi a mais indicada para este trabalho, para analisar as medidas lineares das características avaliadas de forma conjunta, através da comparação das populações estudadas.

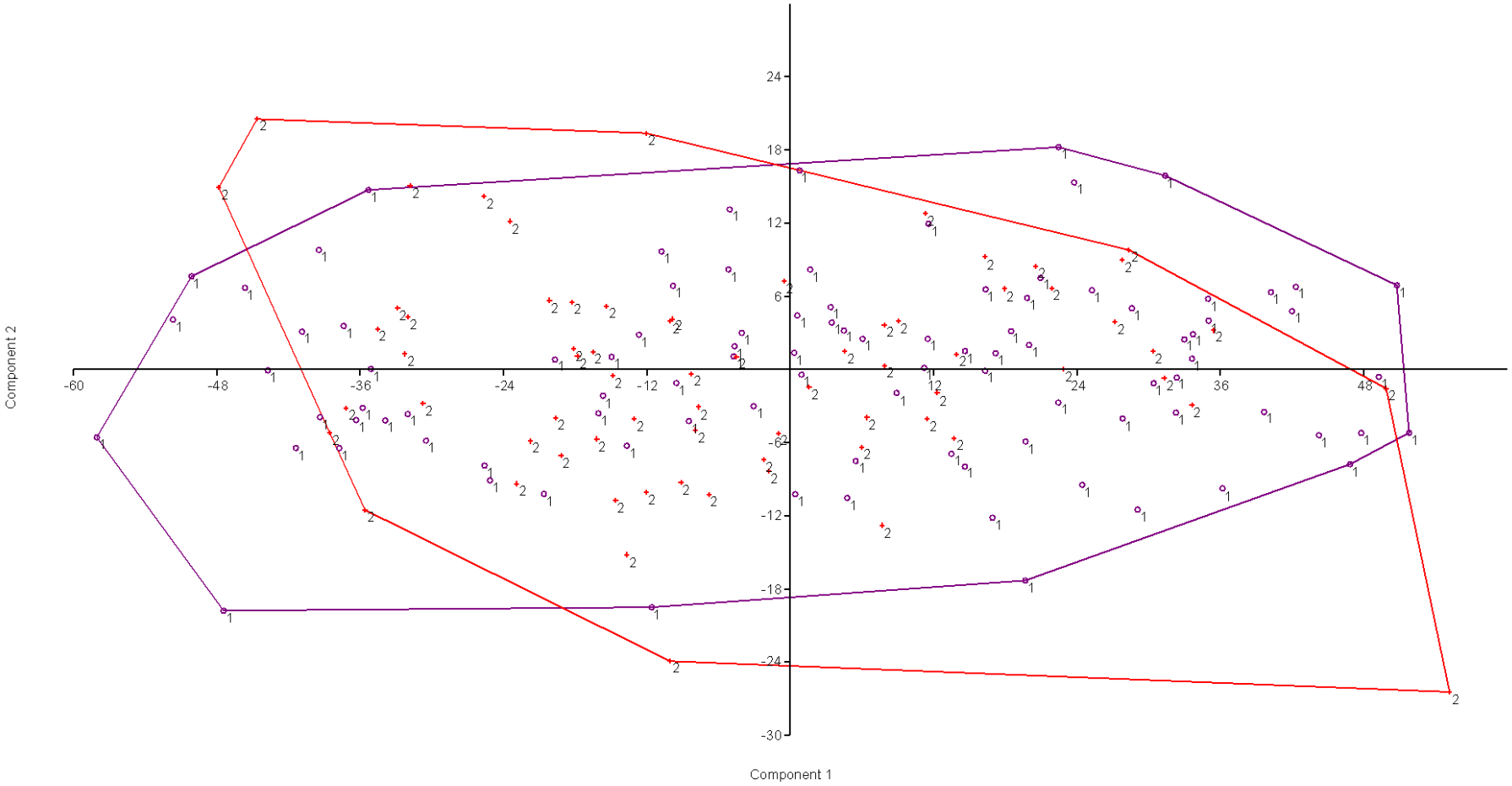
Com base nos resultados obtidos (Tabela 5), foram realizadas análises preliminares, obtendo-se como resultados iniciais um maior percentual de variação nas setas dorsais, sendo utilizadas então 15 medidas de comprimentos das setas *v2, sc1, sc2, c1, c2, c3, d1, d2, e1, e2, f1, f2* e o conjunto de setas h (*h1, h2 e h3*). Os três primeiros componentes (PC1, PC2 e PC3) foram responsáveis por 74,54% da variação (Tabela 6) e o resultado das comparações entre populações de macieiras e videiras para as 15 características avaliadas encontra-se na Figura 11.

Tabela 6 - Percentual de variação encontrado através de ACP (análise dos componentes principais) através de análise das setas dorsais e conjunto de setas h.

Componentes principais	***Eigenvalues****	**% Variância**
1	696,055	64,018
2	64,6186	5,9431
3	49,7939	4,5797
4	42,9915	3,954
5	37,9152	3,4872
6	36,0064	3,3116
7	29,5773	2,7203
8	27,2037	2,502
9	23,3418	2,1468
10	23,0534	2,1203
11	16,9181	1,556
12	13,8863	1,2772
13	12,0325	1,1067
14	9,25836	0,85151
15	4,63039	0,42587

* *Eigenvalues*: Valores dos eixos

Figura 11 – Plotagem da comparação dos resultados das medições das características responsáveis pela maior variação na análise dos componentes principais, das populações de *Panonychus ulmi* de videiras (código 1) e macieiras (código 2).



Não foram observadas diferenças significativas quando comparadas as populações de macieiras e videiras, através da análise dos componentes principais. As populações plotadas no gráfico com o número um e com a linha de cor roxa, indicam os indivíduos provenientes de videiras, e as populações plotadas com o número dois e com a linha de cor vermelha, representam os indivíduos provenientes de macieiras. Pode-se observar a sobreposição das populações testadas, indicando não haver diferença morfológica.

A influência do habitat na morfologia é particularmente importante nos ácaros que estão associados a diferentes hospedeiros ou que utilizam uma variedade de substratos para alimentação (KLIMOV et al., 2004). Estudos recentes demonstraram que a variabilidade intraespecífica de variáveis métricas pode ser influenciada por fatores como as condições ambientais, diferentes regiões geográficas ou condições das culturas de laboratório (EBERMANN et al., 2013).

Zhang e Jacobson (2000) relataram a dificuldade de diferenciação entre *Tetranychus urticae* e *Tetranychus cinnabarinus* (Boisduval) utilizando caracteres morfológicos, pois ambos são polimórficos e não há variação intraespecífica significativa entre as populações em diferentes plantas hospedeiras e de diferentes localizações geográficas.

O processo de especiação não é necessariamente acompanhado de diferenciação morfológica. Em virtude disso, ocorre a existência de complexos de espécies, que são linhagens geneticamente isoladas, mas indistinguíveis com base somente em critérios morfológicos (SKORACKA et al., 2012).

Skoracka et al. (2012) não distinguiram claramente populações de *Aceria tosichella* (Keifer) através de análise de ACP para as características morfológicas analisadas, pois todas as populações foram morfologicamente sobrepostas, sugerindo que não há traços morfológicos distintos que podem ser usados para diferenciar os ácaros provenientes de plantas hospedeiras diferentes e de distintas localidades geográficas. Outra razão para esta falta de diferenciação morfológica pode ser características morfológicas distintas que ainda não evoluíram.

Lofego (1998) analisou 30 fêmeas de *Euseius citrifolius* Denmark & Muma de diferentes regiões e substratos, e não relatou acentuadas variações morfológicas entre elas. Furtado (1997) considerou a possibilidade de que o alimento pudesse interferir nas dimensões de diferentes estruturas de *E. citrifolius*, sob condições de

laboratório, mas não encontrou nenhuma diferença considerável entre fêmeas criadas em diferentes tipos de alimento. No presente trabalho também não foram encontradas diferenças morfológicas entre as populações avaliadas.

Em estudo com três populações geograficamente isoladas previamente identificadas como *Neoseiulus paspalivorus* DeLeon, Sourassou et al. (2011) encontraram grande similaridade morfológica, mas os testes de cruzamentos indicaram isolamento reprodutivo, indicando serem espécies diferentes. Sourassou et al. (2012) realizaram análise morfológica de quatro populações de *Neoseiulus baraki* Athias-Henriot, provenientes de diferentes localizações geográficas, obtendo resultados semelhantes na maioria dos caracteres morfológicos examinados, em que as diferenças observadas são pequenas e as medições se sobrepõem na maior parte dos caracteres. Nestes casos de semelhança morfológica, é necessária uma abordagem integrativa combinando análise morfológica, molecular, nível comportamental ou compatibilidade reprodutiva, para que seja possível distinguir entre entidades taxonômicas semelhantes (SOURASSOU et al., 2012).

Algumas vezes as análises morfométricas indicam que as condições ambientais não são os principais fatores determinantes de variabilidade. A semelhança entre as populações indica características genéticas próximas, sendo que se tratando de uma introdução recente, o tempo para o estabelecimento da população pode não ter sido suficientemente longo para permitir variabilidade morfométrica (NAVIA et al., 2009), como seria o caso da população de *P. ulmi* em videiras, que só foi relatada no Brasil no ano de 2006, o que seria um prazo relativamente curto para que já houvessem se manifestado alterações morfológicas nestas populações, em comparação com as populações de macieiras. Se os ácaros estivessem presentes naquele local por um longo tempo e isolados, seria esperado que apresentassem maior variabilidade morfométrica (NAVIA et al., 2009).

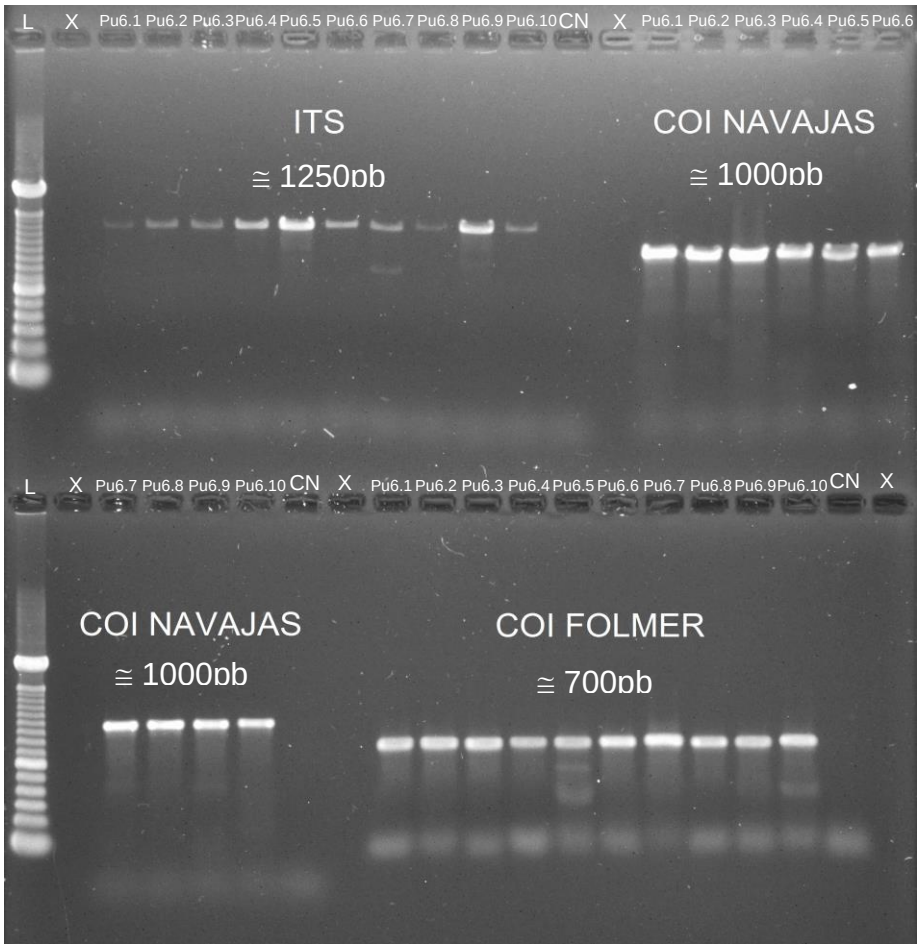
Também foi importante avaliar todas as características e um grande número de indivíduos, para se ter uma ideia de quais caracteres morfológicos foram mais representativos para esta espécie, sendo que a medição do comprimento das setas dorsais é fundamental em estudos morfológicos nesta espécie.

4.2 Caracterização molecular

O protocolo de extração utilizado foi adequado para obtenção de DNA em quantidade e pureza necessários para os procedimentos de amplificação e sequenciamento. A concentração média de DNA entre as amostras foi de 5,9 ng/µl, e em torno de 50% das amostras apresentaram qualidade/pureza adequada, pois ficaram dentro do intervalo entre 1,7 e 2,2 de índice de absorbância (valores recomendados pelo kit de extração utilizado), estimado pelos valores da relação 260/280 (Tabela 7).

Padrão geral de bandas amplificadas por eletroforese em gel de agarose a 1%, corado com GelRed® para os três fragmentos analisados (Figura 12).

Figura 12 – Padrão de bandas visualizadas em gel de agarose 1% após a PCR para os fragmentos ITS, *COI* Navajas e *COI* Folmer de *Panonychus ulmi*.



L=Marcador de peso molecular 100pb Invitrogen; X=Espaço vazio; Pu6.1 a Pu6.10; CN = Controle negativo (amostra sem DNA).

Tabela 7 - Quantidade de DNA estimada em espectrofotômetro Nanodrop 2000 valores da relação 260/280 por amostra analisada após extração de DNA de *Panonychus ulmi.*

Amostra	Conc. de DNA (ng/ul)	260/280	Amostra	Conc. de DNA (ng/ul)	260/280	Amostra	Conc. de DNA (ng/ul)	260/280
Pu4.3	1,8	1,45	Pu6.2	16,8	1,72	Pu10.1	13,1	1,63
Pu4.6	1,7	1,28	Pu6.4	3,6	2,77	Pu10.2	13,1	1,59
Pu4.7	2,0	1,43	Pu6.5	3,4	2,09	Pu10.3	6,5	1,94
Pu4.8	2,2	1,93	Pu6.6	7,0	1,98	Pu10.5	10,8	1,58
Pu4.9	2,1	1,91	Pu6.8	4,9	1,82	Pu10.7	9,2	1,74
Pu4.14	1,9	1,78	Pu6.9	13,4	1,75	Pu20.1	18,6	1,59
Pu11.2	2,8	1,19	Pu6.10	10,9	1,76	Pu20.2	2,2	1,48
Pu11.3	2,3	1,12	Pu19.1b	15,8	1,58	Pu20.3	4,7	1,65
Pu11.6	4,1	1,59	Pu19.1c	3,3	2,13	Pu20.4	8,5	1,92
Pu11.7	2,9	1,27	Pu19.1d	19,1	1,60	Pu20.5	5,1	1,51
Pu11.8	3,7	1,23	Pu19.1e	5,6	1,66	Pu20.6	2,6	1,33
Pu11.9	2,4	1,12	Pu19.1f	3,5	1,66	Pu20.7	12,6	1,59
Pu13.1	1,4	1,96	Pu19.1g	12,9	1,63	Pu9.3	3,1	1,36
Pu13.2	2,3	1,19	Pu19.1i	10,7	1,65	Pu9.4	4,5	1,51
Pu13.3	1,5	1,29	Pu24.1	11,4	1,87	Pu9.6	14,3	1,59
Pu13.4	1,7	1,28	Pu24.2	4,3	1,82	Pu9.8	11,1	1,67
Pu13.5	2,6	1,60	Pu24.3	3,6	1,75	Pu9.10	4,2	1,80
Pu13.6	3,9	1,39	Pu24.5	3,4	2,52	Pu23.1	6,3	2,16
Pu13.7	2,0	2,17	Pu24.6	3,9	2,21	Pu23.2	3,7	2,07
Pu13.8	2,1	1,31	Pu24.7	4,4	1,76	Pu23.3	4,9	1,84
Pu13.10	2,2	1,18	Pu2.1	5,5	1,76	Pu23.4	1,7	1,50
Pu21.1	2,6	1,39	Pu2.2	4,6	1,68	Pu23.6	3,0	2,65
Pu21.3	5,3	1,44	Pu2.4	5,8	1,99	Pu23.7	2,1	1,37
Pu21.4	6,3	1,50	Pu2.7	13,1	1,61	Pu28.3	3,0	2,45
Pu21.5	9,2	1,49	Pu2.9	12,7	1,63	Pu28.4	3,3	2,17
Pu21.8	4,5	1,32	Pu2.10	6,1	1,66	Pu28.5	1,6	2,98
Pu22.2a	2,4	3,09	Pu2.12	12,8	1,64	Pu28.6	3,2	2,87
Pu22.2b	3,8	1,57	Pu12.2	2,5	2,42	Pu28.8	3,3	1,45
Pu22.2c	2,4	1,53	Pu12.4	4,0	1,96	Pu29.1	4,4	2,96
Pu22.2d	5,5	1,77	Pu12.5	9,0	1,73	Pu29.2	4,3	1,81
Pu22.2e	1,6	2,52	Pu12.6	9,1	1,73	Pu29.4	3,4	2,30
Pu22.2f	3,3	2,05	Pu12.9	12,9	1,78	Pu29.5	3,4	1,67
Pu22.2g	12,2	1,72	Pu26.1	11,8	1,67	Pu29.6	2,8	1,83
Pu22.2h	5,1	1,60	Pu26.4	8,5	1,59	Pu30.1	3,6	1,93
Pu22.2i	6,6	1,89	Pu26.5	12,9	1,75	Pu30.2	2,9	1,65
Pu25.1a	2,9	4,18	Pu26.6	6,7	1,78	Pu30.5	3,7	2,05
Pu25.1d	2,9	2,94	Pu26.9	15,9	1,69	Pu30.6	4,1	1,67
Pu25.1f	4,2	2,21				Pu30.7	4,6	2,08
Pu25.1h	6,1	2,38						
Pu25.1j	9,0	1,95						

Com relação aos resultados das análises da região ITS do DNA ribossômico, não foram obtidas estas sequências para as populações de *P. ulmi* analisadas. As condições de conservação do DNA enviado para sequenciamento foram averiguadas

pela Macrogen (Korea) no momento da recepção das amostras. A integridade do DNA foi considerada satisfatória, com a observação de um padrão de bandas adequado em gel de agarose 1%, confirmando os resultados obtidos na Embrapa Cenargen. De acordo com a Macrogen, durante o processo de sequenciamento, observou-se um modelo misto, com picos duplos em um determinado ponto da sequência, com uma derrapagem dos *primers* 18S e 28SC devido à presença de região de homopolímeros. A partir desse ponto não foi encontrada qualquer banda principal, ao contrário do que foi observado no gel, com a presença de uma banda única e intensa. De acordo com a Macrogen, eventualmente, este modelo misto aparece em um determinado ponto de sequências com esses *primers* em outras reações globais.

Alternativamente, foram testados dois novos conjuntos de *primers*, Internal S (5'-GATCACTCGAATTACCAATCG-3') e InternalSRev (5'-CTGTCTGAGAGTTGAGAAGTG-3') (MENDONÇA et al., 2011) e ITS2-F (5′-GTCACATCTGTCTGAGAGTTGAGA-3′) e ITS2-R (5′-GTAR CCTCACCTRMTCTGAGATC-3′) (BEN DAVID et al., 2007) visando obtenção das sequências ITS. Os resultados estão sendo aguardados. Caso não haja sucesso, uma solução seria desenhar novos *primers* para obtenção de sequências da região.

4.2.1 Fragmento do gene *COI* de Folmer

Foram obtidas no sequenciamento 92 sequências do fragmento *COI* Folmer, com 100% de eficiência do protocolo de extração e amplificação por PCR. As sequências apresentaram comprimento de aproximadamente 710 pares de bases e a seguinte composição média de nucleotídeos: Timina 46,5%, Adenina 31,9%, Citosina 11,3%, e Guanina 10,3%, sendo a média de A-T 78,4% e C-G 21,6%.

O alinhamento final foi composto por 94 sequências de *Panonychus* (92 deste estudo, uma de *P. ulmi* e uma de *P. citri* ambas do GenBank) e uma sequência de *Tetranychus urticae* como grupo externo. As sequências de *Panonychus* foram divididas em 14 haplótipos. O haplótipo 5 foi o mais frequente, com 21 sequências representando 22,11% do total de sequências de *COI* Folmer analisadas. Este haplótipo foi composto pela maioria das amostras de macieiras, sendo apenas uma, Pu25-1d de videira da espécie *Vitis labrusca*. O haplótipo 2 foi o segundo mais frequente e agrupou 20 sequências (21,05%) de amostras coletadas exclusivamente

em videiras. O haplótipo 1 agrupou 17 sequências (17,89%) de amostras mistas, de macieiras e videiras provenientes do Brasil, estando também presente em macieira no Marrocos e na África do Sul. A distribuição completa dos haplótipos, acompanhada da lista de hospedeiros e localidade de coleta está discriminada na Tabela 8.

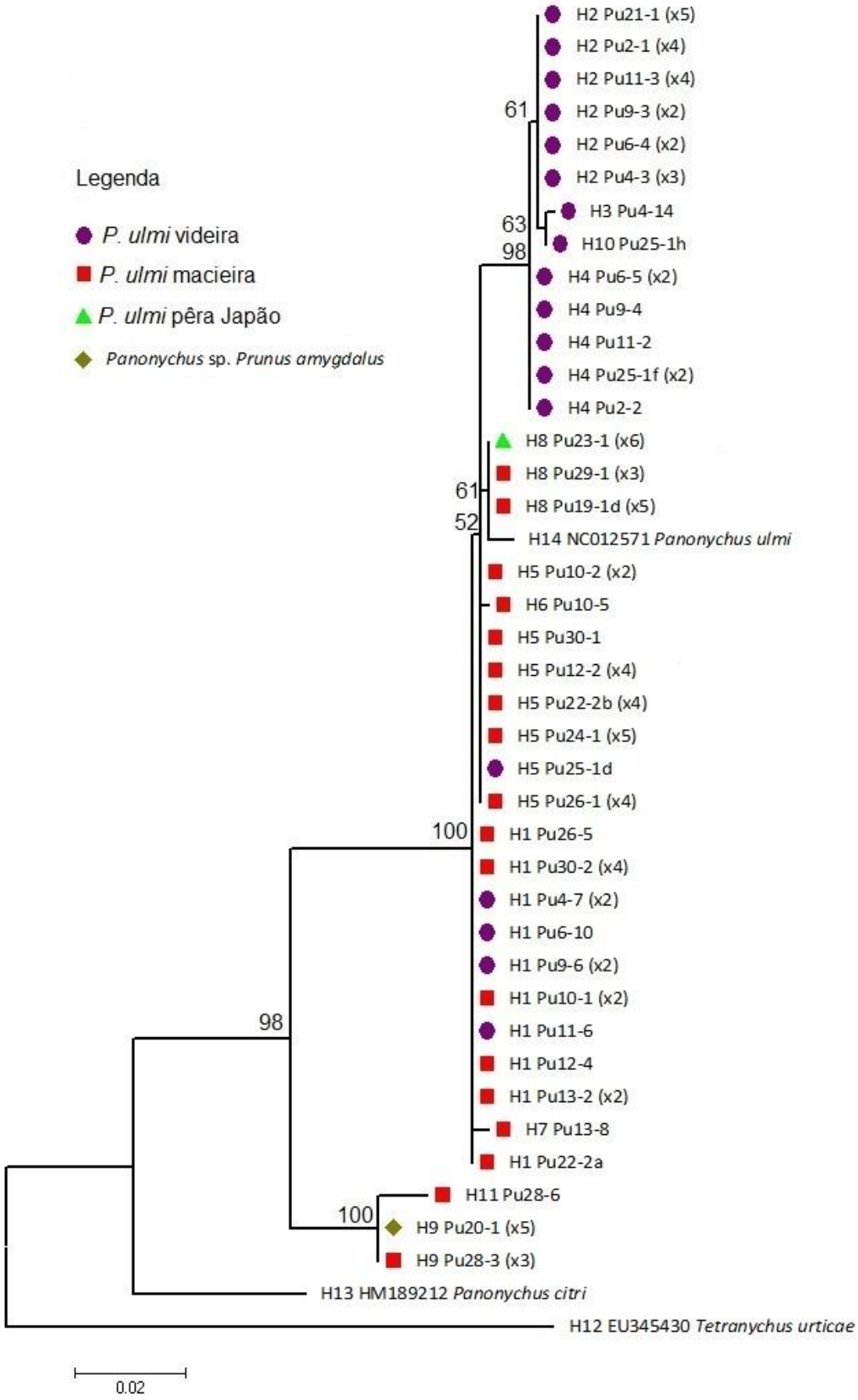
Tabela 8 – Identificação dos haplótipos e distribuição das amostras de *Panonychus ulmi* em cada haplótipo, com hospedeiros e locais de coleta, baseada na análise de sequências *COI* de Folmer obtidas, incluídos os grupos interno e externo.

Nº haplótipo	**Amostras**	**Hospedeiro**	**Local**
Hap_1 (x17)	Pu4-6 e Pu4-7	*Vitis vinifera* - Trebbiano	Bento Gonçalves (RS)
	Pu6-10	*V. vinifera* - Merlot	Bento Gonçalves (RS)
	Pu9-6 e Pu9-8	*V. vinifera* - Pinot Noir	Bento Gonçalves (RS)
	Pu10-1 e Pu10-7	*Malus domestica* - Fuji	Pinto Bandeira (RS)
	Pu11-6	*V. vinifera* - Trebbiano	Marcorama (RS)
	Pu12-4	*M. domestica* - Gala	Urubici (SC)
	Pu13-2 e Pu13-5	*M. domestica* - Gala	São Joaquim (SC)
	Pu22-2a	*M. domestica* - Gala	Vacaria (RS)
	Pu26-5	*M. domestica* - Gala	Oulmes - Marrocos
	Pu30-2, Pu30-5, Pu30-6 e Pu30-7	*M. domestica*	Western Cape – Elgin - África do Sul
Hap_2 (x20)	Pu2-1, Pu2-4, Pu2-9 e Pu2-12	*Vitis vinifera* - Merlot	Santa Tereza (RS)
	Pu4-3, Pu4-8 e Pu4-9	*V. vinifera* - Trebbiano	Bento Gonçalves (RS)
	Pu6-4 e Pu6-8	*V. vinifera* - Merlot	Bento Gonçalves (RS)
	Pu9-3 e Pu9-10	*V. vinifera* - Pinot Noir	Bento Gonçalves (RS)
	Pu11-3, Pu11-7, Pu11-8 e Pu11-9	*V. vinifera* - Trebbiano	Marcorama (RS)
	Pu21-1, Pu21-12, Pu21-14, Pu21-15 e Pu21-16	*V. vinifera* - Merlot	Bento Gonçalves (RS)
Hap_3 (x1)	Pu4-14	*Vitis vinifera* - Trebbiano	Bento Gonçalves (RS)
Hap_4 (x7)	Pu2-2	*Vitis vinifera* - Merlot	Santa Tereza (RS)
	Pu6-5 e Pu6-6	*V. vinifera* - Merlot	Bento Gonçalves (RS)

	Pu9-4	*V. vinifera* - Pinot Noir	Bento Gonçalves (RS)
	Pu11-2	*V. vinifera* - Trebbiano	Marcorama (RS)
	Pu25-1f e Pu25-1j	*V. labrusca*	Garibaldi (RS)
Hap_5 (x21)	Pu10-2 e Pu10-3	*Malus domestica* - Fuji	Pinto Bandeira (RS)
	Pu12-2, Pu12-5, Pu12-6 e Pu12-9	*M. domestica* - Gala	Urubici (SC)
	Pu22-2b, Pu22-2c, Pu22-2d e Pu22-2e	*M. domestica* - Gala	Vacaria (RS)
	Pu24-1, Pu24-3, Pu24-5, Pu24-6 e Pu24-7	*Malus pumila*	Nagano - Japão
	Pu25-1d	*Vitis labrusca*	Garibaldi (RS)
	Pu26-1, Pu26-4, Pu26-6 e Pu26-9	*M. domestica* - Gala	Oulmes - Marrocos
	Pu30-1	*M. domestica*	Western Cape – Elgin - África do Sul
Hap_6 (x1)	Pu10-5	*Malus domestica* - Fuji	Pinto Bandeira (RS)
Hap_7 (1)	Pu13-8	*Malus domestica* - Gala	São Joaquim (SC)
Hap_8 (x14)	Pu19-1d, Pu19-1e, Pu19-1f, Pu19-1g e Pu19-1i	*Malus domestica*	Columbus – Ohio - EUA
	Pu23-1, Pu23-2, Pu23-3, Pu23-4, Pu23-6 e Pu23-7	*Pyrus communis*	Yamagata - Japão
	Pu29-1, Pu29-2 e Pu29-4	*M. domestica*	Western Cape – Elgin - África do Sul
Hap_9 (x8)	Pu20-1, Pu20-2, Pu20-3, Pu20-6 e Pu20-7	*Prunus amygdalus*	Curacavì, Santiago - Chile
	Pu28-3, Pu28-4 e Pu28-5	*Malus domestica*	Cohyaique - Chile
Hap_10 (x1)	Pu25-1h	*Vitis labrusca*	Garibaldi (RS)
Hap_11 (x1)	Pu28-6	*Malus domestica*	Cohyaique - Chile
Hap_12 (x1)	EU345430 - *Tetranychus urticae*	-	-
Hap_13 (x1)	HM189212 - *Panonychus citri*	-	-
Hap_14 (x1)	NC012571 - *Panonychus ulmi*	-	-

Com base nestes haplótipos, foi realizada a escolha de um representante de cada população em cada haplótipo, para construção da árvore filogenética (Figura 13).

Figura 13 – Árvore filogenética ML (Tamura 3 parâmetros) inferida a partir de sequências de *COI* (LCO1490 e HCO2198) de *Panonychus ulmi* obtidas nesse estudo. O número de vezes que cada haplótipo foi encontrado nas amostras está entre parênteses. Os valores de *bootstrap* estão localizados sobre os ramos.



A filogenia demonstrou que as amostras de *Panonychus* formaram um grupo monofilético. Os haplótipos se agruparam em três clados principais bem suportados, com valores de *bootstrap* variando entre 98% e 100%. Todas as amostras de *P. ulmi* ficaram consistentemente separadas de *P. citri* (*bootstrap* de 98%). Entre as amostras de *P. ulmi,* observou-se um clado formado exclusivamente por amostras coletadas em videiras no Rio Grande do Sul (*bootstrap* de 98%) que permaneceu separado das outras populações de *P. ulmi* coletadas em maçã, uva e pêra de diversas localidades do mundo. Adicionalmente, um clado basal distinto foi formado pelas amostras coletadas no Chile (*bootstrap* de 100%), populações Pu20 e Pu28.

As fêmeas pertencentes às populações Pu20 e Pu28 pós-extração e também aquelas que não foram usadas na análise molecular foram montadas em lâminas de microscopia para verificação da espécie. Estas fêmeas pertencem ao gênero *Panonychus*, mas como não haviam machos na população, não foi possível confirmar a identificação em nível específico.

As distâncias intra e inter específicas (comparação entre pares de nucleotídeos) são apresentadas na Tabela 9. De acordo com os resultados da filogenia, cinco grupos foram considerados para o cálculo da distância, mais um grupo adicional que foi criado para abrigar o conjunto de *P. ulmi* de maçã, uva, pêra, este último denominado Grupo 1. Desta forma, o Grupo 2 incluiu todas as populações de *P. ulmi* de videiras, no Grupo 3 populações de *P. ulmi* de macieiras, pêra e uva (grupo misto), no Grupo 4 *Panonychus* do Chile (Pu20 e Pu28), no Grupo 5 *P. citri* (grupo interno) e no Grupo 6 *T. urticae* (grupo externo).

O Grupo 1 (*P. ulmi*) apresentou um clado interno composto apenas por populações de *P. ulmi* provenientes de videiras, indicando a existência de alguma separação interna, embora o percentual de diferenciação entre este grupo de videira e os demais tenha sido muito baixo, de 1,1% (Tabela 9).

Com relação ao Grupo 4, tanto a filogenia como os valores de distâncias sugerem que as populações do Chile (Pu20 e Pu28) representam uma espécie próxima a *P. ulmi*. Será necessário realizar novas coletas de *Panonychus* no Chile, com a presença de machos, para confirmar corretamente o *status* desse táxon.

Tabela 9 - Distâncias dentro dos grupos e entre os grupos com base nas sequências de *COI* Folmer, incluindo os grupos interno e externo.

	Panonychus ulmi	***P. ulmi* videiras**	***P. ulmi misto***	***Panonychus* Pu20 e Pu28**	***P. citri***
Panonychus ulmi (Grupo 1)**	0,001*				
P. ulmi videiras (Grupo 2)	0,011	0,00085*			
P. ulmi misto (Grupo 3)	0,002	0,011	0,00097*		
Panonychus Pu20 e 28 (Grupo 4)	0,052	0,062	0,052	0,00197*	
Panonychus citri (Grupo 5)	0,084	0,092	0,084	0,075	
Tetranychus urticae (Grupo 6)	0,170	0,172	0,170	0,154	0,149

* Valores grifados em cinza representam as diferenças dentro dos grupos e os valores não grifados representam as diferenças entre um grupo e outro.
** Grupo 1 todas as amostras de *Panonychus ulmi*; grupo 2 amostras de *P. ulmi* de videiras, grupo 3 amostras de *P. ulmi* grupo misto, grupo 4 amostras de *Panonychus* sp. Pu20 e Pu28, grupo 5 grupo interno *P. citri* e grupo 6 grupo externo *Tetranychus urticae.*

4.2.2 Fragmento do gene *COI* de Navajas

Foram obtidas no sequenciamento 96 sequências de *COI* Navajas, com 100% de eficiência do protocolo de extração e amplificação por PCR. As sequências obtidas apresentaram comprimento de 930 pares de bases e a seguinte composição média de nucleotídeos: Timina 45,3%, Adenina 31,2%, Guanina 12,0% e Citosina 11,5%, sendo a média de A-T 76,5% e C-G 23,5%.

O alinhamento final foi composto por 99 sequências de *Panonychus* (96 obtidas neste estudo, 2 recuperados do GenBank) e uma sequência de *Tetranychus urticae* como grupo externo. As sequências de *Panonychus* foram divididas em 29 haplótipos. Os haplótipos 5 e 12 foram os mais frequentes, com 17 sequências em cada um, representando cada um 17,17% do total de sequências de *COI* Navajas. Os haplótipos 7 e 15 foram os segundos mais frequentes, com 13 sequências cada um, representando cada um 13,13% do total. A distribuição completa dos haplótipos, acompanhada da lista de hospedeiros e localidade de coleta está discriminada na Tabela 10.

Tabela 10 - Identificação dos haplótipos e distribuição das amostras de *Panonychus ulmi* em cada haplótipo, com hospedeiros e locais de coleta, baseada na análise de sequências *COI* de Navajas obtidas, incluídos os grupos interno e externo.

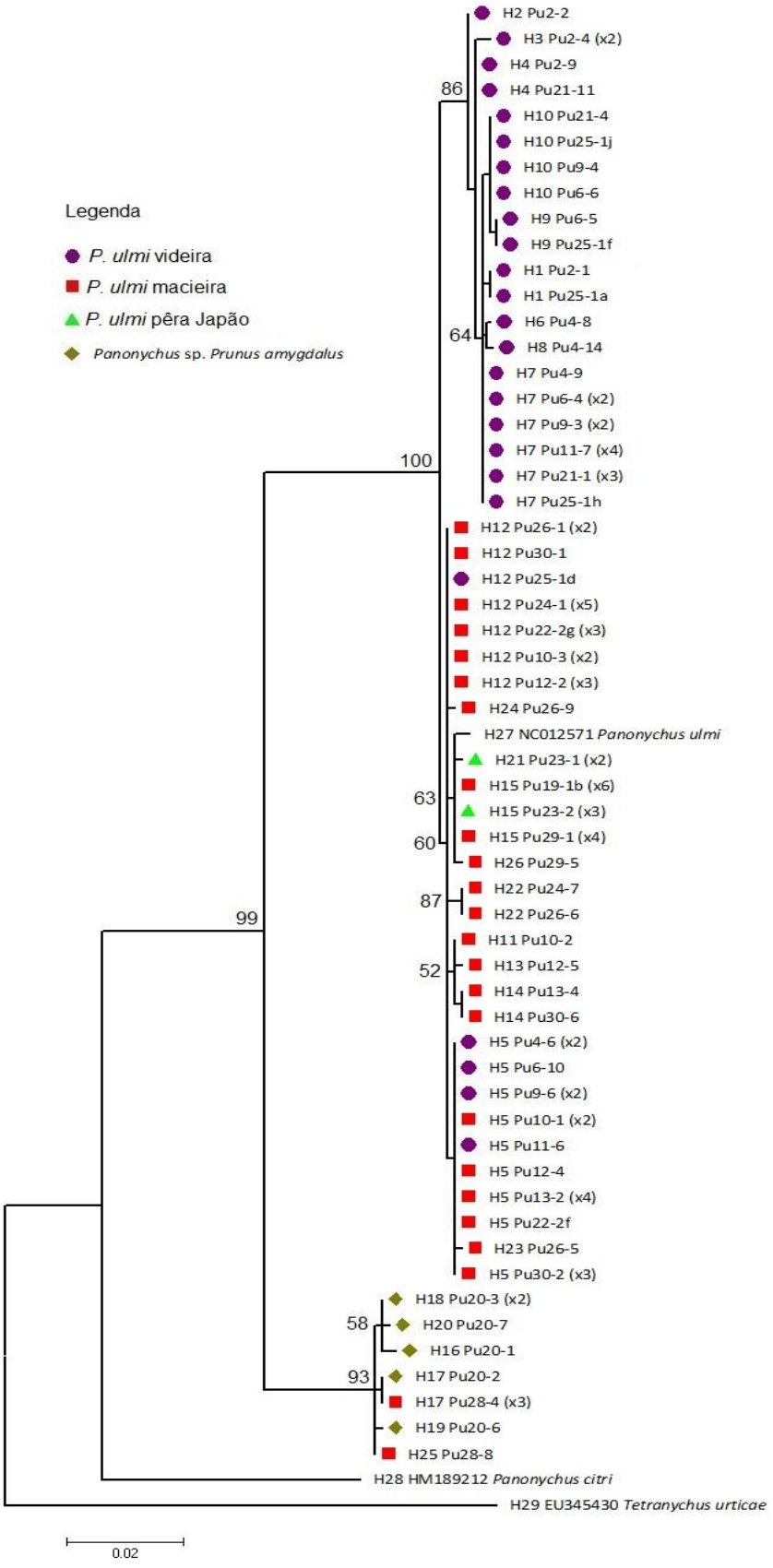
Nº haplótipo	**Amostras**	**Hospedeiro**	**Local**
Hap_1 (x2)	Pu2-1	*Vitis vinifera* - Merlot	Santa Tereza (RS)
	Pu25-1a	*V. labrusca*	Garibaldi (RS)
Hap_2 (x1)	Pu2-2	*Vitis vinifera* - Merlot	Santa Tereza (RS)
Hap_3 (x2)	Pu2-4	*Vitis vinifera* - Merlot	Santa Tereza (RS)
	Pu2-12	*V. vinifera* - Merlot	Santa Tereza (RS)
Hap_4 (x2)	Pu2-9	*Vitis vinifera* - Merlot	Santa Tereza (RS)
	Pu21-11	*V. vinifera* - Merlot	Bento Gonçalves (RS)
Hap_5 (x17)	Pu4-6 e Pu4-7	*Vitis vinifera* - Trebbiano	Bento Gonçalves (RS)
	Pu6-10	*V. vinifera* - Merlot	Bento Gonçalves (RS)
	Pu9-6 e Pu9-8	*V. vinifera* - Pinot Noir	Bento Gonçalves (RS)
	Pu10-1 e Pu10-7	*Malus domestica* - Fuji	Pinto Bandeira (RS)
	Pu11-6	*V. vinifera* - Trebbiano	Marcorama (RS)
	Pu12-4	*M. domestica* - Gala	Urubici (SC)
	Pu13-2, Pu13-3, Pu13-5 e Pu13-8	*M. domestica* - Gala	São Joaquim (SC)
	Pu22-2f	*M. domestica* - Gala	Vacaria (RS)
	Pu30-2, Pu30-5 e Pu30-7	*M. domestica*	Western Cape – Elgin - África do Sul
Hap_6 (x1)	Pu4-8	*Vitis vinifera* - Trebbiano	Bento Gonçalves (RS)
Hap_7 (13)	Pu4-9	*Vitis vinifera* - Trebbiano	Bento Gonçalves (RS)
	Pu6-4 e Pu6-8	*V. vinifera* - Merlot	Bento Gonçalves (RS)
	Pu9-3 e Pu9-10	*V. vinifera* - Pinot Noir	Bento Gonçalves (RS)

	Pu11-3, Pu11-7, Pu11-8 e Pu11-9	*V. vinifera* - Trebbiano	Marcorama (RS)
	Pu21-1, Pu21-3 e Pu21-13	*V. vinifera* - Merlot	Bento Gonçalves (RS)
	Pu25-1h	*V. labrusca*	Garibaldi (RS)
Hap_8 (x1)	Pu4-14	*Vitis vinifera* - Trebbiano	Bento Gonçalves (RS)
Hap_9 (x2)	Pu6-5	*Vitis vinifera* - Merlot	Bento Gonçalves (RS)
	Pu25-1f	*V. labrusca*	Garibaldi (RS)
Hap_10 (x4)	Pu6-6	*Vitis vinifera* - Merlot	Bento Gonçalves (RS)
	Pu9-4	*V. vinifera* - Pinot Noir	Bento Gonçalves (RS)
	Pu21-4	*V. vinifera* - Merlot	Bento Gonçalves (RS)
	Pu25-1j	*V. labrusca*	Garibaldi (RS)
Hap_11 (x1)	Pu10-2	*Malus domestica* - Fuji	Pinto Bandeira (RS)
Hap_12 (x17)	Pu10-3 e Pu10-5	*Malus domestica* - Fuji	Pinto Bandeira (RS)
	Pu12-2, Pu12-6 e Pu12-9	*M. domestica* - Gala	Urubici (SC)
	Pu22-2g, Pu22-2h e Pu22-2i	*M. domestica* - Gala	Vacaria (RS)
	Pu24-1, Pu24-2, Pu24-3, Pu24-5 e Pu24-6	*M. pumila*	Nagano - Japão
	Pu25-1d	*Vitis labrusca*	Garibaldi (RS)
	Pu26-1 e Pu26-4	*M. domestica* - Gala	Oulmes - Marrocos
	Pu30-1	*M. domestica*	Western Cape – Elgin - África do Sul
Hap_13 (x1)	Pu12-5	*Malus domestica* - Gala	Urubici (SC)
Hap_14 (x2)	Pu13-4	*Malus domestica* - Gala	São Joaquim (SC)
	Pu30-6	*M. domestica*	Western Cape – Elgin - África do Sul
Hap_15 (x13)	Pu19-1b, Pu19-1c, Pu19-1d, Pu19-1f, Pu19-1g e Pu19-1i	*Malus domestica*	Columbus – Ohio - EUA
	Pu23-2, Pu23-4 e Pu23-7	*Pyrus communis*	Yamagata - Japão
	Pu29-1, Pu29-2, Pu29-4 e Pu29-6	*M. domestica*	Western Cape – Elgin - África do Sul
Hap_16 (x1)	Pu20-1	*Prunus amygdalus*	Curacavì, Santiago - Chile

Hap_17 (x4)	Pu20-2	*Prunus amygdalus*	Curacavì, Santiago - Chile
	Pu28-4, Pu28-5 e Pu28-6	*Malus domestica*	Cohyaique - Chile
Hap_18 (x2)	Pu20-3 e Pu20-4	*Prunus amygdalus*	Curacavì, Santiago - Chile
Hap_19 (x1)	Pu20-6	*Prunus amygdalus*	Curacavì, Santiago - Chile
Hap_20 (x1)	Pu20-7	*Prunus amygdalus*	Curacavì, Santiago - Chile
Hap_21 (x2)	Pu23-1 e Pu23-3	*Pyrus communis*	Yamagata - Japão
Hap_22 (x2)	Pu24-7	*Malus pumila*	Nagano - Japão
	Pu26-6	*M. domestica* - Gala	Oulmes - Marrocos
Hap_23 (x1)	Pu26-5	*Malus domestica* - Gala	Oulmes - Marrocos
Hap_24 (x1)	Pu26-9	*Malus domestica* - Gala	Oulmes - Marrocos
Hap_25 (x1)	Pu28-8	*Malus domestica*	Cohyaique - Chile
Hap_26 (x1)	Pu29-5	*Malus domestica*	Western Cape – Elgin - África do Sul
Hap_27 (x1)	NC012571 - *Panonychus ulmi*	-	-
Hap_28 (x1)	HM189212 - *Panonychus citri*	-	-
Hap_29 (x1)	EU345430 - *Tetranychus urticae*	-	-

Com base nestes haplótipos, foi realizada a escolha de um representante de cada população em cada haplótipo, para construção da árvore filogenética (Figura 14).

Figura 14 – Árvore filogenética ML (Tamura 3 parâmetros) inferida a partir de sequências de *COI* (C1J1718 e 773) de *Panonychus ulmi* obtidas nesse estudo. O número de vezes que cada haplótipo foi encontrado nas amostras está entre parênteses. Os valores de *bootstrap* estão localizados sobre os ramos.



A filogenia demonstrou que as amostras de *Panonychus* formaram um grupo monofilético. Os haplótipos se agruparam em três clados principais bem suportados, com valores de *bootstrap* variando entre 86% e 100%. Todas as amostras de *P. ulmi* ficaram consistentemente separadas de *P. citri* (*bootstrap* de 99%). Entre as amostras de *P. ulmi,* observou-se um clado formado exclusivamente por amostras coletadas em videiras no Rio Grande do Sul (*bootstrap* de 86%) que permaneceu separado das outras populações de *P. ulmi* coletadas em maçã, uva e pêra e diversas localidades do mundo. Adicionalmente, um clado basal distinto foi formado pelas amostras coletadas no Chile (*bootstrap* de 93%), populações Pu20 e Pu28.

As distâncias intra e inter específicas (comparação entre pares de nucleotídeos) são apresentadas na Tabela 11, sendo que as amostras foram separadas em grupos conforme já explicado anteriormente. O Grupo 1 (*P. ulmi*) apresentou um clado interno composto apenas por populações de *P. ulmi* provenientes de videiras, indicando a existência de alguma separação interna, embora o percentual de diferenciação entre este grupo de videira e os demais tenha sido muito baixo, de 1,0% (Tabela 11). Da mesma forma que em *COI* fragmento de Folmer, houve separação do grupo 4, pois tanto a filogenia como os valores de distâncias sugerem que as populações do Chile (Pu20 e Pu28) representam uma espécie próxima a *P. ulmi*.

Tabela 11 - Distâncias dentro dos grupos e entre os grupos com base nas sequências de *COI* Navajas, incluindo os grupos interno e externo.

	Panonychus ulmi	***P. ulmi* videiras**	***P. ulmi misto***	***Panonychus* Pu20 e Pu 28**	***P. citri***
Panonychus ulmi (Grupo 1)**	0,005*				
P. ulmi videiras (Grupo 2)	0,010	0,002*			
P. ulmi misto (Grupo 3)	0,002	0,009	0,001*		
Panonychus Pu20 e 28 (Grupo 4)	0,053	0,055	0,052	0,002*	
Panonychus citri (Grupo 5)	0,094	0,096	0,093	0,088	
Tetranychus urticae (Grupo 6)	0,142	0,142	0,143	0,140	0,141

* Valores grifados em cinza representam as diferenças dentro dos grupos e os valores não grifados representam as diferenças entre um grupo e outro.
** Grupo 1 todas as amostras de *Panonychus ulmi*; grupo 2 amostras de *P. ulmi* de videiras, grupo 3 amostras de *P. ulmi* grupo misto, grupo 4 amostras de *Panonychus* sp. Pu20 e Pu28, grupo 5 grupo interno *P. citri* e grupo 6 grupo externo *Tetranychus urticae.*

Os valores da frequência de bases encontrados para os fragmentos *COI* estudados estão de acordo com os valores normalmente encontrados em ácaros tetraniquídeos, com predomínio de A-T. Matsuda et al. (2012) encontraram em *Oligonychus* frequência de 76,0%. Fournier et al. (1994), Navajas et al. (1996) e Ros e Breeuwer (2007) estudando diversos gêneros de ácaros da família Tetranychidae encontraram média de 75% de A-T. Em Eriophiydae, por exemplo, também se observou predomínio da frequência de A-T, no entanto os valores são inferiores aos encontrados para Tetranychidae. Skoracka et al. (2012) em estudo com *Aceria tosichella* (Keifer) registraram a frequência de A-T igual a 66,12%. Skoracka e Dabert (2010) relataram a média de A-T de 68,8% em *Abacarus hystrix* (Nalepa).

A análise filogenética baseada nos fragmentos de *COI* demonstrou que as populações de macieiras e videiras permaneceram agrupadas em um clado consistente, com 100% de suporte para o valor de *bootstrap.* As distâncias dentro dos grupos de *Panonychus ulmi* (0,1% a 1,1%) indicam tratar-se de uma mesma espécie, embora haja a separação de uma linhagem com agrupamento de amostras de videira e outro com agrupamento de amostras mistas com predominância de macieiras.

A diferença entre *P. ulmi* e *P. citri* no segmento de Folmer foi de 8,4% e no segmento de Navajas 9,5%, indicando a distância entre as espécies do mesmo gênero. Já em comparação com o grupo externo *Tetranychus urticae*, a diferença em Folmer foi de 17% e em Navajas 14,2%. Os ácaros do gênero *Panonychus* das populações Pu20 e Pu28 do Chile em comparação com *P. citri* apresentaram em Folmer 7,5% de diferença e em Navajas 8,8%. Considerando o grupo externo, essas populações diferiram 15,4% e 14% para Folmer e Navajas, respectivamente.

Outros estudos utilizando a região *COI* em artrópodes têm documentado diferentes níveis de divergência de espécies pertencentes a diversos táxons. Os valores de distâncias intraespecíficos variaram de 0,1% a 3,6%, enquanto que as distâncias interespecíficas variaram de 2,3% a 29,9%, em várias espécies de insetos, aranhas e ácaros (SKORACKA; DABERT, 2010).

Hebert et al. (2003) demonstraram uma média de divergência entre sequências de 11,3% para mais de 13.000 comparações de sequências de *COI* entre espécies animais. Os valores de distância intraespecíficos para o fragmento *COI* variaram de 0,2% a 2,4%, enquanto as distâncias interespecíficas variaram de

4,9% a 18,9%, em diversas espécies de ácaros. Cerca de 1,9% dos grupos com taxas normais de evolução mitocondrial mostrou menos de 2% de divergência, provavelmente refletindo períodos curtos de isolamento reprodutivo (HEBERT et al., 2003).

Conforme Avise (2000), as divergências intraespecíficas são raramente superiores a 2% e normalmente menores que 1%, o que comprova o fato de que as populações analisadas de macieiras e videiras pertencem à mesma espécie, exceto pela divergência com o clado das amostras do Chile (Pu20 e Pu28), que diferiram em torno de 5%. Quando são observadas divergências mais elevadas, essas variantes normalmente ocorrem com populações isoladas geograficamente. Além disso, muitas dessas altas taxas de divergências envolvem casos de incerteza taxonômica, onde linhagens compartilham um epíteto específico, mas o seu estado atual não é claro (AVISE; WALKER, 1999). As divergências entre os grupos de *Panonychus ulmi* encontrados para o gene *COI* neste estudo são comparáveis com a variação intraespecífica que foi encontrada em outros grupos de ácaros.

Estudos comparativos utilizando sequências de *COI* entre gêneros de Tetranychidae demonstraram 11% de diferença entre os gêneros *Tetranychus* e *Mononychellus* (NAVAJAS et al., 1994), 9,7–13,9% entre *Tetranychus* e *Amphitetranychus* (NAVAJAS et al., 1998) e 10,6–13,3% entre *Tetranychus* e *Panonychus* (TODA et al., 2000), valores abaixo do encontrado neste trabalho com divergência de 14,2-17,0% entre gêneros.

O nível de divergência de nucleotídeos entre populações de *Eotetranychus carpini* (Oudemans) encontradas em *Vitis vinifera* e *Carpinus betulus* foi de 1,2% (MALAGNINI et al., 2012). Entre *T. urticae* e *T. turkestani,* as diferenças intraespecíficas para *COI* variaram entre 0,9% a 5,3% em *T. turkestani*, e entre 2,1% a 6,2% em *T. urticae*. As diferenças interespecíficas foram entre 2,4% a 6,1% no mesmo estudo por análise de *COI* e experimentos de cruzamentos (NAVAJAS; BOURSOT, 2003).

Análises baseadas em sequências mitocondriais *COI* dividiram populações de *T. urticae* em dois clados claramente separados com 5% de divergência entre as sequências de nucleotídeos, demonstrando que as sequências de *COI* podem realizar a distinção entre duas linhagens (NAVAJAS et al., 1998). *Amphitetranychus*

viennensis provenientes da França diferiram das espécies do Japão por 3,8–4,1% de divergência entre as sequências de *COI* (NAVAJAS et al., 1999).

No gênero *Panonychus*, o grau de divergência intraespecífica do gene *COI* para a espécie *P. mori* do Japão foi maior do que o grau de divergência interespecífica entre *P. citri* e *P. osmanthi* (TODA et al., 2000). Assim, a divergência entre as sequências *COI* não foi capaz de separar estas espécies de *Panonychus*. Isso indica que provavelmente o táxon *Panonychus mori* está abrigando outras espécies de *Panonychus* além de *P. mori*.

A filogenia demonstrou que *P. mori* é mais próximo a *P. ulmi* do que a *P. citri* (TODA et al., 2000). A divergência entre as sequências das quatro espécies de *Panonychus* estudas (*P. citri*, *P. ulmi*, *P. mori* e *P. caglei*) foi entre 9 e 12% (KHAING et al., 2015), semelhante à encontrada neste trabalho, em média 9% ente *P. ulmi* e *P. citri*.

A divergência de nucleotídeos intragrupos variou entre 0,1 e 1,0% para *COI* no presente trabalho. Estes valores foram menores do que os encontrados para *COI* em duas espécies próximas mas distintas, *T. urticae* e *T. turkestani* Ugarov e Nikolskii, que diferiram em 5%, mas a divergência chegou a 11% quando comparados com *Mononychellus progresivus,* que pertence a um gênero diferente, sendo que dentro do gênero *Mononychellus a* diferença foi de 0% a 2,1% (NAVAJAS, et al., 1994).

Nas sequências de *COI* analisadas de diferentes populações de *T. evansi,* a divergência média entre os clados foi de 2,72% e dentro dos clados foi de 0,12 a 0,46% (BOUBOU et al., 2011). Devido aos registros de *T. evansi* nas áreas colonizadas datarem de menos de 50 anos e considerando uma taxa de mutação de genes mitocondriais tipicamente estimada em 1,4-2,3% por milhão de anos em artrópodes (XU et al., 2006), parece improvável que a diversidade de haplótipos originados em uma nova região represente os efeitos combinados de diversidade ancestral e múltiplos eventos de introdução.

Comparação entre distâncias genéticas do gene *COI* utilizadas para identificação de espécies demonstraram divergência intraespecífica de 0-2,9% para espécies do gênero *Oligonychus*, sendo menores que as divergências interespecíficas 7,3-18,3%. Além disso, a divergência intraespecífica não se

sobrepõe à divergência interespecífica, sendo que esta era, pelo menos, 4,3% maior do que a divergência intraespecífica (MATSUDA et al., 2012).

O DNA mitocondrial sofre mutações em um ritmo mais rápido do que o DNA nuclear (LYNCH et al., 2006), resultando em uma ferramenta útil para exploração filogenética entre espécies intimamente relacionadas. O seu modo de herança materna revela a presença de linhagens maternas divergentes e não pode confirmar a existência de isolamento reprodutivo entre linhagens (SKORACKA et al, 2012), por esse motivo, é recomendado a inclusão de sequências da região ITS, do DNA ribossômico nuclear.

Divergências de nucleotídeos em sequências *COI* entre o gênero de ácaros ectoparasitas *Dermanyssus* variou de 9% a 18% (ROY et al., 2010) e chegou a 17,8% entre duas espécies de ácaros aquáticos (MARTIN et al., 2010). A comparação das distâncias *COI* dentro dos grupos associados a hospedeiros de *Abacarus hystrix* (Nalepa), entre os grupos do mesmo gênero *Abacarus acutatus* Sukh foi em média 5,7% e interespecíficas como na comparação com o grupo externo do gênero *Aceria* foi de em média 20,4% (SKORACKA; DABERT, 2010).

A divergência na sequência de nucleotídeos variou entre 0 a 0,9% em nível intraespecífico e de 6,5% a 16,3% em nível interespecífico, no gênero *Encarsia* (Hymenoptera: Aphelinidae). O gene *COI* mostrou alta variabilidade interespecífica e baixa variabilidade intraespecífica em diversos gêneros de insetos (ANDERSON et al., 2007).

As análises moleculares realizadas vieram complementar a análise morfológica, sendo necessário, entretanto, realizar testes estatísticos adicionais mais detalhados. A inclusão das sequências da região ITS auxiliará sobremaneira na interpretação dos resultados e no entendimento das relações entre as populações de *P. ulmi* estudadas.

4.3 Compatibilidade reprodutiva

Os resultados dos testes de cruzamentos são apresentados na Tabela 12.

Tabela 12 - Percentual de oviposição, número total de ovos por cruzamento, dias de oviposição por fêmea, número de ovos/fêmea/ dia, viabilidade dos ovos, razão sexual e taxa de sobrevivência dos cruzamentos de *Panonychus ulmi* de macieiras e videiras.

Cruzamentos ♂* X ♀*	Nº de casais	% de oviposição	Total de ovos	Dias de oviposição/ Fêmeas****	Ovos/fêmea/ dia****	Viabilidade (ovos eclodidos)****	Razão sexual (% fêmeas)****	Taxa de sobrevivência (ovo-adulto)****
C1 ♂ MAC X ♀ MAC**	10	100	245	7.40±2.63	3.30±0.74	0.90±0.14	0.55±0.33	0.37±0.23
C2 ♂ VID* X ♀ VID**	10	100	118	4.10±1.45	2.75±0.68	0.87±0.27	0.55±0.33	0.17±0.19
C3 ♂ MAC X ♀ VID	10	100	108	4.20±1.93	2.65±0.48	0.98±0.05	0.90±0.15	0.29±0.25
C4 ♂ VID X ♀ MAC	10	100	217	5.80±2.35	3.45±1.16	0.99±0.02	0.68±0.14	0.57±0.26
C5 ♀ MAC ISOLADAS	10	100	183	6.30±2.41	2.99±0.61	0.91±0.09	-*****	0.27±0.23
C6 ♀ VID ISOLADAS	10	100	82	3.80±1.14	2.07±0.88	0.74±0.34	-*****	0.09±0.14
C7 ♂ VID X ♀ F1 C3	3	100	20	3.00±1.00	2.28±0.95	0.77±0.12	0.80±0.35	0.39±0.19
C8 ♂ MAC X ♀ F1 C3	2	100	5	2.00±1.41	1.17±0.24	1.00±0.00	0.50±0.00	0.25±0.35
C9 ♂ VID X ♀ F1 C4	10	100	143	4.40±2.32	2.75±1.43	1.00±0.00	0.25±0.20	0.45±0.25
C10 ♂ MAC X ♀ F1 C4	10	100	47	2.50±0.53	1.82±0.69	0.93±0.16	0.17±0.24	0.21±0.27
C11 ♂ F1 C3 X ♀ F1 C3	7	100	17	1.43±0.79	1.50±0.65	0.93±0.19	0.10±0.22	0.92±1.01
C12 ♂ F1 C4 X ♀ F1 C4	10	100	144	5.30±1.70	2.75±0.70	0.92±0.13	0.35±0.24	0.17±0.19

*♂: Machos; ♀: Fêmeas; ** Mac: Macieiras; *** Vid: Videiras; **** Valores apresentados como média e desvio padrão; ***** Estes cruzamentos não apresentam razão sexual devido à partenogênese.

Não existem estudos com a comparação de cruzamentos entre *Panonychus ulmi* proveniente de macieiras e videiras.

Entretanto, Gotoh e Noguchi (1990) realizaram experimento de cruzamentos entre *P. ulmi* proveniente de diferentes cultivares de maçã, obtendo como média 22,82 ovos/fêmea e Yin et al. (2013) também realizaram estudos com *P. ulmi* em quatro diferentes cultivares de maçã, obtendo como média 26,76 ovos/fêmea, resultados semelhantes aos valores encontrados nos cruzamentos C1 (♂Macieira X ♀Macieira), de 24,50 ovos/fêmea; C4 (♂Videira X ♀Macieira), 21,70 ovos/fêmea e C5 (♀Macieira Isoladas), 18,30 ovos/fêmea.

Johann (2014) realizou a biologia de *P. ulmi* se alimentando de duas cultivares de videiras, sendo que os resultados obtidos de número médio de ovos por fêmea alimentando-se da cultivar Cabernet Sauvignon foi de 16,23 ovos/fêmea e 10,00 ovos/fêmea alimentando-se da cultivar Pinot Noir, sendo que estes resultados foram semelhantes aos observados nos cruzamentos C2 (♂Videira X ♀Videira), 11,80 ovos/fêmea; C3 (♂Macieira X ♀Videira), 10,80 ovos/fêmea e C6 (♀Videira Isoladas), com 8,20 ovos/fêmea, sendo maior semelhança com a cultivar Pinot Noir.

Os resultados obtidos demonstram que as fêmeas de macieira possuem um comportamento significativamente diferente das fêmeas de videira. Com relação ao número total de ovos, houve diferença, pois C1 (♂Macieira X ♀Macieira) apresentou 245 ovos e C2 (♂Videira X ♀Videira) 118 ovos, p=0,0088; C3 (♂Macieira X ♀Videira) 108 ovos, p=0,0048; e também dias de oviposição, C1=7,40 e C2=4,10, p=0,0027 e C1=7,40 e C3=4,20, p=0,0062. Os cruzamentos C1 e C3 diferiram também no nº de ovos/fêmea/dia, sendo C1=3,30 e C3=2,65, p=0,0321.

Nos cruzamentos C5 (♀Macieira Isoladas) e C6 (♀Videira Isoladas), o desempenho em macieiras também foi significativamente diferente, pois em C5 houve maior número total de ovos C5=183 e C6=82, p=0,0010; mais dias de oviposição C5=6,30 e C6=3,80, p=0,0116; maior número de ovos/fêmea/dia C5=2,99 e C6=2,07, p=0,0140 e taxa de sobrevivência C5=0,27 e C6=0,09, p=0,0496.

O mesmo ocorreu quando comparados os cruzamentos C3 (♂Macieira X ♀Videira) e C4 (♂Videira X ♀Macieira), pois C4 apresentou maior número de ovos do que C3, sendo C3=108 e C4=217, p=0,0463 e maior taxa de sobrevivência, C3=0,29 e C4=0,57, p=0,0218.

Quando comparados os cruzamentos C2 (♂Videira X ♀Videira) e C4 (♂Videira X ♀Macieira), no qual as fêmeas são diferentes, ocorreu diferença significativa na taxa de sobrevivência, sendo C2=0,17 e C4=0,57, p=0,0009.

Ainda com relação ao cruzamento C1 (♂Macieira X ♀Macieira) e C2 (♂Videira X ♀Videira), a taxa de sobrevivência foi maior em C1=0,37 do que em C2=0,17, p=0,0459. Estes resultados indicam uma adaptação ao novo hospedeiro, no caso das videiras, com redução do potencial de ataque e de aumento populacional, que é bem menor do que o encontrado em macieiras. Conforme Diehl e Bush (1984), a adaptação a hospedeiros pode estar relacionada a padrões de diferenciação de populações, com efeitos no fluxo gênico e isolamento reprodutivo.

Pode-se considerar uma adaptação e alterações no comportamento de *P. ulmi* proveniente de videiras, quando mantidas nas folhas de maçã, assim como relatado por Malagnini et al. (2012), no qual a sobrevivência de fêmeas de *Eotetranychus carpini* coletadas e mantidas em plantas de videira *Vitis vinifera* foi maior, e também se desenvolveram significativamente mais lentamente do que os coletados em videiras mas criados em *Carpinus betulus* L., mas nesse caso não houve diferenças na oviposição.

Kitashima e Gotoh (1995) em testes de cruzamentos de cinco populações de *Panonychus citri*, realizaram todos os cruzamentos utilizando folhas de laranja, já Gotoh e Noguchi (1990) utilizaram, para *Panonychus ulmi* em cruzamentos entre duas populações diferentes de macieiras, montagem de arenas com metade da folha de cada hospedeiro analisado fixada por fita, o que não seria possível neste trabalho pois as folhas de macieira e videira são estruturalmente muito diferentes e possuem durabilidade também diferente.

Gomi e Gotoh (1996) em cruzamentos de populações de *Tetranychus kanzawai* utilizaram folhas de feijão para manter populações diferentes quando as folhas dos hospedeiros originais não estavam disponíveis, o que demonstra ser essa uma prática comum em testes de cruzamentos de populações de Tetranychidae.

Nos cruzamentos C2 (♂Videira X ♀Videira) e C3 (♂Macieira X ♀Videira), observou-se diferença significativa na razão sexual, C3 foi 0,90 e C2 foi 0,55, p=0,0202. Percebe-se que a presença do macho de macieira em C3 interferiu na razão sexual.

A presença do macho de macieira interferiu nos cruzamentos C3 (♂Macieira X ♀Videira) e C6 (♀Videira Isoladas), pois com a presença do macho em C3 a viabilidade (C3=0,98 e C6=0,74, p=0,0500) e a taxa de sobrevivência (C3=0,29 e C6=0,09, p=0,0384); aumentaram. Além disso, o cruzamento C3 (♂Macieira X ♀Videira) também apresentou maior razão sexual do que C1 (♂Macieira X ♀Macieira), C1=0,55 e C3=0,90, p=0,0163; e do que C4 (♂Videira X ♀Macieira), C3=0,90 e C4=0,68, p=0,0066.

Resultado semelhante foi obtido na comparação de C4 com C5, com macho de videira, na qual a presença do macho também aumentou a viabilidade (C4=0,99 e C5=0,91, p=0,0326) e a taxa de sobrevivência (C4=0,57 e C5=0,27, p=0,0118).

Entretanto, a presença do macho não interferiu em nenhum parâmetro de alguns cruzamentos, como na comparação entre C1 (♂Macieira X ♀Macieira) e C4 (♂Videira X ♀Macieira), C1 e C5 (♀Macieira Isoladas), C2 (♂Videira X ♀Videira) e C6 (♀Videira Isoladas) e C7 (♂Videira X ♀F1 C3) e C8 (♂Macieira X ♀F1 C3), pois não apresentaram diferença significativa.

Estes resultados demonstraram que a presença do macho interferiu na manutenção da população, garantindo maior viabilidade dos ovos e aumentando a taxa de sobrevivência dos imaturos. Ácaros adaptados a hospedeiros (*host races*) demonstram preferência por sua planta de origem, e o macho tem preferência pela fêmea do mesmo *host race,* o que a longo prazo pode manter o isolamento genético entre as duas linhagens (FYTROU; TSAGKARAKOU, 2014).

Quando comparados os cruzamentos parentais com a 1ª geração resultante destes cruzamentos, entre o cruzamento C3 (♂Macieira X ♀Videira) e C8 (♂Macieira X ♀F1 C3), C3 apresentou maior número de ovos, C3=108 e C8=5, p=0,0279 e ovos/fêmea/dia, C3=2,65 e C8=1,17, p=0,0019; e entre o cruzamento C3 e C11 (♂F1 C3 X ♀F1 C3), C3 apresentou maior número de ovos, C3=108 e C11=17, p=0,0003; mais ovos/fêmea/dia, C3=2,65 e C11=1,50, p=0,0007 e mais dias de oviposição, sendo C3=4,20 e C11=1,43, p=0,0015. O cruzamento C3 (♂Macieira X ♀Videira), também apresentou maior viabilidade que o cruzamento C7 (♂Videira X ♀F1 C3) C3=0,98 e C7=0,77, p=0,0007 e maior razão sexual do que C11 (♂F1 C3 X ♀F1 C3), C3=0,90 e C11=0,10, p=<0.0001.

O cruzamento C4 (♂Videira X ♀Macieira) apresentou diferenças significativas em comparação ao cruzamento C10 (♂Macieira X ♀F1 C4), com maior número de

ovos, C4=217 e C10=47, p=0,0053; mais dias de oviposição, C4=5,80 e C10=2,50, p=0,0019 e maior número de ovos/fêmea/dia, sendo C4=3,45 e C10=1,82, p=0,0012. A razão sexual do cruzamento C4 foi maior do que os cruzamentos C9 (♂Videira X ♀F1 C4), C4=0,68 e C9=0,25, p=<0.0001; C10 (♂Macieira X ♀F1 C4), C4=0,68 e C10=0,17, p=0,0001 e C12 (♂F1 C4 X ♀F1 C4), C4=0,68 e C12=0,35, p=0,0017; e a taxa de sobrevivência também foi maior do que C10, C4=0,57 e C10=0,21, p=0,0070 e do que C12, C4=0,57 e C12=0,17, p=0,0010.

O cruzamento C9 (♂Videira X ♀F1 C4), com a presença do macho de videira, apresentou mais dias de oviposição do que o cruzamento C10 (♂Macieira X ♀F1 C4), C9=4,40 e C10=2,50, p=0,0324, sendo que neste cruzamento somente foi alterado o macho. Na mesma comparação mas com fêmeas F1 C3 (♂Macieira X ♀Videira), não houve diferença significativa em nenhum parâmetro analisado.

Nos retrocruzamentos, comparação entre os cruzamentos C11 (♂F1 C3 X ♀F1 C3) e C12 (♂F1 C4 X ♀F1 C4), houve diferença significativa no número de ovos, C11=17 e C12=144, p=0,0001; dias de oviposição, C11=1,43 e C12=5,30, p=<0.0001 e ovos/fêmea/dia, C11=1,50 e C12=2,75, p=0,0020. Com relação aos retrocruzamentos, foi possível perceber uma redução significativa nos parâmetros analisados, quando comparados os cruzamentos nos quais utilizou-se as fêmeas F1 dos cruzamentos C3 (♂Macieira X ♀Videira) e C4 (♂Videira X ♀Macieira), indicando uma redução no potencial reprodutivo da F1, e mais uma vez um desempenho superior das fêmeas provenientes de cruzamentos no qual a fêmea era de macieira.

Os resultados obtidos permitem afirmar que há compatibilidade reprodutiva entre populações de *Panonychus ulmi* proveniente de macieiras e videiras, embora haja diferença significativa entre as duas populações, com significativa redução no número de ovos por fêmea, dias de oviposição e ovos/fêmea/dia, nas fêmeas provenientes de videiras.

Gotoh e Noguchi (1990) testaram cruzamentos entre quatro populações de *P. ulmi*, provenientes de bambu, olmo e duas populações de macieiras. Nos cruzamentos intrapopulacionais de bambu e as duas populações de macieira, assim como cruzamentos entre as duas populações de macieira entre si, geraram machos e fêmeas, assim como no presente trabalho.

Conforme Gotoh e Tokioka (1996) na maioria dos casos, a incompatibilidade reprodutiva entre tetraniquídeos resulta na produção de apenas machos adultos, o

que pode ocorrer por uma barreira pré-zigótica. Isso pode ser causado pois o grau de incompatibilidade reprodutiva varia entre uma leve redução na fertilidade até a completa infertilidade, dependendo das populações analisadas.

A incompatibilidade reprodutiva pode ser unidirecional ou bidirecional (BREEUWER; WERREN, 1993), sendo que a incompatibilidade unidirecional causa problemas na viabilidade dos ovos do cruzamento entre duas populações, e na incompatibilidade bidirecional, todos os cruzamentos são incompatíveis e não se desenvolvem ovos férteis (GOTOH et al., 1995). Incompatibilidade genética em tetraniquídeos também foi relatada por Overmeer e van Zon (1976), sendo que os híbridos obtidos do cruzamento de *Tetranychus urticae* de diferentes populações se desenvolveram até adultos, mas os ovos colocados por eles não foram viáveis. Considerando estas informações, pode-se afirmar que houve compatibilidade reprodutiva entre as populações estudadas, pois os valores de viabilidade dos ovos na F1 não foram afetados.

Navajas et al. (1999) testaram cruzamentos de *Amphitetranychus viennensis* de quatro populações de ameixa e maçã da França e quatro populações de cereja do Japão. A taxa de sobrevivência dos imaturos foi alta em todos os cruzamentos intrapopulacionais. O número total de ovos por fêmea, viabilidade, taxa de sobrevivência e razão sexual de F1 e F2 dos cruzamentos entre duas populações do Japão tiveram valores próximos aos do cruzamento parental, diferente do que aconteceu com *P. ulmi* com relação ao número de ovos, que foi reduzido na F1.

Todas as fêmeas F1 de *A. viennensis* quando cruzadas com machos de qualquer uma das populações parentais ovipositaram e produziram fêmeas adultas na F2, portanto não houve incompatibilidade aparente entre estas duas populações, assim como também não ocorreu incompatibilidade no presente trabalho.

No cruzamento entre *Tetranychus urticae* e *T. quercivorus*, a incompatibilidade núcleo citoplasmática resultou em muito menor viabilidade dos ovos, o que não ocorreu com *P. ulmi.* Já em *T. kanzawai,* a incompatibilidade ocorre pela alta viabilidade dos ovos mas sem fêmeas na prole, devido a uma falha na fertilização unidirecional, diferindo da incompatibilidade do caso anterior (GOTOH et al., 1995).

Kitashima e Gotoh (1995) realizaram experimentos de cruzamentos de cinco populações de *Panonychus citri* coletadas em diferentes hospedeiros. Não houve incompatibilidade genética aparente entre populações do mesmo tipo, pois todas as

fêmeas F1 colocaram ovos quando copularam com machos originários das populações iguais. No caso de *P. ulmi*, as fêmeas F1 também ovipositaram mesmo na presença do macho de outro hospedeiro.

Neste estudo de *P. citri,* a fertilização do ovo ocorreu normalmente entre os ácaros dos dois tipos de hospedeiros, e os híbridos sobreviveram e se tornaram adultos, mas a maioria era infértil. Isto mostra claramente que existe um isolamento reprodutivo entre *P. citri* de citros e plantas oleaginosas.

Considerando-se o trabalho de Kitashima e Gotoh (1995), no qual os ácaros das plantas oleaginosas podem se desenvolver e ovipositar em pereiras, existe uma possibilidade de que eles possam migrar para estes pomares. Portanto, as plantas oleaginosas podem ser uma importante fonte de ácaros para repovoamento dos pomares de pêra, e como hospedeiros para a manutenção de populações de ácaros durante o inverno, pois os indivíduos não-diapáusicos dificilmente sobrevivem durante o inverno em árvores decíduas. Da mesma forma, a possibilidade de haver cruzamentos entre populações de macieiras e videiras, pode fazer com que a proximidade destes cultivos na Serra Gaúcha garanta uma reposição de populações de uma cultura para a outra.

Gotoh e Noguchi (1990) realizaram experimento de cruzamentos de *P. ulmi* provenientes de olmo, bambu e duas populações de macieiras. Quando as fêmeas de olmo foram cruzadas com machos de olmo, bambu ou macieiras, nenhum macho foi produzido, assim como as fêmeas isoladas sem copular de olmo, que tem um sistema de reprodução telítoco. Os autores concluíram que as populações derivadas de diferentes espécies hospedeiras são reprodutivamente incompatíveis uma com a outra (GOTOH; NOGUCHI, 1990).

Cruzamentos entre duas populações de macieira de diferentes locais demonstraram que o número de ovos por fêmea foi significativamente menor nos cruzamentos interpopulacionais, do que nos intrapopulacionais, mas não houve diferenças na viabilidade dos ovos, taxa de sobrevivência e razão sexual. Duas populações de *P. ulmi* de macieira de diferentes locais foram reprodutivamente compatíveis, mas cruzamentos entre as populações de diferentes espécies de hospedeiros foi incompatível (GOTOH; NOGUCHI, 1990).

No presente trabalho, as fêmeas de macieira mantiveram sempre um desempenho superior às fêmeas de videira. Sabe-se que as populações de *P. ulmi*

de *Malus sp.* tem um sistema de reprodução arrenótoca (HELLE; BOLLAND, 1967). As populações de bambu e de maçã utilizadas no estudo de Gotoh e Noguchi (1990) também são arrenótocas, mas a população de olmo parece ser telítoca pois não houve o nascimento de machos. No caso das populações de macieira e videira estudadas, ambas são arrenótocas, o que pode ser comprovado pelos cruzamentos C5 e C6, nos quais as fêmeas isoladas provenientes de ambos os hospedeiros, deram origem somente a machos.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados obtidos neste estudo demonstram que populações provenientes de macieiras e videiras pertencem à mesma espécie, devido à similaridade morfológica, baixo valor de distância intraespecífica apontado pela análise molecular e a compatibilidade reprodutiva. Entretanto, as diferenças obtidas nos cruzamentos, com as populações de *P. ulmi* de macieiras significativamente mais eficientes em relação à oviposição, e com a ocorrência de uma linhagem distinta formada com as populações provenientes de videiras conforme os resultados da filogenia, demonstram a possível ocorrência de biótipos ou *host races,* com melhor adaptação e desempenho reprodutivo em macieiras.

Com relação às perspectivas de trabalhos futuros, recomenda-se realizar estudos de cruzamentos utilizando folhas de videira como hospedeiro. Contudo, será necessário estabelecer um método de criação no qual as folhas de videira resistam por um período maior do que cinco dias em laboratório e com isso seja possível realizar todos os testes antes da degradação das mesmas.

Dados disponíveis no GenBank podem ser utilizados para realizar a análise molecular comparativa de populações de macieiras e videiras da Europa para verificar a possível introdução proveniente destes países, verificando a similaridade entre as populações analisadas neste estudo e as europeias. Também seria interessante analisar a população de *Panonychus ulmi* de videiras de Pirapora-MG, encontrada na safra 2005/2006, quando foi relatada causando danos em videiras no Rio Grande do Sul. A população de *P. ulmi* de Pirapora pode apresentar

características semelhantes ou até mesmo ser do mesmo local de origem, mas neste estudo não foi possível incluir nas análises amostras desta população.

Possivelmente, as diferenças de coloração e aspectos reprodutivos das populações de macieiras e videiras estudadas sejam devido às diferenças genéticas encontradas. Os resultados obtidos demonstram a importância da caracterização de biótipos, pois estas informações são essenciais para o planejamento e aplicação em programas de controle biológico aplicado nas culturas avaliadas, em nível de campo.

O conhecimento detalhado sobre o comportamento das espécies ou *host races* de ácaros fitófagos auxilia na escolha do predador adequado para seu controle, aumentando a possibilidade de sucesso do controle biológico aplicado, com potencial biotecnológico de desenvolvimento de uma técnica eficiente para melhoria da qualidade na produção de alimentos.

REFERÊNCIAS

ANDRADE, B.; OLIVEIRA, F. de; OTT, A. P.; FERLA, N. J. **Boletim Técnico da Fundação Estadual de Pesquisa Agropecuária / FEPAGRO.** Porto Alegre-RS: Secretaria da Agricultura, Pecuária e Agronegócio, 2011.

ANDERSON, P. K. et al. Emerging infectious diseases of plants: pathogen pollution, climate change and agrotechnology drivers. **Trends in Ecology & Evolution**, v. 19, n. 10, p. 535-544, 2004.

ANDERSON, D. L.; MORGAN, M. J. Genetic and morphological variation of bee-parasitic Tropilaelaps mites (Acari: Laelapidae): new and re-defined species. **Experimental and Applied Acarology**, v. 43, n. 1, p. 1-24, 2007.

AVISE, J. C. **Phylogeography: the history and formation of species**. Harvard university press, 2000.

AVISE, J. C.; WALKER, D. Species realities and numbers in sexual vertebrates: perspectives from an asexually transmitted genome. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 96, n. 3, p. 992-995, 1999.

AYRES, M. et al. Aplicações estatísticas nas áreas das ciências biomédicas. **Instituto Mamirauá, Belém**, 2007.

BAKER, E. W.; TUTTLE, D. M. **A guide to the spider mites (Tetranychidae) of the United States**. Indira Publishing House, 1994.

BAUMANN-JAGERSBACHER, J. Species differentiation of scutacarid mites (Heterostigmatina) using multivariate morphometric methods.**Experimental and applied acarology**, v. 62, n. 3, p. 279-292, 2014.

BEN-DAVID, T. et al. ITS2 sequences as barcodes for identifying and analyzing spider mites (Acari: Tetranychidae). **Experimental and Applied Acarology**, 2007.

BLAIR, C. A.; GROVES, J. R. Biology of the fruit tree red spider mite, *Metatetranychus ulmi* (Koch) in South East England. 1950.

BLEICHER, E. Ocorrência do ácaro *Panonychus ulmi* (Koch, 1836) Tuttle & Baker (1966) no estado de Santa Catarina. **O Solo**, v.66, n.1, p.64, 1974.

BOLLAND, H. R.; GUTIERREZ, J.; FLECHTMANN, C. H.W. **World catalogue of the spider mite family (Acari: Tetranychidae)**. Brill, 1998.

BONFIELD, J. K.; SMITH, K. F.; STADEN, R. A new DNA sequence assembly program. **Nucleic acids research**, v. 23, n. 24, p. 4992-4999, 1995.

BOTHA, J.; LEARMONTH, S.; MANJIMUP, E. Management of European red mite in western Australia. **Farmnote**, 2005.

BOUBOU, A. et al. Recent emergence and worldwide spread of the red tomato spider mite, *Tetranychus evansi*: genetic variation and multiple cryptic invasions. **Biological invasions**, 2011.

BREEUWER, J. A. J.; WERREN, J. H. Effect of genotype on cytoplasmic incompatibility between two species of Nasonia. **Heredity**, v. 70, n. 4, p. 428-436, 1993.

BROWER, A. V. Z.; DESALLE, R.; VOGLER, A. Gene trees, species trees, and systematics: a cladistic perspective. **Annual Review of Ecology and Systematics**, p. 423-450, 1996.

BULGAK, V. D. Harmfulness of spider mites on apple in the Crimea. In: Novozhilov, R. V. (Ed.) **Injuriousness of insect pests and diseases of agricultural crops.** Leningrad: All Union Lenin Academy of Agricultural Sciences, p.80-86, 1979.

BUSH, G. L. Sympatric host race formation and speciation in frugivorous flies of the genus Rhagoletis (Diptera, Tephritidae). **Evolution**, p. 237-251, 1969.

BUSH, G. L. Modes of animal speciation. **Annual Review Ecological System**, 6, 339–357, 1975.

CATERINO, M. S.; CHO, S.; SPERLING, F. A.H. The current state of insect molecular systematics: a thriving Tower of Babel. **Annual review of entomology**, v. 45, n. 1, p. 1-54, 2000.

CUTHBERTSON, A. G. S.; MURCHIE, A. K. European red spider mite–an environmental consequence of persistent chemical pesticide application. **International Journal of Environmental Science and Technology**, 2005.

CUTHBERTSON, A. G. S.; MURCHIE, A. K. A brief life history of *Panonychus ulmi* (red spider mite) in apple orchards. **Applied Plant Science Division, DARD, Newforge Lane, Belfast BT9 5PX, UK< http://www. ruralni.gov.uk/red_spider_mite_chdb. pdf, accessed at**, v. 29, 2010.

DABERT, M. DNA markers in the phylogenetics of the Acari. **Biological Letters**, v. 2, n. 43, 2006.

DEMITE, P.R.; MCMURTRY, J.A.; MORAES, G.J. de. Phytoseiidae Database: a website for taxonomic and distributional information on phytoseiid mites (Acari). **Zootaxa,** 3795 (5): 571–577, 2014.

DIEHL, S. R.; BUSH, G. L. An evolutionary and applied perspective of insect biotypes. **Annual review of entomology**, v. 29, n. 1, p. 471-504, 1984.

DORKELD, F.; MIGEON, A. **Spider Mites Web: a comprehensive database for the Tetranychidae**. 2013. Disponível em: http://www.montpellier.inra.fr/CBGP/spmweb. Acesso em 01/09/14.

DOWLING, A. P. G. et al. Phylogenetic investigation of the genus Raoiella (Prostigmata: Tenuipalpidae): diversity, distribution, and world invasions. **Experimental and applied acarology**, v. 57, n. 3-4, p. 257-269, 2011.

DRÈS, M.; MALLET, J. Host races in plant–feeding insects and their importance in sympatric speciation. **Philosophical Transactions of the Royal Society of London B: Biological Sciences**, v. 357, n. 1420, p. 471-492, 2002.

EBERMANN, E. et al. A new phoretic mite species with remarks to the phenomenon “Sporothecae”(Acari, Scutacaridae; Hymenoptera, Aculeata).**Zoologischer Anzeiger-A Journal of Comparative Zoology**, v. 252, n. 2, p. 234-242, 2013.

EHARA, S. Revision of the spider mite family Tetranychidae of Japan (Acari, Prostigmata). **Species diversity: an international journal for taxonomy, systematics, speciation, biogeography, and life history research of animals**, v. 4, n. 1, p. 63-141, 1999.

EVANS, G.O. **Principles of Acarology**. Wallingford: CAB International. 563p, 1992.

FELSENSTEIN, J. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. **Evolution**, p. 783-791, 1985.

FERLA, N. J.; BOTTON, M. Ocorrência do ácaro vermelho europeu associado à cultura da videira no Rio Grande do Sul, Brasil. Santa Maria-RS: **Ciência Rural**, 2008.

FERREIRA, D. N. M. **Subsídios para a quarentena vegetal. I. Avaliação da importância quarentenária de ácaros associados a culturas frutíferas para o Brasil. II. Disseminação de ácaros fitófagos através de material para propagação vegetativa de *Arachis pintoi* (Krap. & Greg.) (Fabaceae)**. Tese de Doutorado, 1997.

FLECHTMANN, C. H.W. **Ácaros encontrados sobre maçãs de procedência argentina.** Piracicaba-SP*:* Anais da Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, 1967.

FLECHTMANN, C.H.W. **Elementos de Acarologia**. São Paulo, Livraria Nobel S.A. 344p, 1975.

FOLMER O., et al. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome *c* oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. **Molecular Marine Biology and Biotechnology**, 1994.

FOURNIER, D.; BRIDE, J.; NAVAJAS, M. Mitochondrial DNA from a spider mite: isolation, restriction map and partial sequence of the cytochrome oxidase subunit I gene. **Genetica**, v. 94, n. 1, p. 73-75, 1994.

FURTADO, I. P. Biossistemática e biologia de espécies de Euseius (Acari: Phytoseiidae) associadas à mandioca. **Biossistemática e biologia de espécies de Euseius (Acari: Phytoseiidae) associadas à mandioca**, 1997.

FYTROU, N.; TSAGKARAKOU, A. Reproductive incompatibility between genetically differentiated populations of *Tetranychus urticae* from different host plants. **Entomologia Hellenica** 23: 1-10, 2014.

GALLO, D. et al. **Manual de entomologia agrícola**. São Paulo: Agronômica Ceres, 2002.

GERSON, U.; SMILEY, R. L.; OCHOA, R. **Mites (Acari) for pest control**. John Wiley & Sons, 2008.

GOMI, K.; GOTOH, T. Host plant preference and genetic compatibility of the Kanzawa spider mite, Tetranychus kanzawai Kishida (Acari: Tetranychidae). **Applied Entomology and Zoology**, v. 31, n. 3, p. 417-425, 1996.

GONDIM JR., M.G.C.; MORAES, G. J. de. Compatibilidade reprodutiva de duas populações de Iphiseiodes zuluagai Denmark & Muma (Acari: Phytoseiidae). **Neotropical Entomology,** 2002.

GOTOH, T. Life-cycle variation in *Panonychus akitanus* Ehara (Acarina: Tetranychidae). **Experimental & applied acarology**, v. 2, n. 2, p. 125-136, 1986.

GOTOH, T.; NOGUCHI, O. Developmental success and reproductive incompatibility among populations of the European red mite, *Panonychus ulmi* (Acari: Tetranychidae). **Experimental and Applied Acarology**, 1990.

GOTOH, T.; GOMI, K.; KAMOTO, T. Lethal stage of female embryos in crosses between two local populations of the spider mite, *Tetranychus quercivorus* Ehara et Gotoh (Acari: Tetranychidae).**Experimental & applied acarology**, v. 19, n. 3, p. 129-137, 1995.

GOTOH, T. et al. Nucleus-cytoplasm interactions causing reproductive incompatibility between two populations of *Tetranychus quercivorus* Ehara e Gotoh (Acari: Tetranychidae). **Heredity**, v. 74, n. 4, p. 405-414, 1995.

GOTOH, T.; TOKIOKA T. Genetic compatibility among diapausing red, non-diapausing red and diapausing green forms of the two-spotted spider mite, *Tetranychus urticae* Koch (Acari: Tetranychidae). **Japanese Journal of Entomology**, v. 64, n. 1, p. 215-225, 1996.

GOTOH, T.; GUTIERREZ, J.; NAVAJAS, M. Molecular comparison of the sibling species Tetranychus puearicola Ehara et Gotoh and T. urticae Koch (Acari: Tetranychidae). **Entomological science**, v. 1, n. 1, p. 55-57, 1998.

GRBIĆ, M. et al. The genome of *Tetranychus urticae* reveals herbivorous pest adaptations. **Nature**, v. 479, n. 7374, p. 487-492, 2011.

GUO, J. et al. DNA barcoding reveals the protogyne and deutogyne of Tegolophus celtis sp. nov. (Acari: Eriophyidae). **Experimental and Applied Acarology**, v. 67, n. 3, p. 393-410, 2015.

HALL, T. A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. In: **Nucleic acids symposium series**. p. 95-98, 1999.

HAMMER Ø., HARPER D., RYAN P.D. PAST: paleontological statistics software package for education and data analysis**. Paleontol Electron** 4(1):1–9, 2001.

HEBERT, P. D.N; RATNASINGHAM, S.; DE WAARD, J. R. Barcoding animal life: cytochrome c oxidase subunit 1 divergences among closely related species. **Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences**, v. 270, n. Suppl 1, p. S96-S99, 2003.

HELLE, W.; BOLLAND, H. R. Karyotypes and sex-determination in spider mites (Tetranychidae). **Genetica**, v. 38, n. 1, p. 43-53, 1967.

HELLE, W.; SABELIS, M. W. **Spider mites: their biology, natural enemies and control**. Amsterdam: Elsevier, 1985.

HERBERT, H. J.; BUTLER, K. P. Sex ratio of the European red mite, *Panonychus ulmi* (Acarina: Tetranychidae), in apple orchards in Nova Scotia.**The Canadian Entomologist**, v. 107, n. 08, p. 825-828, 1975.

HERBERT, H. J. Biology, life tables, and intrinsic rate of increase of the European red mite, *Panonychus ulmi* (Acarina: Tetranychidae). **The Canadian Entomologist**, v. 113, n. 01, p. 65-71, 1981.

HILLIS, D. M.; DIXON, M. T. Ribosomal DNA: molecular evolution and phylogenetic inference. **Quarterly Review of Biology**, p. 411-453, 1991.

HUFFAKER, C. B.; VRIE, M. V.; MCMURTRY, J. A. The ecology of tetranychid mites and their natural control. **Annual Review of Entomology**, 1969.

JAGERSBACHER-BAUMANN, J.; EBERMANN, E. Methods for rearing scutacarid mites (Acari, Heterostigmatina) and the influence of laboratory cultures on morphometric variables. **Experimental and Applied Acarology**, v. 59, n. 4, p. 447-462, 2013.

JEPPSON, L.R.; H.H. KEIFER; E.W. BAKER. **Mites injurious to economic plants**. University of Califórnia Press, Berkeley, 612p, 1975.

JOHANN, L. et al. Acarofauna (Acari) associada à videira (*Vitis vinifera* L.) no Estado do Rio Grande do Sul. Porto Alegre-RS: **Biociências**, 2009.

JOHANN, L. et al. Diversity of mites (Acari) in vineyard agroecosystems (Vitis vinifera) in two viticultural regions of Rio Grande Do Sul State, Brazil. **Acarologia**, v. 54, n. 2, p. 137-154, 2014.

KALISZEWSKI, M. J. et al. The polymerase cham reaction and sequencing of mite DNA. **International Journal of Acarology**, 18(3), 231- 239, 1992.

KHAING, T. M.; SHIM, J.; LEE, K. Molecular identification of four *Panonychus* species (Acari: Tetranychidae) in Korea, including new records of *P. caglei* and *P. mori*. **Entomological Research**, v. 45, n. 6, p. 345-353, 2015.

KIEFER, H. H. Eriophyid Studies C3. **Agric. Res. Serv**. U. S. Dep. Agric. 24 pp, 1969.

KIMURA, M. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. **Journal of molecular evolution**, v. 16, n. 2, p. 111-120, 1980.

KIST, B. B. et al. **Anuário brasileiro da maçã 2015**. Editora Gazeta Santa Cruz Sul, 72 p, 2015.

KITASHIMA Y; GOTOH T. Host Range Difference and Reproductive Incompatibility among Five Populations of the Citrus Red Mite, *Panonychus citri* (McGregor) (Acari: Tetranychidae).Journal of the Acarological Society of Japan Vol. 4, No. 2 P 91-101, 1995.

KLIMOV, P. B.; BOCHKOV, A. V.; OCONNOR, B. M. Host specificity and multivariate diagnostics of cryptic species in predacious cheyletid mites of the genus Cheletophyes (Acari: Cheyletidae) associated with large carpenter bees. **Biological Journal of the Linnean Society**, v. 87, n. 1, p. 45-58, 2004.

KLINGENBERG, C. P. Morphometrics and the role of the phenotype in studies of the evolution of developmental mechanisms. **Gene**, v. 287, n. 1, p. 3-10, 2002.

KOVALESKI, A. et al. Controle químico em macieiras. **Mosca-das-frutas de importância econômica no Brasil: conhecimento básico e aplicado. Ribeirão Preto: Holos**, p. 135-141, 2000.

KNAPP, M.; WAGENER, B.; NAVAJAS, M. Molecular discrimination between the spider mite *Tetranychus evansi* Baker & Pritchard, an important pest of tomatoes in southern Africa, and the closely related species *T. urticae* Koch (Acarina: Tetranychidae). **African Entomology**, v. 11, n. 2, p. 300-304, 2003.

KNEE, W. et al. Cryptic species of mites (Uropodoidea: Uroobovella spp.) associated with burying beetles (Silphidae: Nicrophorus): The collapse of a host generalist revealed by molecular and morphological analyses. **Molecular phylogenetics and evolution**, v. 65, n. 1, p. 276-286, 2012.

KRANTZ, G. W.; WALTER, D. E. **A Manual of Acarology**, 3rd. 2009.

LATTIG, P.; SAN MARTÍN, G.; MARTIN, D. Taxonomic and morphometric analyses of the Haplosyllis spongicola complex (Polychaeta: Syllidae: Syllinae) from Spanish seas, with re-description of the type species and descriptions of two new species. **Scientia Marina**, v. 71, n. 3, p. 551-570, 2007.

LYNCH, M.; KOSKELLA, B.; SCHAACK, S. Mutation pressure and the evolution of organelle genomic architecture. **Science**, v. 311, n. 5768, p. 1727-1730, 2006.

LOFEGO, A. C. **Caracterização morfologica e distribuição geográfica das espécies de Amblyseiinae (Acari: Phytoseiidae) no Brasil.** Tese de Doutorado. Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, 1998.

MAGALHÃES, S. et al. Host race formation in the Acari. **Experimental and Applied Acarology**, v. 42, n. 4, p. 225-238, 2007.

MAHANI, M. K. et al. Genetic variation in populations of Allothrombium pulvinum (Acari: Trombidiidae) from Northern Iran revealed by mitochondrial coxI and nuclear rDNA ITS2 sequences. **Experimental and Applied Acarology**, v. 48, n. 4, p. 273-289, 2009.

MALAGNINI, V. et al. Differences between sympatric populations of *Eotetranychus carpini* collected from *Vitis vinifera* and *Carpinus betulus*: insights from host-switch experiments and molecular data. **Experimental and applied acarology**, v. 56, n. 3, p. 209-219, 2012.

MARINI, R. P., PFEIFFER, D.G., SOWERS, D.S. Influence of European red mite (Acari: Tetranychidae) and crop density on fruit size, quality and on crop value of 'Delicious' apples. **Environmental Entomology**, 87:1302–1311, 1994.

MARTIN, P.; DABERT, M.; DABERT, J. Molecular evidence for species separation in the water mite *Hygrobates nigromaculatus* Lebert, 1879 (Acari, Hydrachnidia): evolutionary consequences of the loss of larval parasitism. **Aquatic Sciences**, v. 72, n. 3, p. 347-360, 2010.

MATSUDA, T. et al. Molecular-based identification and phylogeny of Oligonychus species (Acari: Tetranychidae). **Journal of economic entomology**, v. 105, n. 3, p. 1043-1050, 2012.

MATSUDA, T. et al. Phylogenetic analysis of the spider mite sub-family Tetranychinae (Acari: Tetranychidae) based on the mitochondrial COI gene and the 18S and the 5′ end of the 28S rRNA genes indicates that several genera are polyphyletic. **PloS one**, v. 9, n. 10, p. e108672, 2014.

MAYR, E. Speciation phenomena in birds. **American Naturalist**, p. 249-278, 1940.

MELLO, L.M.R.; PROTAS, J. F. S. **Produção e Mercado de Uvas Viníferas**. 2003. Disponível em: http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Uva/UvasViniferasRegioesClimaTemperado/mercado.htm#topo. Acesso em 15 maio 2014.

MELLO, L.M.R. de. **Vitivinicultura brasileira: Panorama 2007**. EMBRAPA Uva e Vinho: Artigos Técnicos, 2008.

MELLO, L. M. R. **Panorama da Vitivinicultura Brasileira 2014**. Embrapa Uva e Vinho: Artigos Técnicos, 2015.

MENDONÇA, R. S. de. **Estudos taxonômicos de ácaros Tetranichidae no Brasil e filogenia e estrutura genética do ácaro rajado *Tetranychus urticae* (Koch) inferidas a partir de sequências do DNA ribossômico e mitocondrial.** Tese (Doutorado em Biologia Animal). Brasília-DF: Fundação Universidade de Brasília e Université Montpellier II, 2009.

MENDONÇA, R. S. de et al. A critical review on some closely related species of *Tetranychus* sensu stricto (Acari: Tetranychidae) in the public DNA sequences databases. **Experimental and Applied Acarology**, 2011.

MENDONÇA, R. S. et al. South American spider mites: New hosts and localities. **Journal of Insect Science**, v. 11, n. 1, p. 121, 2011.

MONTEIRO, L. B. Manejo integrado de pragas em macieira no Rio Grande do Sul II. Uso de Neoseiulus californicus para o controle de *Panonychus ulmi*. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 24, n. 2, p. 395-405, 2002.

MORAES, E. M. et al. Divergence in wing morphology among sibling species of the *Drosophila buzzatii* cluster. **Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research**, v. 42, n. 2, p. 154-158, 2004.

MORAES, G. J. de; FLECHTMANN, C.H.W. **Manual de Acarologia: Acarologia básica e ácaros de plantas cultivadas no Brasil**. Ribeirão Preto-SP: Holos, 2008.

MOREETEAU, B. et al. Morphometrical evolution in a Drosophila clade: the Drosophila obscura group. **Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research**, v. 41, n. 1, p. 64-71, 2003.

MULLIS, K. B. et al. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. **Biotechnology Series**, p. 17-17, 1992.

NAVAJAS, M. et al. Molecular approach in spider mites (Acari: Tetranychidae): preliminary data on ribosomal DNA sequences. **Experimental and Applied Acarology**, 1992.

NAVAJAS, M. et al. Intraspecific diversity of the cassava green mite *Mononychellus progresivus* (Acari: Tetranychidae) using comparisons of mitochondrial and nuclear ribosomal DNA sequences and cross-breeding. **Experimental & applied acarology**, v. 18, n. 6, p. 351-360, 1994.

NAVAJAS, M. et al. Mitochondrial COI sequences in mites: evidence for variations in base composition. **Insect Molecular Biology**, v. 5, n. 4, p. 281-285, 1996.

NAVAJAS, M. et al. Mitochondrial cytochrome oxidase I in tetranychid mites: a comparison between molecular phylogeny and changes of morphological and life history traits. **Bulletin of Entomological Research**, v. 86, n. 04, p. 407-417, 1996.

NAVAJAS, M. Host plant associations in the spider mite Tetranychus urticae (Acari: Tetranychidae): insights from molecular phylogeography. **Experimental & applied acarology**, v. 22, n. 4, p. 201-214, 1998.

NAVAJAS, M. et al. Species-wide homogeneity of nuclear ribosomal ITS2 sequences in the spider mite Tetranychus urticae contrasts with extensive mitochondrial COI polymorphism. **Heredity**, 1998.

NAVAJAS, M. et al. DNA sequences and cross-breeding experiments in the hawthorn spider mite *Amphitetranychus viennensis* reveal high genetic differentiation between Japanese and French populations. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v. 90, n. 2, p. 113-122, 1999.

NAVAJAS, M.; FENTON, B. The application of molecular markers in the study of diversity in acarology: a review. **Experimental and Applied Acarology**, v. 24, n. 10-11, p. 751-774, 2000.

NAVAJAS, M.; BOURSOT, P. Nuclear ribosomal DNA monophyly versus mitochondrial DNA polyphyly in two closely related mite species: the influence of life history and molecular drive. **Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences**, v. 270, n. Suppl 1, p. S124-S127, 2003.

NAVIA, D.; FLECHTMANN, C. H. W.; MORAES, GJ de. **Avaliação do risco de introdução de ácaros fitófagos associados à cultura da uva no Brasil**. Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 1998.

NAVIA, D. et al**.** The invasive coconut mite *Aceria guerreronis* (Acari: Eriophyidae): origin and invasion sources inferred from mitochondrial (16S) and nuclear (ITS) sequences. **Bulletin of Entomological Research**, 2005.

NAVIA, D.; MARSARO JR, A. L. First report of the citrus hindu mite, *Schizotetranychus hindustanicus* (Hirst)(Prostigmata: Tetranychidae), in Brazil. **Neotropical Entomology**, v. 39, n. 1, p. 140-143, 2010.

NAVIA, D.; MORAES, G. J.; QUERINO, R. B. Geographic pattern of morphological variation of the coconut mite, *Aceria guerreronis* Keifer (Acari: Eriophyidae), using multivariate morphometry. **Brazilian Journal of Biology**, v. 69, n. 3, p. 773-783, 2009.

NAVIA, D. et al. Reproductive compatibility and genetic and morphometric variability among populations of the predatory mite, *Amblyseius largoensis* (Acari: Phytoseiidae), from Indian Ocean Islands and the Americas. **Biological Control**, v. 72, p. 17-29, 2014.

NORONHA, A. C. da S. **Caracterização morfológica e molecular de ácaros predadores do gênero Euseius (Acari, Phytoseiidae)**. Tese (Doutorado em Entomologia) – Piracicaba-SP: Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, 2002.

OVERMEER, W. P. J.; VAN-ZON, A.Q. Partial reproductive incompatibility between populations of spider mites (Acarina: Tetranychidae). **Entomologia experimentalis et applicata**, v. 20, n. 3, p. 225-236, 1976.

PAINTER, R. H. Insect resistance in crop plants. **Soil Science**, v. 72, n. 6, p. 481, 1951.

PINTO Jr. A. R., MACCARI Jr. A., KOZLOWSKI L. A. e TRATCH R. Ácaro em Maçã. **Revista Cultivar Hortaliças e Frutas,** PUC/PR, nº 31 - Abril/Maio 2005.

PRIETO, C. G.; MUNGUIRA, M. L.; ROMO, H. Morphometric analysis of genitalia and wing pattern elements in the genus Cupido (Lepidoptera, Lycaenidae): are *Cupido minimus* and *C. carswelli* different species? **Deutsche Entomologische Zeitschrift**, v. 56, n. 1, p. 137-147, 2009.

REIS, S. F. dos. Morfometria e estatística multivariada em biologia evolutiva. **Revista Brasileira de Zoologia**, v. 5, n. 4, p. 571-580, 1988.

RODRIGUES, J. R. O. **Os ácaros fitoseídeos na limitação natural do aranhiço-vermelho em fruteiras e vinha.** Ponte de Lima – Portugal: Instituto Politécnico de Viana do Castelo/Escola Superior Agrária de Ponte de Lima, 2005.

ROS, V. I.D.; BREEUWER, J. A.J. Spider mite (Acari: Tetranychidae) mitochondrial COI phylogeny reviewed: host plant relationships, phylogeography, reproductive parasites and barcoding. **Experimental and Applied Acarology**, v. 42, n. 4, p. 239-262, 2007.

ROZAS, J. et al. DnaSP, DNA polymorphism analyses by the coalescent and other methods. **Bioinformatics**, v. 19, n. 18, p. 2496-2497, 2003.

ROY, L. et al. Diversity of phylogenetic information according to the locus and the taxonomic level: an example from a parasitic mesostigmatid mite genus. **International journal of molecular sciences**, v. 11, n. 4, p. 1704-1734, 2010.

SABELIS M.W. **Reproductive strategies**. In: Sabelis MW, Helle W, eds. Spider mites: Their biology, natural enemies and control. Amsterdam: Elsevier. pp 265–278, 1985.

SALOMONE, N.; BERNINI, F. Mitochondrial DNA variation and phylogeography of Steganacarus on Tenerife (Canary Islands). In: **Acarid Phylogeny and Evolution: Adaptation in Mites and Ticks**. Springer Netherlands, p. 35-39, 2002.

SIMON, C. et al. Evolution, weighting, and phylogenetic utility of mitochondrial gene sequences and a compilation of conserved polymerase chain reaction primers. **Annals of the entomological Society of America**, v. 87, n. 6, p. 651-701, 1994.

SILVA, M. L. da. **Análise da Diversidade Genética dos Afídeos *Schizaphis graminum* (Rondani) e *Metopolophium dirhodum* (Walker) (Hemíptera: Aphididae)**. Tese doutorado Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas, Entomologia, Universidade Federal do Paraná, 2005.

SKORACKA, A.; DABERT, M. The cereal rust mite *Abacarus hystrix* (Acari:

Eriophyoidea) is a complex of species: evidence from mitochondrial and nuclear DNA sequences. **Bulletin of entomological research**, v. 100, n. 03, p. 263-272, 2010.

SKORACKA, A. et al. Cryptic species within the wheat curl mite *Aceria tosichella* (Keifer) (Acari: Eriophyoidea), revealed by mitochondrial, nuclear and morphometric data. **Invertebrate systematics**, v. 26, n. 4, p. 417-433, 2012.

SOURASSOU, N. F. et al. Morphological variation and reproductive incompatibility of three coconut-mite-associated populations of predatory mites identified as *Neoseiulus paspalivorus* (Acari: Phytoseiidae). **Experimental and Applied Acarology**, v. 53, n. 4, p. 323-338, 2011.

SOURASSOU, N. F. et al. Morphological, molecular and cross-breeding analysis of geographic populations of coconut-mite associated predatory mites identified as *Neoseiulus baraki*: evidence for cryptic species? **Experimental and applied acarology**, v. 57, n. 1, p. 15-36, 2012.

SOUSA, J.S.I de. **Uvas para o Brasil**. Piracicaba-SP: FEALQ, 1996.

TAMURA, K. Estimation of the number of nucleotide substitutions when there are strong transition-transversion and G+ C-content biases.**Molecular biology and evolution**, v. 9, n. 4, p. 678-687, 1992.

TAMURA, K. et al. MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. **Molecular biology and evolution**, p. mst197, 2013.

TODA, S.; OSAKABE, M. H.; KOMAZAKI, S. Interspecific diversity of mitochondrial COI sequences in Japanese Panonychus species (Acari: Tetranychidae). **Experimental & applied acarology**, v. 24, n. 10-11, p. 821-829, 2000.

TOMCZYK, A.; KROPCZYNSKA, D., 1985. **Effects on the host plant.** In: Helle, W., Sabelis, M.W. (Eds.). Spider Mites, Their Biology, Natural Enemies and Control, vol. 1A. Elsevier, Amsterdam, pp. 312 e 330, 1985.

THOMPSON, J. D.; HIGGINS, D. G.; GIBSON, T. J. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. **Nucleic acids research**, v. 22, n. 22, p. 4673-4680, 1994.

VAN LEEUWEN, T. et al. Mitochondrial heteroplasmy and the evolution of insecticide resistance: non-Mendelian inheritance in action. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 105, n. 16, p. 5980-5985, 2008.

VAN LEEUWEN, T. et al. Acaricide resistance mechanisms in the two-spotted spider mite *Tetranychus urticae* and other important Acari: A review. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 40, n. 8, p. 563-572, 2010.

WALTER, D. E.; CAMPBELL, N. J.H. Exotic vs endemic biocontrol agents: would the

real Stratiolaelaps mites (Berlese) (Acari: Mesostigmata: Laelapidae), please stand up? **Biological Control**, v. 26, n. 3, p. 253-269, 2003.

WALTER, D. E.; PROCTOR, H. C. **Mites: ecology, evolution, and behaviour**. Sydney: UNSW Press, 1999.

WYBOUW, N. et al. A horizontally transferred cyanase gene in the spider mite *Tetranychus urticae* is involved in cyanate metabolism and is differentially expressed upon host plant change**. Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 42, n. 12, p. 881-889, 2012.

XIE, L.; HONG, X.; XUE, X. Population genetic structure of the two spotted spider mite (Acari: Tetranychidae) from China. **Annals of the Entomological Society of America**, v. 99, n. 5, p. 959-965, 2006.

XU, W. et al. The relationship between the rate of molecular evolution and the rate of genome rearrangement in animal mitochondrial genomes. **Journal of molecular evolution**, v. 63, n. 3, p. 375-392, 2006.

YIN, WD. et al. Age-Stage Two-Sex Life Tables of *Panonychus ulmi* (Acari: Tetranychidae), on Different Apple Varieties. **Journal of economic entomology**, v. 106, n. 5, p. 2118-2125, 2013.

YUAN, M. L. et al. The complete mitochondrial genome of the citrus red mite *Panonychus citri (*Acari: Tetranychidae): high genome rearrangement and extremely truncated tRNAs. **BMC genomics**, v. 11, n. 1, p. 597, 2010.

ZHANG, Z. Q. **Mites of greenhouses: identification, biology and control**. CABI, 2003.

ZHANG, Z. Q.; JACOBSON, R. Using adult female morphological characters for differentiating *Tetranychus urticae* complex (Acari: Tetranychidae) from greenhouse tomato crops in UK. **Systematic and applied acarology**, v. 5, p. 69-76, 2000.