

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA ANIMAL

**ESTUDOS TAXONÔMICOS DE ÁCAROS TETRANYCHIDAE
NO BRASIL E FILOGENIA E ESTRUTURA GENÉTICA DO
ÁCARO RAJADO, *TETRANYCHUS URTICAE* KOCH, INFERIDAS
A PARTIR DE SEQUÊNCIAS DO DNA RIBOSSÔMICO E
MITOCONDRIAL**

RENATA SANTOS DE MENDONÇA

TESE (DOUTORADO)

BRASÍLIA - DF
JUNHO DE 2009



**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA ANIMAL**



**UNIVERSITÉ MONTPELLIER II
SCIENCES ET TECHNIQUES DU LANGUEDOC
ECOLE DOCTORALE SIBAGHE - Systèmes intégrés en Biologie,
Agronomie, Géosciences, Hydrosciences et Environnement**

**ESTUDOS TAXONÔMICOS DE ÁCAROS TETRANYCHIDAE NO BRASIL E
FILOGENIA E ESTRUTURA GENÉTICA DO ÁCARO RAJADO, *TETRANYCHUS
URTICAE* KOCH, INFERIDAS A PARTIR DE SEQUÊNCIAS DO DNA
RIBOSSÔMICO E MITOCONDRIAL**

RENATA SANTOS DE MENDONÇA

TESE (DOUTORADO)
CO-TUTELA ENTRE A FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA E A
UNIVERSITÉ MONTPELLIER II

**ORIENTADOR: IVONE REZENDE DINIZ
ORIENTADOR DA CO-TUTELA: MARIA NAVAJAS
CO-ORIENTADOR: DENISE NAVIA**

BRASÍLIA - DF
JUNHO DE 2009

MENDONÇA, Renata Santos de.

Estudos taxonômicos de ácaros Tetranychidae no Brasil e filogenia e estrutura genética do ácaro rajado, *Tetranychus urticae* Koch, inferidas a partir de sequências do DNA ribossômico e mitocondrial / Renata Santos de Mendonça; Orientação Ivone Rezende Diniz; Orientação da co-tutela Maria Navajas, Co-Orientação Denise Navia. Brasília0 2009.

xx, 235 p.: il.

Tese (Doutorado) Universidade de Brasília / Instituto de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal, 2009.

1. Ácaros fitófagos 2. Taxonomia 3. Biologia molecular e Variabilidade genética

I. Diniz, Ivone Rezende, Dr^a (orient.). II. Navajas, Maria Dr^a (orient. co-tutela). III. Navia, Denise Dr^a (co-orient.). IV. Título.

CESSÃO DE DIREITOS

Nome do Autor: Renata Santos de Mendonça

Tese de Doutorado: Estudos taxonômicos de ácaros Tetranychidae no Brasil e filogenia e estrutura genética do ácaro rajado, *Tetranychus urticae* Koch, inferidas a partir de sequências do DNA ribossômico e mitocondrial.

Grau: Doutor Ano: 2009.

É concedida à Universidade de Brasília permissão para reproduzir cópias desta tese de doutorado e para emprestar ou vender tais cópias somente para propósitos acadêmicos e científicos. O autor reserva-se a outros direitos de publicação e nenhuma parte desta tese de doutorado pode ser reproduzida sem a autorização por escrito do autor.

Renata Santos de Mendonça

CPF: 102.041.388-33

SQS 403, Bloco R, Apto. 107 - Asa Sul – CEP 70237-180

Brasília – DF – Brasil -

Telefone: (61) 3877-8542

e-mail: renata.dener@gmail.com



Tese de Doutorado

Renata Santos de Mendonça

Título:

“Estudos taxonômicos de ácaros Tetranychidae no Brasil e filogenia e estrutura genética do ácaro rajado, *Tetranychus urticae* Koch, inferida a partir de seqüências do DNA ribossômico e mitocondrial”

Comissão Examinadora:

Prof. Dra. Ivone Rezende Diniz
Presidente / Orientadora
UnB

Prof. Dra. Maria Navajas
Membro Titular Externo não Vinculado ao Programa
Universidade de Montpellier II

Prof. Dr. Carlos Holger Wenzel Flechtmann
Membro Titular Externo não Vinculado ao Programa
ESALQ/USP

Prof. Dr. Reinaldo José Fazzio Feres
Membro Titular Externo não Vinculado ao Programa
UNESP

Prof. Dra. Rosana Tidon
Membro Titular Interno Vinculado ao Programa
UnB

Prof. Dr. José Roberto Pujol Luz
Membro Suplente
Interno Vinculado ao Programa
UnB

Brasília, 25 de junho de 2009.

A Deus,

AGRADEÇO

**Aos meus pais Nelson e Jaíra,
ao meu irmão Rogério,
pelo amor, apoio incondicional e compreensão**

**Aos meus sogros Walter e Zilma,
pelo carinho, apoio e confiança**

**Ao meu marido Dener,
aos meus filhos Felipe e Diego,
pelo amor, estímulo, companheirismo e compreensão**

DEDICO

Às pesquisadoras

Ivone Rezende Diniz

Maria Navajas e Denise Navia

Pela orientação, apoio e exemplo de dedicação

Agradeço especialmente

AGRADECIMENTOS

À Universidade de Brasília, Instituto de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal e ao corpo docente pelo conagraçamento intelectual.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão da bolsa de doutorado e pelo apoio à pesquisadora visitante, Maria Navajas.

À Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de doutorado para o curso em regime de co-tutela de tese, Fundação Universidade de Brasília/Université Montpellier II – Sciences et Techniques du Languedoc.

À Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia por todo o suporte para o desenvolvimento deste trabalho.

Ao Centre de Biologie et Gestions des Populations (CBGP), Institut National de Recherche Agronomique, pela oportunidade de realização dos trabalhos de pesquisa com biologia molecular.

À Maria Regina Vilarinho de Oliveira, Maria de Fátima Batista e Olinda Maria Martins, pesquisadoras da Embrapa Cenargen pela confiança, incentivo e amizade.

Aos pesquisadores Carlos H. W. Flechtmann, CNPq, ESALQ, USP, Piracicaba, São Paulo e Samuel Paiva, Embrapa Cenargen, pela transmissão de conhecimentos e experiências fundamentais para execução de etapas do projeto de pesquisa.

Aos pesquisadores colaboradores e suas Instituições, por todo o suporte nas coletas, ademais, pelo envio de amostras de *T. urticae*, essenciais para o desenvolvimento do projeto de pesquisa: **no Brasil** - Fábio Aquino Albuquerque, Embrapa, Centro Nacional de Pesquisa de Algodão, Campina Grande, Paraíba

(fabio@cnpa.embrapa.br); Adalton Raga e Mario E. Sato, Instituto Biológico de São Paulo, Campinas, SP (adalton@biologico.sp.gov.br; mesato@biologico.sp.gov.br); Marineide Rosa Vieira, Faculdade de Ciências Agrônômicas, UNESP, Botucatu, São Paulo (marineide@bio.feis.unesp.br); Lino Bittencourt Monteiro, Universidade Federal do Paraná, Paraná, RS (libmonteiro@terra.com.br); Manoel G. C. Gondin, Universidade Federal Rural de Pernambuco (mguedes@ufrpe.br); José Maria Milanez, Embrapa Trigo, Passo Fundo, RS (milanez@epagri.rct-sc.br); Empresa Caliman, Espírito Santo (papaya@calimanagr.com.br); Aloyséia Cristina Noronha, Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical, Cruz das Almas, BA (aloyseia@cpatu.embrapa.br); Marcílio Thomazini, Embrapa Acre (marcilio@cpafac.embrapa.br); Marcone C. M. Chagas, Empresa de Pesquisa Agropecuária do Rio Grande do Norte, Natal, RN (marcone@rn.gov.br); Elton Lúcio de Araújo, Universidade Federal Rural do Semi-Árido, Mossoró, RN, (elton@ufersa.edu.br); Ricardo Adaime da Silva, Embrapa, Amapá (ricardoadaime@cpafap.embrapa.br); Paulo E. Degrande, Universidade Federal da Grande Dourados, Dourados, MS (paulo.degrande@uol.com.br); Marcelo Poletti, PROMIP - Comércio, Pesquisa e Desenvolvimento de Agentes Biológicos Ltda, Piracicaba, São Paulo (: www.promip.agr.br) e aos estudantes Renato Tratch, (rtratch@rla01.pucpr.br) e Samuel Rogger, rogger@yahoo.com.br. **No exterior** - Ingeborg Klingen, Noruega do *Norwegian Institute for Agricultural and Environmental Research (Bioforsk), Plant Health*; Angham Boubou, Síria, estudante de Doutorado na *Université Montpellier II*, Anastasia Tsagkarakou, Grécia do *Laboratory of Plant Biotechnology, Institute of Horticulture and Floriculture, National Agricultural Research Foundation, Heraklion* e; Miodrag Grbic, Canadá da *University of Western Ontario – Department of Biology – B&G Building – London, Ontário*. As amostras de London foram coletadas na criação de referência e são mantidas em laboratório desde 1992 para o desenvolvimento das atividades o projeto de seqüenciamento do genoma completo de *T. urticae*. E, a Alain Migeon, pesquisador da equipe de acarologia do Laboratório do CBGP, pelo auxílio nas coletas e na obtenção de amostras da França, Espanha e Polônia.

À Sandrine CROS-ARTEIL, INRA/CBCP, pelo treinamento nas técnicas moleculares e acompanhamento nas atividades desenvolvidas; e a todos os colegas do CBGP, Montferrier-sur-Lez, França, especialmente, Nathalie, Jean-François,

Anne-Laure, Philippe Audiot, Cécile, Frank, Gwenaelle, Silvy Hart, Silvy Christine, Roula, Jean-Philippe e Marie-Stephanie/Mirreille.

Ao Comitté de Thèse pelas sugestões e encaminhamento da pesquisa: Denis Bourguet, Elisabeth Fournier, George Roderick, Isabelle Olivieri e Benît Falcon.

A Alain, Angham, Mirreille, Astrid e Sandrine pelo carinho, amizade e incentivo durante a minha estadia no CBGP.

A Vieira, Karen, Júlia, Rosemaire e Francisco pela grande amizade e apoio durante á jornada no exterior.

À equipe do Laboratório de Quarentena Vegetal, em especial às companheiras de todas as horas Marcella, Letícia, Tatiane, Lílian e Denise pelo apoio incondicional, estímulo e a grande amizade. Bem como, Shirley Franx, Eliete, Meiriane, Aline, Elisa, Rose e Gabriela Magarelli pelo carinho e atenção. Aos companheiros de sala Wesley, Jocélio, Berghen, Isis, Viviane, Carol e Cássia pelo apoio, paciência e compreensão.

E, a todos os colegas, funcionários e pesquisadores do Núcleo Temático de Segurança Biológica da Embrapa Cenargen pela amizade e por todos os momentos compartilhados, que serão para sempre lembrados com muitas saudades (ressalvo-me a não citar nomes pelo carinho que tenho a todos).

SUMÁRIO

	Página
RESUMO	xvii
ABSTRACT	xix
1. INTRODUÇÃO	1
OBJETIVOS GERAIS	4
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	4
2. REVISÃO DA LITERATURA	5
2.1. O ácaro rajado, <i>Tetranychus urticae</i> Koch – aspectos gerais	5
2.1.1. Importância econômica e controle.....	6
2.1.2. Ocorrência de biótipos/raças hospedeiras.....	10
2.1.3. Caracterização de biótipos como subsídio à adoção de medidas fitossanitárias.....	12
2.2. Utilização de marcadores moleculares em Acarologia	14
2.2.1. DNA mitocondrial – <i>mtDNA</i>	15
2.2.2. DNA nuclear ribossomal - <i>rDNA</i>	17
2.2.3. DNA nuclear ribossomal <i>versus</i> DNA mitocondrial	18
2.2.4. Estudos filogenéticos e filogeográficos	21
2.2.5. Métodos em análise filogenética molecular.....	24

CAPÍTULO 1

ÁCAROS TETRANIQUÍDEOS (PROSTIGMATA: TETRANYCHIDAE) NO BRASIL - NOVOS HOSPEDEIROS, LOCALIDADES E TÁXONS

RESUMO	27
ABSTRACT	28
1.1. INTRODUÇÃO	29
OBJETIVOS	31
1.2. MATERIAL E MÉTODOS	32
1.2.1. Obtenção de amostras	32
1.2.2. Inspeção e processamento de amostras	35
1.2.3. Preservação de ácaros tetraniquídeos	37
1.2.4. Identificação morfológica de ácaros tetraniquídeos	39
1.2.5. Diagnose e caracterização morfológica de novas espécies de tetraniquídeos do Brasil	39
1.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	41
1.3.1. Novos hospedeiros para ácaros tetraniquídeos no Brasil, na América do Sul e no mundo	42
1.3.2. Novas localidades de ocorrência para espécies de tetraniquídeos no Brasil	54
1.3.3. Novas espécies de ácaros tetraniquídeos (Acari: Tetranychidae) do Brasil.....	62
1.4. CONCLUSÕES	64

Lista de Figuras

Figura 1.1. Estados e respectivos pontos de amostragem de material vegetal, visando a coleta de ácaros tetraniquídeos no Brasil, no período de outubro de 2004 a julho de 2008	33
Figura 1.2. Coleta de amostra de material vegetal	36

	Página
Figura 1.3. Acondicionamento da amostra de material vegetal em saco de papel.....	36
Figura 1.4. Acondicionamento da amostra de material vegetal em saco plástico.....	36
Figura 1.5. Amostra embalada contendo a etiqueta de identificação	36
Figura 1.6. Caixa de isopor contendo bolsas térmicas de gelo sintético para o armazenamento e transporte das amostras	36
Figura 1.7. GPS (Global Positioning System) marca Garmin modelo 12 utilizado na determinação das coordenadas geodésicas	36
Figura 1.8. Método de lavagem utilizado para extração de ácaros-peneiramento após a submersão do material vegetal em solução com detergente	38
Figura 1.9. Método de lavagem utilizado para extração de ácaros - lavagem da peneira de menor abertura com jato de álcool 70%	38
Figura 1.10. Método de lavagem utilizado para extração de ácaros -transferência de partículas retidas na peneira de menor abertura para pote plástico utilizado no armazenamento das amostras em álcool etílico a 70%	38
Figura 1.11. Acondicionamento dos potes plásticos contendo a solução em álcool etílico a 70% resultante da lavagem do material vegetal	38
Figura 1.12.A. Localidades e espécies de ácaros tetraniquídeos coletados no Brasil no período de outubro de 2004 a julho de 2008	56
Figura 1.12.B. Localidades e espécies de ácaros tetraniquídeos coletados no Brasil no período de outubro de 2004 a julho de 2008	57
Figura 1.13. <i>Eotetranychus smithi</i> Pritchard e Baker, 1955. Macho. <i>aedeagus</i>	59
Figura 1.14. Mapa de distribuição do ácaro <i>Eotetranychus smithi</i> Pritchard e Baker, com a indicação da sua presença na região Norte do Brasil no município de Rio Branco, Acre, primeiro relato para a América do Sul. 2008	58
Figura 1.15. <i>Oligonychus</i> n. sp. 2. Macho, <i>aedeagus</i>	59

Lista de Tabelas

Tabela 1.1. Dados de coleta registrados para cada amostra	35
Tabela 1.2. Espécies de ácaros tetraniquídeos da subfamília Tetranychinae coletadas no Brasil, no período de 10/2004 a 07/2008, com o número de locais, de hospedeiros e de coletas realizadas para cada espécie.....	41
Tabela 1.3. Informações sobre localidade, hospedeiro, data de coleta e coletor para as quatro novas espécies de tetraniquídeos coletadas no Brasil.....	63

CAPÍTULO 2

CONFIABILIDADE TAXONÔMICA DAS SEQUÊNCIAS DE DNA EM BANCOS DE DADOS DE LIVRE ACESSO: UMA REVISÃO CRÍTICA COM ÁCAROS *TETRANYCHUS* DO GRUPO *TELARIUS* (PROSTIGMATA: TETRANYCHIDAE)

RESUMO.....	65
ABSTRACT.....	66
2.1. INTRODUÇÃO	67
OBJETIVOS.....	71
2.2. MATERIAL E MÉTODOS	72
2.2.1 Amostragens de <i>T. urticae</i>	72
2.2.2. Identificação morfológica das espécies.....	72
2.2.3. Extração de DNA	73
2.2.4. Amplificação por PCR e sequenciamento.....	73
2.2.5. Conjunto de dados de sequências	76
2.2.6. Alinhamento das sequências e análises filogenéticas.....	77
2.2.6.1. Variação nas sequências ITS2 do DNA ribossômico para as espécies do grupo <i>telarius</i>	79
2.2.6.2. Divergência dos pares ordenados de nucleotídeos (pairwise nucleotide divergence).....	79
2.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	80
2.3.1. Variação das sequências da segunda região intergênica codificadora (ITS2) do DNA ribossômico nas espécies do grupo <i>telarius</i>	80
2.3.2. Variação das sequências do <i>Citocromo Oxidase I</i> , região do DNA mitocondrial nas espécies do grupo <i>telarius</i>	87
2.3.3. Coletas de ácaros.....	92
2.4. CONSIDERAÇÕES FINAIS	93

Lista de Figuras

Figura 2.1. Relações filogenéticas baseadas nas sequências ITS2 de <i>Tetranychus cinnabarinus</i> , <i>T. urticae</i> , <i>T. kanzawai</i> , <i>T. truncatus</i> , <i>T. turkestanii</i> e <i>T. pueraricola</i> (ANEXO 4). O método Neighbour-Joining foi usado baseado nas distâncias calculadas pelo algoritmo Kimura 2 parâmetros. Valores de <i>bootstraps</i> (10.000 replicações) em porcentagem são mostrados próximos às ramificações. A escala indica as distâncias evolutivas inferidas pelos números de substituições de bases por posição.....	83
Figura 2.2. Distribuição da distância genética entre 28 populações do ácaro, <i>Tetranychus cinnabarinus</i> (ANEXO 5), baseada nas sequências do gene mitocondrial, fragmento <i>COI</i>	88
Figure 2.3. Relações filogenéticas baseadas nas sequências <i>COI</i> , de <i>Tetranychus cinnabarinus</i> , <i>T. urticae</i> , <i>T. kanzawai</i> , <i>T. truncatus</i> , <i>T. turkestanii</i> (ANEXO 5). O método Neighbour-Joining foi usado baseado nas distâncias calculadas pelo algoritmo Kimura 2 parâmetros. Valores de <i>bootstraps</i> (10.000 replicações) em porcentagem são mostrados próximos às ramificações. A escala indica as distâncias evolutivas inferidas pelos números de substituições de bases por posição.....	89

Lista de Tabelas

Tabela 2.1. . Procedência das populações de <i>Tetranychus urticae</i> cujas sequencias de DNA foram utilizadas no presente estudo.....	75
--	----

Tabela 2.2. Fragmentos amplificados e <i>primers</i> utilizados na reação de <i>PCR</i> e no seqüenciamento do DNA dos espécimens de <i>Tetranychus urticae</i>	78
Tabela 2.3. Matriz de distância entre cinco espécies de tetraniquídeos, usando a correção Kimura 2-Parâmetros baseada nas sequências de ITS2 do DNA ribossômico. Os resultados, entre parênteses, indicam os valores de distâncias obtidos após a inclusão das sequências de <i>T. cinnabarinus</i> e <i>T. urticae</i> agrupadas nos Clados 1, 2 e 3, respectivamente (Figura 2.1).....	85
Tabela 2.4. Matriz de distância entre quatro espécies de tetraniquídeos, usando a correção Kimura 2-Parâmetros baseada nas sequências <i>COI</i> do DNA mitocondrial. Foram incluídos como táxons separados as cinco sequências de <i>T. cinnabarinus</i> agrupadas no Clado 1 e aquelas do grupo externo. (<i>out group</i>). Os resultados entre parênteses indicam os valores das distâncias incluindo as sequências de <i>T. cinnabarinus</i> e <i>T. urticae</i> agrupadas nos Clados 2 e 3 respectivamente (Figura 2.3).....	91

CAPÍTULO 3

FILOGENIA, FILOGEOGRAFIA E ESTRUTURA GENÉTICA DAS POPULAÇÕES DE *TETRANYCHUS URTICAE* KOCH (ACARI: TETRANYCHIDAE) INFERIDAS DAS SEQUÊNCIAS DE DNA DA REGIÃO ITS E COI

RESUMO.....	98
ABSTRACT.....	99
3.1. INTRODUÇÃO.....	100
OBJETIVOS.....	104
3.2. MATERIAL E MÉTODOS.....	105
3.2.1. Obtenção de amostras de ácaros <i>Tetranychus urticae</i>.....	105
3.2.2. Análises moleculares do DNA - extração, amplificação e sequenciamento	110
3.2.2.1. Extração do DNA.....	110
3.2.2.2. Amplificação através da Reação em Cadeia da Polimerase - PCR (<i>Polymerase Chain Reaction</i>).....	112
3.2.2.3. Sequenciamento das regiões ITS e COI.....	113
3.2.3. Análises das sequências	115
3.2.3.1. Estatística descritiva.....	115
3.2.3.2. Distancia genética.....	116
3.2.3.3. Análises filogenéticas.....	116
3.2.3.4. Análise de variância molecular (AMOVA) e estrutura genética.....	116
3.2.3.5. Conjunto de dados formado pelas sequências ITS (rDNA) e COI (<i>mtDNA</i>).....	118
3.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	120
3.3.1. Região ITS do DNA ribossômico.....	121
3.3.2. Região COI do DNA mitocondrial	125
3.3.3. Estrutura genética em populações de <i>T. urticae</i> inferida através da Análise de Variância Molecular (AMOVA)	132
3.3.4. Distribuição e frequência dos haplótipos ITS2 do DNA ribossômico.....	140
3.3.5. Distribuição e frequência dos haplótipos COI do DNA mitocondrial.....	141
3.4. CONCLUSÕES	145

Lista de Figuras

Figura 3.1. Mapa do Brasil. Indicação dos pontos de coleta das populações de <i>Tetranychus urticae</i>	106
Figura 3.2. Mapa do mundo. A. Indicação dos pontos de coleta das populações de <i>Tetranychus urticae</i> . B. Detalhe com os pontos de coleta na França e Espanha.....	107
Figura 3.3. Fragmentos amplificados, direção e <i>primers</i> utilizados na amplificação e sequenciamento das regiões ITS e COI no estudo de <i>Tetranychus urticae</i>	114
Figura 3.4. Diferentes comprimentos do fragmento COI do DNA mitocondrial obtidos nos diversos estudos e sua relação relativa no alinhamento. O comprimento do fragmento analisado nesse estudo está destacado em vermelho. O comprimento total do gene COI (posições 1.474 – 3.009) está indicado acima. Para cada estudo as linhas horizontais mais grossas representam o fragmento sequenciado em todas as espécies e a linha fina indica o comprimento máximo da sequência. O número de sequências dos respectivos estudos e as referências estão listadas à direita.....	119
Figura 3.5. Distribuição da distância genética entre os pares baseada nas sequências das regiões ITS (18S-ITS1-5.8S-ITS2-28S), ITS1 e ITS2 do rDNA do ácaro rajado, <i>Tetranychus urticae</i> , utilizando-se o modelo de distância Kimura 2-Parâmetros.....	123

Figura 3.6. Relações filogenéticas inferidas a partir de sequências de nucleotídeos ITS2 do rDNA de <i>Tetranychus urticae</i> . Foi utilizado o algoritmo de Neighbor-Joining (NJ) (Saitou & Nei 1987), modelo de distância Kimura 2-Parâmetros. O valor de <i>bootstrap</i> em porcentagem (1.000 replicações) está próximo às ramificações. A escala indica a distância evolutiva inferida pelo número de substituições por base. Sequências idênticas são representadas apenas uma vez seguida do número de vezes, entre parênteses, que essa sequência se repetiu.....	124
Figura 3.7. Distribuição da distância genética entre os pares baseada nas sequências da região <i>COI</i> do <i>mtDNA</i> de 57 espécimes do ácaro rajado, <i>Tetranychus urticae</i> , coletados em várias regiões do mundo, utilizando-se o modelo de distância Kimura 2-Parâmetros.....	127
Figura 3.8. Relações filogenéticas inferidas a partir de sequências de nucleotídeos <i>COI</i> de <i>Tetranychus urticae</i> . Foi utilizado o algoritmo de Neighbor-Joining (NJ) (Saitou & Nei 1987), modelo de distância Kimura 2-Parâmetros. Os valores de <i>bootstrap</i> em porcentagem (1000 replicações) são mostrados próximo das ramificações. A escala indica a distância evolutiva inferida pelo número de substituições por base. As cores identificam os haplótipos 1, 2 e 10	129
Figura 3.9. Distribuição e freqüência de populações de <i>Tetranychus urticae</i> Koch, no mundo, inferidas a partir de sequências da região ITS2 do DNA ribossômico.....	143
Figura 3.10 Distribuição e freqüência de populações de <i>Tetranychus urticae</i> Koch, no mundo, inferidas a partir de sequências da região <i>COI</i> do DNA mitocondrial.....	144

Lista de Tabelas

Tabela 3.1. Procedência das amostras de <i>Tetranychus urticae</i> coletadas no Brasil, com o código da sequência, informações sobre a planta hospedeira, data de coleta e região do DNA ribossômico e/ou mitocondrial amplificada.....	108
Tabela 3.2. Procedência das amostras de <i>Tetranychus urticae</i> coletadas na Região Paleártica e no Canadá, com o código da sequência, informações sobre a planta hospedeira, data de coleta e região do DNA ribossômico e/ou mitocondrial amplificada.....	109
Tabela 3.3. Fragmentos amplificados e sequência dos <i>primers</i> utilizados na amplificação por PCR e no sequenciamento no estudo das populações de <i>Tetranychus urticae</i>	114
Tabela 3.4. Análises descritivas e índices de diversidade molecular. Informações intraespecíficas baseadas nas regiões ITS (18S-ITS1-5.8S-ITS2-28S), ITS1 e ITS2 do DNA ribossômico para as sequências de espécimes de <i>Tetranychus urticae</i>	122
Tabela 3.5. Análises descritivas e índices de diversidade molecular. Informações intraespecíficas para as sequências da região <i>COI</i> de espécimes de <i>Tetranychus urticae</i>	126
Tabela 3.6. Identificação dos haplótipos em populações do ácaro rajado, <i>Tetranychus urticae</i> , baseada na análise de 390pb do <i>mtDNA</i> , região <i>COI</i> , estimada no programa DnaSP v. 4.50.....	130
Tabela 3.7. Resultados da análise de variância molecular (AMOVA) de dois conjuntos formados por populações de <i>Tetranychus urticae</i> coletadas em varias espécies de plantas hospedeiras em duas regiões distintas, Mediterrânea e Asiática, baseados na região <i>COI</i> do <i>mtDNA</i>	133
Tabela 3.8. Resultados do Teste Exato de Diferenciação entre as amostras baseados na frequência dos haplótipos de sequências da região <i>COI</i> do <i>mtDNA</i> de espécimens de <i>Tetranychus urticae</i> agrupados por conjuntos de plantas hospedeiras na região Mediterrânea.....	135
Tabela 3.9. Resultados do Teste Exato de Diferenciação entre as amostras baseados na frequência dos haplótipos de sequências da região <i>COI</i> do <i>mtDNA</i> de espécimes de <i>Tetranychus urticae</i> agrupados por conjuntos de plantas hospedeiras na região Asiática.....	137

Tabela 3.10. Resultados da análise de variância molecular (AMOVA) dos conjuntos formados por populações de <i>Tetranychus urticae</i> coletadas em varias plantas hospedeiras no Japão, baseados na região <i>COI</i> do <i>mtDNA</i>	138
Tabela 3.11. Resultados do Teste Exato de Diferenciação entre as amostras baseados na frequência dos haplótipos de sequências da região <i>COI</i> do <i>mtDNA</i> de espécimes de <i>Tetranychus urticae</i> agrupados por conjuntos de plantas hospedeiras no Japão.....	138
Tabela 3.12. Resultados do Teste Exato de Diferenciação entre as amostras baseados na frequência dos haplótipos de sequências da região <i>COI</i> do <i>mtDNA</i> de espécimes de <i>Tetranychus urticae</i> coletados nas regiões Mediterrânea e Asiática, no Brasil e na Holanda.....	140
Lista de Anexos	
ANEXO 1. Autorização para captura, coleta e transporte de material zoológico no âmbito do projeto concedida pelo Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Renováveis (IBAMA).	146
ANEXO 2. Resultados dos levantamentos de ácaros Tetranychidae realizados no Brasil, no período de 10/2004 à 07/2008, com informações sobre a localidade, planta hospedeira, data, identificação das espécies e coletor.....	147
ANEXO 3. Manuscrito: “Two new spider mites (Acari: Tetranychidae) from Brazil - a <i>Monoceronychus</i> McGregor (Bryobiinae) from fingergrass and an <i>Oligonychus</i> Berlese (Tetranychinae) from grape - and a new record to South America”, aceito para publicação no periódico “ <i>International Journal of Acarology</i> ”.....	159
ANEXO 4. Sequências ITS (rDNA) das espécies do grupo <i>telarius</i> e de outras espécies de <i>Tetranychus</i> de pigmentação avermelhada previamente publicadas e usadas na composição do conjunto de dados. O número do acesso e o respectivo nome da espécie foram copiados do GenBank. Informações sobre a espécie de planta hospedeira e origem geográfica foram extraídas do artigo científico.....	185
ANEXO 5. Sequências <i>COI</i> (<i>mtDNA</i>) das espécies do grupo <i>telarius</i> e de outras espécies de <i>Tetranychus</i> de pigmentação avermelhada previamente publicadas e usadas na composição do conjunto de dados. O número do acesso e o respectivo nome da espécie foram copiados do GenBank. Informações sobre a espécie de planta hospedeira e origem geográfica foram extraídas do artigo científico.....	191
ANEXO 6. Variação nas sequências da região ITS2 do DNA ribossômico. A. <i>Tetranychus urticae</i> e <i>T. kanzawai</i> ; B. <i>T. urticae</i> e <i>T. truncatus</i> ; C. <i>T. urticae</i> e <i>T. turkestanii</i> ; D. <i>T. urticae</i> e <i>T. pueraricola</i> . Somente os sítios variáveis são apresentados. Os pontos indicam identidade com as sequências de <i>Tetranychus urticae</i> . As sequências depositadas no GenBank como <i>T. cinnabarinus</i> e os acessos AB257736, AB257737, AB257738 depositados como <i>T. urticae</i> estão destacadas em cinza. A linha preta separa <i>T. urticae</i> das outras espécies de <i>Tetranychus</i> do grupo <i>telarius</i>	199
ANEXO 7. Sequências da região ITS do DNA ribossômico de <i>Tetranychus urticae</i> previamente publicadas. Nº de acesso copiado do GenBank e informações sobre plantas hospedeiras e origem geográfica extraídas do artigo científico.....	200
ANEXO 8. Sequências da região <i>COI</i> do DNA mitocondrial de <i>Tetranychus urticae</i> previamente publicadas. Nº de acesso copiado do GenBank e informações sobre plantas hospedeiras e origem geográfica extraídas do artigo científico.....	201
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	202

RESUMO

Mendonça, R. S. de. **Estudos taxonômicos de ácaros Tetranychidae no Brasil e filogenia e estrutura genética do ácaro rajado, *Tetranychus urticae* Koch, inferidas a partir de sequências do DNA ribossômico e mitocondrial.** 2009, 235p. Tese (Doutorado), Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Brasília, DF.

A família Tetranychidae compreende um grande número de espécies estritamente fitófagas e inclui pragas importantes para a agricultura nacional e mundial. O ácaro rajado, *Tetranychus urticae* Koch (Prostigmata: Tetranychidae), é uma espécie de distribuição cosmopolita, polífaga e que se destaca pelos elevados prejuízos ocasionados às lavouras. No Brasil, *T. urticae* está entre os três principais ácaros pragas. Muitos aspectos sobre sistemática, biologia, hábitos alimentares e controle têm sido investigados para a espécie. Apesar dos incontestáveis avanços procedentes de estudos com ácaros tetraniquídeos no Brasil, é importante expandir as pesquisas para novas regiões do país em plantas hospedeiras ainda não avaliadas. A exploração de novas áreas de conhecimento como os estudos moleculares que permitem o acesso a informações de variabilidade genética, filogenia e estrutura de populações também pode contribuir para o conhecimento dessa importante família de ácaros no país. No presente estudo, realizou-se um levantamento de Tetranychidae em 15 Estados e no Distrito Federal e foram coletadas 550 amostras de 120 espécies vegetais. Infestações por ácaros tetraniquídeos foram confirmadas em 207 destas amostras e 20 espécies da subfamília Tetranychinae foram identificadas em 58 hospedeiros diferentes. Foram registrados novos hospedeiros para tetraniquídeos no Brasil, na América do Sul e no mundo, para 11 espécies: *Eutetranychus banksi* (McGregor); *Mononychellus tanajoa* (Bondar); *Oligonychus anonae* Paschoal; *O. mangiferus* (Rahman & Sapro); *Tetranychus bastosi* Tuttle, Baker & Sales; *T. evansi* Baker & Pritchard; *T. ludeni* Zacher; *T. mexicanus* (McGregor); *T. neocaledonicus* André; e *T. urticae* Koch. Novas ocorrências foram registradas em localidades no Brasil para *Eotetranychus tremae* De Leon; *O. anonae*; *Panonychus ulmi* (Koch); e *T. gloveri* Baker & Pritchard. *Eotetranychus smithi* Pritchard & Baker foi relatado pela primeira vez no Brasil. Quatro novas espécies foram descritas: duas do gênero *Oligonychus* Berlese, em

uva (*Vitis vinifera* L.) e rosa (*Rosa* sp.) em Minas Gerais; e duas dos gêneros *Monoceronychus* McGregor e *Schizotetranychus* Tragardh, ambas em capim coqueirinho (*Eustachys distichophylla* Lag. Nees) no Rio Grande do Sul. Visando a obtenção de informações sobre a variabilidade genética, filogenia e estrutura de populações de *T. urticae* no Brasil e no mundo foram realizadas análises filogenéticas e de variância molecular (AMOVA) baseadas em sequências do DNA ribossômico (ITS) e mitocondrial (*COI*) de 22 populações coletadas no Brasil e 33 na Região Paleártica (França, Espanha Peninsular, Ilhas Canárias, Grécia, Síria, Tunísia, Polônia e Noruega). Primeiramente, as sequências de *T. urticae* obtidas foram analisadas conjuntamente com aquelas de espécies próximas pertencentes ao grupo *telarius* disponíveis no GenBank, incluindo o seu possível sinônimo, *T. cinnabarinus* Boisduval. Nessa investigação foram detectadas incoerências que levaram ao questionamento da confiabilidade de dados moleculares disponibilizados no GenBank. Entre as sequências incluídas nas análises moleculares, cerca de 30% de erro aparente de identificação taxonômica foi detectado, especialmente para *T. urticae*, *T. cinnabarinus*, *T. kanzawai* Kishida e *T. truncatus* Ehara. As possíveis causas foram discutidas e sugestões apontadas para aumentar a confiabilidade das informações nos bancos públicos de dados moleculares e no delineamento de novos estudos. Em seguida, considerando um conjunto de dados constituído unicamente por sequências de *T. urticae*, foram conduzidas as análises moleculares que indicaram a ocorrência de estruturação genética nas populações de *T. urticae* em função da localidade geográfica de ocorrência das mesmas. Entretanto, o efeito da planta hospedeira não foi observado. A diversidade haplotípica, inferida pelas duas regiões do genoma (ITS e *COI*) analisadas foi maior entre os países banhados pelo mar Mediterrâneo. Não se observou variabilidade genética entre as populações de *T. urticae* coletadas nas cinco Regiões do Brasil quando se avaliou a região ITS. A presença de dois haplótipos mitocondriais (*COI*) foi constatada no Brasil, um compartilhado com a França, Espanha e Ilhas Canárias e outro com o Japão. Foi discutida a necessidade de novas pesquisas incluindo coletas e análises de material proveniente de regiões geográficas do mundo ainda não amostradas e de um maior número de populações em alguns países já investigados.

Palavras chaves: Acari, Bryobiinae, erros de identificação taxonômica, marcadores moleculares, região Neotropical, Tetranychinae, variabilidade genética.

ABSTRACT

Mendonça, R. S. de. **Taxonomic studies of Tetranychidae mites in Brazil and phylogeny and genetic structure of the two-spotted spider mite, *Tetranychus urticae* Koch, inferred from ribosomal and mitochondrial DNA sequences.** 2009, 235p. These (Doctorate), Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Brasília, DF.

The Tetranychidae family contains a large number of strictly phytophagous mites and includes important pests to the national and global agriculture. The two-spotted spider mite, *Tetranychus urticae* Koch (Prostigmata: Tetranychidae), is a cosmopolitan and polyphagous species, and is remarkable for the high losses caused to the crops. In Brazil *T. urticae* is one of the three main pest mites. Many aspects about systematic, biology, feeding habits, and control have been studied to this species. Although the unquestionable progress on the studies on tetranychid mites in Brazil, is important expand the research to new regions in the country in plant hosts not yet evaluated. Exploiting new areas of knowledge as molecular aspects allow to access information on genetic variability, phylogeny and genetic structure of populations may also contribute to the knowledge of this important family of phytophagous mites in the country. In this study it was conducted a survey of Tetranychidae mites on 15 States and the Federal District and 550 samples of 120 plant species were collected. Tetranychid mite infestations were confirmed on 58 plant species. New hosts to tetranychid in Brazil, South America or worldwide were reported to 11 mite species: *Eutetranychus banksi* (McGregor); *Mononychellus tanajoa* (Bondar); *Oligonychus anonae* Paschoal; *O. mangiferus* (Rahman & Sapra); *Tetranychus bastosi* Tuttle, Baker & Sales; *T. evansi* Baker & Pritchard; *T. ludeni* Zacher; *T. mexicanus* (McGregor); *T. neocaledonicus* André; and *T. urticae* Koch. New localities in Brazil were recorded to *Eotetranychus tremae* De Leon; *O. anonae*; *Panonychus ulmi* (Koch); and *T. gloveri* Baker & Pritchard. *Eotetranychus smithi* Pritchard & Baker was reported for the first time in Brazil. Four new species were identified as new for science: two belonging to *Oligonychus* Berlese genus, on grape (*Vitis vinifera* L.) and rose (*Rosa* sp.) from Minas Gerais; and two belonging to *Monoceronychus* McGregor and *Schizotetranychus* Tragardh genera, both from weeping fingergrass (*Eustachys distichophylla* Lag. Nees) from Rio Grande do Sul.

Aiming to obtain information on genetic variability, phylogeny and structure of populations of *T. urticae* in Brazil and worldwide phylogenetic and molecular variance analysis (AMOVA) were conducted from DNA ribosomal (ITS) and mitochondrial sequences (*COI*). Samples of *T. urticae* from Brazil (22) and the Palearctic region (33) (France, Peninsular Spain, Canary Islands, Greece, Syria, Tunisia, Poland and Norwegian) were studied. Firstly *T. urticae* sequences obtained during this study were jointly analyzed with sequences of close species belonging to *telarius* group available in GenBank, including those of *T. cinnabarinus* Boisduval, a supposed synonym. Inconsistencies were detected during this investigation whose lead to make questions on the reliability of molecular data available in GenBank. About 30% of probable mistakes on the taxonomic identification were detected on sequences included in the analysis, especially to *T. urticae*, *T. cinnabarinus*, *T. kanzawai* Kishida and *T. truncatus* Ehara. Probable causes to these mistakes were discussed and suggestions to increase the reliability of information from public molecular databases were pointed. Then, considering a dataset established with only *T. urticae* sequences, the molecular analysis were performed and the results indicated the occurrence of genetic structure of the *T. urticae* analyzed populations according to its geographic collection locality. However, the effect of the host plant was not observed. The haplotypic diversity inferred since genomic regions (ITS and *COI*) was higher among the Mediterranean countries. Genetic variability was not observed among populations from different regions in Brazil from where the ITS region was assessed. Two *COI* haplotypes were found in the Brazilian populations, one of them also present in France, Spain and the Canary Islands and the other in Japan. Further studies are needed to fully validate the obtained results with biological material from unexplored geographical regions and increasing the number of populations collected for studied countries.

Palavras chaves: Acari, Bryobiinae, genetic variability, molecular markers, Neotropical region, taxonomic misidentification, Tetranychinae.

ESTUDOS TAXONÔMICOS DE ÁCAROS TETRANYCHIDAE NO BRASIL E FILOGENIA E ESTRUTURA GENÉTICA DO ÁCARO RAJADO, *TETRANYCHUS URTICAE* KOCH, INFERIDAS A PARTIR DE SEQUÊNCIAS DO DNA RIBOSSÔMICO E MITOCONDRIAL

1. INTRODUÇÃO

O ácaro rajado, *Tetranychus urticae* Koch, 1836, é uma espécie de grande importância agrícola, assim como outras da família Tetranychidae (Helle & Sabelis 1985). Este ácaro é, provavelmente, originário da Eurásia, em função da alta frequência de sua ocorrência e da grande variedade de plantas hospedeiras nas quais essa espécie se desenvolve nessa região. Acredita-se que *T. urticae* tenha se disseminado pela ação dos ventos, nas regiões temperadas do Hemisfério Norte, e pelo homem, via transporte de plantas, para todo o mundo (Navajas 1998). Trata-se de uma espécie de distribuição cosmopolita e altamente polífaga, infestando plantas cultivadas ou não (Bolland *et al.* 1998; Migeon & Dorkeld 2006). Por essa razão e pelos sérios danos causados a diversas culturas agrícolas em todo o mundo, é considerado um dos ácaros fitófagos mais importantes (Helle & Sabelis 1985). No Brasil, devido ao elevado número de espécies vegetais de valor econômico atacadas e os danos a elas causadas, *T. urticae* está entre os três principais ácaros pragas do país (Moraes & Flechtmann 2008).

Os sintomas de ataque do ácaro-rajado nos hospedeiros são observados na face inferior das folhas desenvolvidas, as quais apresentam manchas branco-prateadas e uma quantidade considerável de teia. Na face superior, aparecem áreas inicialmente cloróticas que passam a bronzeadas. As folhas secam e caem, com conseqüente queda na produção (Flechtmann 1985; Gallo *et al.* 2002).

Muitos aspectos sobre a biologia e hábitos alimentares de *T. urticae* têm sido foco de pesquisas. A espécie desperta interesse especial no tocante à seleção de hospedeiros e aos processos evolutivos, pois foram documentadas diferenças entre linhagens, consideradas raças associadas a distintos hospedeiros (Gotoh *et al.* 1993). Também foi mencionada a existência de

diferenças genéticas entre populações em função da distância entre as regiões analisadas, independentemente da planta hospedeira (Tsagkarakou *et al.* 1997). Além da diferenciação genética por seleção da planta hospedeira e da região geográfica, tem sido relatada a ocorrência de biótipos resistentes a pesticidas nos países onde *T. urticae* sofreu intensa pressão de seleção (Miller *et al.* 1985; Edge & James 1986; Dennehy *et al.* 1987; Grafton-Cardwell *et al.* 1987; Flexner *et al.* 1988; Tian *et al.* 1992; Landeros *et al.* 2006; Lee *et al.* 2006). No Brasil, os problemas de resistência de *T. urticae* aos inseticidas/acaricidas foram relatados por Sato *et al.* (2000, 2002, 2004, 2007) e Flores (2001).

Apesar da importância econômica do ácaro rajado, não há informações sobre a sua variabilidade genética nas diferentes culturas e regiões geográficas no Brasil. Essas informações são importantes, pois podem auxiliar na adoção de medidas fitossanitárias apropriadas ao seu manejo. Considera-se também a necessidade de se conhecer as populações de *T. urticae* que ocorrem no Brasil para justificar a adoção de medidas quarentenárias visando evitar a introdução de novos biótipos de *T. urticae*, adaptados e agressivos a diferentes hospedeiros, ou resistentes a diferentes pesticidas, os quais têm sido relatados em outros países. Além disso, o reconhecimento prévio desses biótipos possibilitará a recomendação de técnicas específicas de controle e contenção da espécie, aumentando a eficiência do Manejo Integrado de Pragas.

É importante destacar que infestações do ácaro rajado e de outros tetraniquídeos vêm ocasionando problemas de ordem econômica em culturas nas quais os prejuízos, antes, não eram observados ou eram pontuais, como a soja cultivada no Rio Grande do Sul. Essas infestações ocorrem, provavelmente, em função de avanços nas áreas de plantio, adaptações de novas variedades e/ou de mudanças no sistema de manejo da cultura (Guedes *et al.* 2007).

No Brasil, já foi relatada a ocorrência de cerca de 100 espécies de Tetranychidae, entre as cerca de 1.250 que a compõem (Bolland *et al.* 1998; Migeon & Dorkeld 2008). Contudo a maior parte do conhecimento sobre tetraniquídeos no Brasil se restringe à Região Sudeste e/ou a culturas de valor econômico. Assim, é importante ampliar o conhecimento sobre os ácaros tetraniquídeos nas demais Regiões do país, em culturas ainda não avaliadas ou em novas regiões de cultivo, e a espécies vegetais não cultivadas.

Esse projeto de pesquisa teve como objetivos: contribuir para o conhecimento dos ácaros da família Tetranychidae no Brasil, através da coleta de espécimes em plantas frutíferas, florestais, olerícolas, hortícolas, ornamentais, leguminosas, oleaginosas e invasoras nas diferentes regiões; obter informações sobre a variabilidade genética de populações de *T. urticae* da Europa, Norte da África, Ásia e Brasil e; investigar o efeito geográfico e planta hospedeira na estrutura genética nas populações de *T. urticae*. Para os estudos de variabilidade, caracterização genética e estruturação das populações de *T. urticae* foram utilizados dois marcadores moleculares independentes: (1) um fragmento do DNA mitocondrial, a região codante para a *Citocromo Oxidase I* (*COI*); (2) a região do genoma nuclear “*Internal Transcribed Space*” (ITS) do DNA ribossômico (Navajas 1998; Navajas *et al.* 1998; 2003). Os marcadores genéticos selecionados nesse trabalho são os mais utilizados nas pesquisas com sistemática, filogenia e evolução e são muito informativos para os estudos de população com ácaros. Durante os estudos de filogenia do ácaro rajado, em que foram analisadas sequências de *T. urticae* e de espécies próximas do grupo *telarius* (incluindo seu possível sinônimo *T. cinnabarinus*), obtidas durante o estudo e disponíveis na bases de dados GenBank, foram detectadas incoerências que levaram ao questionamento da confiabilidade de dados disponibilizados no GenBank. Estas análises são apresentadas, discutidas e são sugeridos procedimentos que venham a conferir maior confiabilidade a bases de dados de nucleotídeos de uso público.

As informações resultantes do presente projeto de tese foram organizadas em três capítulos de forma a atender os objetivos propostos pela pesquisa: 1. Ácaros tetraniquídeos (Prostigmata: Tetranychidae) no Brasil – novos hospedeiros, localidades e táxons; 2. Confiabilidade taxonômica das sequências de DNA disponíveis no GenBank: uma revisão crítica com ácaros do gênero *Tetranychus* no grupo *telarius* e; 3. Filogenia, filogeografia e estrutura genética das populações de *Tetranychus urticae* Koch (Acari: Tetranychidae) inferida das sequências de DNA da região ITS e *COI*. Previamente à apresentação dos capítulos, foi elaborada uma Revisão Bibliográfica Geral organizada em dois grandes tópicos, o primeiro que tratou da importância de *T. urticae* como ácaro-praga ressaltando os aspectos fitossanitários e, o segundo, que explorou a

literatura que subsidiou a escolha dos marcadores moleculares utilizados nos estudos de variabilidade genética bem como auxiliou no delineamento das análises filogenéticas e investigações dos fatores que atuam na estrutura das populações de *T. urticae*.

OBJETIVOS GERAIS

Contribuir para o conhecimento de aspectos taxonômicos dos ácaros tetraniquídeos no Brasil e da variabilidade genética em populações do ácaro rajado, *T. urticae*, da Europa, Norte da África, Ásia e Brasil.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

1) Realizar levantamento de ácaros tetraniquídeos no Brasil em diferentes plantas hospedeiras e Regiões do país;

2) investigar os fatores que afetam a variabilidade genética de populações de *T. urticae*, em um contexto global, através da análise filogenética de sequências das regiões do genoma nuclear e mitocondrial, incluindo novas sequências de populações coletadas no Brasil e na região Paleártica;

3) investigar a influencia dos efeitos geográfico e planta hospedeira na estrutura genética das populações de *T. urticae*

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. O ácaro rajado, *Tetranychus urticae* Koch – aspectos gerais

Tetranychus urticae Koch, 1836 (Prostigmata: Tetranychidae) vulgarmente conhecido no Brasil como ácaro-rajado, possui dois nomes comuns na língua inglesa, “two-spotted spider mite” ou “red mite”, referentes à variação de cores apresentada pelas fêmeas sob diferentes condições ambientais (Moraes & Flechtmann 2008). A espécie tece quantidade abundante de teia e apresenta grande plasticidade para mudar e se adaptar a diferentes plantas hospedeiras, o que, provavelmente, tem colaborado para o sucesso de suas colonizações.

Entre os ácaros tetraniquídeos, é a espécie que apresenta o maior número de hospedeiros, infestando cerca de 1.054 espécies vegetais no mundo e causando consideráveis prejuízos às culturas agrícolas e às plantas ornamentais (Jeppson *et al.* 1975; Van de Vrie 1985; Bolland *et al.* 1998; Migeon & Darkeld 2006). No Brasil, os danos devido às suas infestações têm sido observados em diversas culturas, incluindo alface, algodão, amendoim, batata, berinjela, ervilha, fava, feijão, fumo, maçã, mamão, mamona, mandioca, mandioquinha salsa, melancia, melão, milho, morango, nectarina, pêssigo, pepino, pimentão, soja, tomate, uva e várias plantas ornamentais (Flechtmann 1985; Souza Filho *et al.* 1994; Gallo *et al.* 2002; Moraes & Flechtmann 2008). Dentre as 19 culturas agrícolas consideradas como as de maior importância na agricultura mundial, seis (citros, algodão, uva, maçã, feijão e mamão) foram relatadas como hospedeiras do ácaro rajado (Yaninek & Moraes 1991).

A reprodução de *T. urticae* ocorre por partenogênese facultativa. Na ausência de reprodução sexuada os óvulos sofrem desenvolvimento completo produzindo somente machos haplóides. Seguida as primeiras cópulas, fêmeas produzem uma descendência em que predominam fêmeas diplóides caracterizando a haplo-diploidia - machos produzidos por partenogênese arrenótoca e fêmeas através da reprodução sexuada. Portanto, uma única fêmea pode dar origem a uma colônia (Helle & Pijnacker 1985).

Bolland *et al.* 1998 listaram 50 sinonímias para o ácaro rajado, *T. urticae*. Entre os sinônimos de *T. urticae*, ainda hoje, não há um consenso em relação à

Tetranychus cinnabarinus (Boisduval, 1867), pois alguns autores o consideram como táxon válido (Boudreaux. 1956; Boudreaux & Dosse 1963, 1963a; Baker & Tuttle 1994). A existência de variabilidade intra-específica reforça a necessidade de se obter informações mais precisas sobre a variabilidade da espécie no Brasil e no mundo.

2.1.1. Importância econômica e controle

Tetranychus urticae é uma das espécies de ácaros fitófagos de maior expressão econômica e está entre as pragas mais nocivas para as culturas agrícolas, tanto pelo grande número de hospedeiros que infesta quanto pela intensidade dos danos causados (Jeppson *et al.* 1975; Rabbinge 1985).

Para algumas culturas as perdas ocasionadas pelas infestações do ácaro rajado têm sido quantificadas. Entretanto, para a maioria das culturas atacadas, os danos são relatados, mas não quantificados. Entre as culturas nas quais têm sido relatados danos estão as frutíferas, ornamentais, hortícolas, oleaginosas e outras culturas extensivas. Danos têm sido observados em cultivo protegido e também no campo.

Na cultura do algodão, infestações por *T. urticae* podem causar perdas tanto na produtividade, como na qualidade das fibras e sementes. No Brasil, houve redução de até 25% na produção, 12% no número de sementes, 4% no teor de matéria graxa, 17% no peso das fibras (Cannerday & Arant 1964), 4% na resistência das mesmas (Oliveira 1972) e 25% de perda de peso de algodão (Oliveira & Calcanhoto 1975). As plantas atacadas tornam-se menores em relação às não atacadas e os danos são observados em reboleiras (Gallo *et al.* 2002).

Os níveis de dano de *T. urticae* tolerados em plantas ornamentais, em casa-de-vegetação, são extremamente baixos, em função do valor estético das folhagens. Em rosa, cultivar Sonia, o confinamento de cinco fêmeas adultas jovens em folhas recém-expandidas resultou em danos visíveis após um dia (Van de Vrie 1985). Uma estimativa das perdas causadas pelas infestações de *T. urticae* em nove variedades de cravo mostrou correlação direta com a extensão

dos danos qualitativos nas flores. Os prejuízos monetários foram da ordem de 20 a 30% dependendo da variedade estudada (Rajashekharappa & Mallik 2007)

Em citros, a alimentação de *T. urticae* sobre folhas jovens causa depressões e áreas cloróticas que também são visíveis na superfície superior. Os ácaros podem se alimentar em frutos ainda verdes causando bronzeamento à medida que esses amadurecem (McMurtry 1985). Infestações do ácaro rajado em citros foram relatadas também na Espanha, Grécia, Cuba, Marrocos e na Flórida, Estados Unidos da América (Ramos *et al.* 1988; Cáceres & Childers 1991; Tsagkarakou *et al.* 1997; Allam *et al.* 1999; Miranda *et al.* 2003). Na região do Mediterrâneo, essa espécie está entre as pragas que exigem atenção especial dos produtores em relação ao controle e ao manejo adequado das pragas do pomar, pois causa danos que resultam no decréscimo do valor comercial dos frutos (Jacas & Garcia 2001; Aucejo *et al.* 2003; Urbaneja *et al.* 2008).

Na Europa, *T. urticae* é considerado uma das principais pragas de videiras (Kassemeyer 1996). As infestações causam alto grau de desfolhamento, com graves consequências na maturação e qualidade dos frutos. Os cachos de uva também são atacados, o que causa o aparecimento de manchas escuras na casca dos frutos (Schruft 1985). Entre os países europeus nos quais danos em videiras por *T. urticae* foram registrados estão Espanha (Arias Giralda & Nieto Calderón 1982), Suíça (Baillod *et al.* 1982) e Tchecoslováquia (Hluchy & Pospisil 1991).

Na Califórnia (USA), pomares inteiros de amêndoas tornam-se desfolhados e danos severos podem ocorrer rapidamente entre os meses de julho e agosto, em decorrência das infestações de *T. urticae* (Hoy 1985).

Em espécies hortícolas, em casas de vegetação, no Reino Unido e Holanda, o ácaro *T. cinnabarinus* (= *T. urticae*) (Bolland *et al.* 1998), causa danos relacionados à injeção de toxinas nas plantas. Neste caso, poucos ácaros foram suficientes para causar sérios danos descritos como manchas cloróticas, com pequenas lesões transparentes nos folíolos, assemelhando-se aos sintomas de deficiência de magnésio nas plantas. Estas regiões tornam-se necróticas, as manchas coalescem e o dano evolui para murchamento e morte das folhas (Foster & Barker 1978).

Em quiabo, na Índia, foram observadas perdas quantitativas entre 12 a 36% na produção de frutos (Prasad & Singh 2007). No Irã, o ácaro rajado está entre as pragas mais importantes da berinjela e um estudo conduzido com nove cultivares revelou perdas de 13 a 70% no peso dos frutos variando em função da abundância de ácaros nas folhas e da cultivar avaliada (Anaraki *et al.* 2007). Em tomate, causa diminuição no número e no tamanho dos frutos, induz maturação precoce e diminui o teor de sólidos solúveis (Minami 1980), além de atacar as folhas situadas na parte mediana da planta, causando o amarelecimento e ressecamento das mesmas (Barbosa & França 1980; Flechtmann 1985; Gonçalves *et al.* 1998; Aragão *et al.* 2002).

Nos Estados Unidos da América, populações de *T. urticae* aumentam rapidamente em morangueiros, durante a estação de crescimento da cultura, reduzindo a quantidade e a qualidade dos frutos (Sances *et al.* 1982). Na África, as perdas na produção podem alcançar 50% devido às infestações por esta espécie (Coates 1974¹ citado por Wysoki 1985). No Brasil, no estado de São Paulo, o ácaro rajado é considerado a principal praga do morangueiro, devido à dificuldade de controle, severidade dos danos e frequentes ocorrências, favorecidas pela temperatura elevada e baixa umidade relativa do ar (Tanaka *et al.* 2000). Nas regiões produtoras do Rio Grande do Sul, o ataque do ácaro rajado em morangueiros ocorre, principalmente, no período de frutificação e colheita dos frutos o que inviabiliza a maior parte da safra em função dos danos e da suspeita de contaminação por agrotóxicos (Moraes & Braun 2002).

Em amendoim no Brasil, as grandes populações de ácaro rajado unem as folhas das plantas por meio de suas teias, assim, as folhas tornam-se cloróticas e, em um estágio mais avançado, chegam a cair (Gallo *et al.* 2002).

Em lúpulo, infestações severas do ácaro rajado causam o mosqueamento das folhas, com grande produção de teia. Os ácaros alimentam-se sobre os estróbilos, que se tornam secos, vermelhos e quebradiços, tendendo a

¹ COATES, T.J.D. (1994). The influence of some natural enemies and pesticides on various populations of *Tetranychus cinnabarinus* (Boisduval), *T. lombardinii* Baker & Pritchard and *T. ludeni* Zacher (Acari: Tetranychidae) with aspects of their biologies. *Entomology Memoir*, 42.. Department of Agricultural Technical Services, Republic of South Africa.

despedaçar. A qualidade e a produção pode ser grandemente reduzida e podem ocorrer perdas totais (Cranham 1985).

O controle do ácaro rajado tem sido realizado, principalmente, através do método químico, cujo impacto pode ser expressivo (Watanabe *et al.* 1994), pois, nem sempre reduz as suas populações em níveis economicamente aceitáveis, podendo ser ainda responsável por problemas relacionados à contaminação ambiental e ocupacional, presença de resíduos nos frutos e outras partes vegetais, desenvolvimento de resistência nas populações e eliminação de inimigos naturais. O controle químico de *T. urticae* tem sido amplamente estudado, incluindo avaliações de eficácia agrônômica de acaricidas, causas dos desequilíbrios biológicos em áreas tratadas e alternativas para o manejo integrado do ácaro rajado nas lavouras (por ex. Heungens & Tirry 2001; Botton *et al.* 2002; Kimura *et al.* 2005; Barros *et al.* 2007).

O controle biológico convencional tem sido extensivamente investigado para o ácaro-rajado em casas-de-vegetação. O ácaro predador mais utilizado para essa finalidade, em diversos países, é *Phytoseiulus persimilis* Athias-Henriot, 1957 (Khalequzzaman *et al.* 2007; Ferguson 2008; Moraes & Flechtmann 2008). No Brasil, as pesquisas com controle biológico de *T. urticae*, incluem principalmente frutíferas (maçã e morango), plantas ornamentais e cultivos protegidos. As principais espécies de ácaros predadores estudadas são *N. californicus* (McGregor, 1954) e *P. macropilis* (Banks, 1905) (Monteiro *et al.* 2002; Marchetti *et al.* 2003; Ferla 2004; Marchetti & Ferla 2004; Ferla *et al.* 2007; Oliveira *et al.* 2007).

Uma alternativa promissora para o controle de *T. urticae* trata-se do controle biológico em associação com o químico. Biótipos de ácaros predadores resistentes a alguns pesticidas têm sido utilizados para o controle de *T. urticae* nos Estados Unidos, Ucrânia, África do Sul e Austrália, como, por exemplo: *Galendromus* (= *Typhlodromus*) *occidentalis* (Nesbitt 1951) ou *Neoseiulus californicus* (McGregor, 1954) (Acari: Phytoseiidae) (Pringle 2001; Waite 2001). No Brasil, estudos semelhantes foram conduzidos com os predadores *N. californicus* e *Phytoseiulus macropilis* (Banks) (Sato *et al.* 2006, 2007; Poletti *et al.* 2008).

2.1.2. Ocorrência de biótipos/raças hospedeiras

Populações de uma determinada espécie que apresentam características biológicas particulares são denominadas biótipos. O termo “raça hospedeira” representa uma forma diferenciada, que pode ou não inter cruzar com outras, mas que se alimenta de uma planta hospedeira específica. Esse termo, é mais utilizado nas pesquisas entomológicas e o termo biótipo deve prevalecer sobre raça hospedeira (Futuyma 1995).

Em tomate, por exemplo, Gotoh *et al.* (1993) sugeriram a ocorrência, em simpatria, de duas “raças hospedeiras” de *T. urticae*, a forma verde, associada a abóbora, e a vermelha, ao tomate. Os autores concluíram que as linhagens são biologicamente distintas e que a mudança de hospedeiro ocorreu da abóbora para o tomate. O tomate representa um alimento, inicialmente, hostil em função da presença de tricomas que podem aprisionar os ácaros e dos compostos tóxicos que levam a mortalidade de formas jovens e a baixa fecundidade. Gargalos recorrentes podem ter incrementado o efeito da deriva genética na população inicial, originando o biótipo do ácaro do tomate. Destaca-se que ambas as formas, a verde e a vermelha, tem distribuição mundial, mas a forma verde geralmente é encontrada em regiões de clima temperado, enquanto a forma vermelha ocorre em regiões de clima mais quente e úmido (Goka *et al.* 1996). Os critérios morfológicos, ecológicos (adaptabilidade a hospedeiros) e fisiológicos (diapausa) são frágeis pois, em geral, se sobrepõem para as duas formas, impossibilitando a separação em duas espécies distintas (Boudreaux 1956; Bund & Helle 1960). No entanto, as caracterizações genéticas mostram genes específicos para cada forma (Goka *et al.* 1996). Esses autores denominaram a forma vermelha *Tetranychus cinnabarinus* e a verde *T. urticae*. Estudos mais recentes confirmam a compatibilidade reprodutiva entre as duas populações e o nome *T. cinnabarinus* como sinonímia de *T. urticae* (Bolland *et al.* 1998; Silva *et al.* 2002).

De acordo com Bush (1975) a mudança de hospedeiro pode, algumas vezes, causar o isolamento reprodutivo e originar biótipos e, conseqüentemente, limitar os efeitos de uma primeira colonização convencional. Templeton (1979) detectou a possibilidade de ocorrer uma colonização secundária, ou seja, de

novos hospedeiros por uma dada espécie. A variabilidade genética observada em populações de organismos fitófagos pode também estar associada a distribuição geográfica ou a seleção de plantas hospedeiras.

Esses aspectos são importantes na investigação das diferenças entre as populações de *T. urticae*.

Por exemplo, *T. urticae* infesta e causa danos aos pomares de citros na região mediterrânea, particularmente na Espanha (Aucejo *et al.* 2003; Ansaloni *et al.* 2006; Abad *et al.* 2006, Urbaneja *et al.* 2008), que se destaca na comercialização de frutos *in natura* com alto valor agregado principalmente laranjas, tangerinas e limões (Neves & Marino 2002). Entretanto, a presença de *T. urticae* não tem sido relatado causando danos em pomares cítricos brasileiros. Há de se ressaltar que se desconhece a razão pela qual essa espécie que infesta varios hospedeiros no Brasil não seja encontrada infestando citros no país. É possível que isso se deva a uma diferença biológica entre as populações que aqui ocorrem e aquelas encontradas na região do Mediterrâneo. Nesse caso, é importante considerar o risco envolvido na importação de partes vegetais, procedentes dessa região, infestadas por *T. urticae*.

Outro fator importante na investigação de diferenças genéticas em populações de *T. urticae* é a evolução da resistência a inseticidas e acaricidas decorrente do uso excessivo desses produtos no controle do ácaro nas lavouras.

A ocorrência de biótipos de *T. urticae* resistentes a pesticidas tem sido relatada nos países onde a espécie sofreu intensa pressão de seleção em função de aplicações sucessivas de inseticidas acaricidas. Há fortes evidências de resistência múltipla de *T. urticae* aos acaricidas Fenson (fosforado), Clordimefon (fosforado), Dicofol (clorado), Tetradifom (clorodifenilsulfona), Binapacril (dinitrofenol) e Cihexatina (organoestânico), além de produtos do grupo químico dos carbamatos e dos quinometionatos (heterocíclico-nitrogenado). O desenvolvimento de resistência a um produto por populações de *T. urticae*, pode causar resistência cruzada a outros, do mesmo grupo químico ou de grupos próximos, dificultando o controle e frustrando qualquer tentativa de sucesso na adoção de práticas de Manejo Integrado de Pragas (Cranham & Helle 1985).

A resistência de *T. urticae* a pesticidas tem sido documentada em diferentes culturas em vários países (Miller *et al.* 1985; Edge & James 1986;

Dennehy *et al.* 1987; Grafton-Cardwell *et al.* 1987; Flexner *et al.* 1988; Tian *et al.* 1992; Landeros *et al.* 2006; Lee *et al.* 2006). Croft & Hoyt (1983)² citados por Prokopy & Croft (1994) destacaram que *T. urticae* é a praga de controle mais difícil e oneroso em folhagens de maçã, na América do Norte, o que se deve, em grande parte, ao seu potencial de desenvolver resistência a inseticidas. Nos pomares brasileiros de maçã, *T. urticae* não está entre as pragas chaves, embora esteja relatado para a cultura. A introdução de populações de *T. urticae* adaptadas a macieiras, mais agressivas ou resistentes a inseticidas poderia comprometer os programas de manejo integrado de pragas da macieira desenvolvidos para essa cultura no Sul do país e resultaria em impactos negativos na cadeia produtiva da maçã brasileira.

No Brasil, os problemas de populações de *T. urticae* resistentes a pesticidas foram observados em algodoeiros, roseiras, morangueiros e pessegueiros (Chiavegato *et al.* 1983; Suplicy Filho *et al.* 1994; Sato *et al.* 1994, 2000, 2002, 2004, 2007; Flores 2001).

O risco da introdução e estabelecimento de novos biótipos de *T. urticae* no país, através da importação de produtos vegetais, deve ser considerado, assim como, o agravamento dos problemas econômicos com a praga (Ferreira 1997). O estudo da variabilidade genética das populações brasileiras de *T. urticae*, pode auxiliar na distinção entre as populações presentes no país e biótipos introduzidos.

2.1.3. Caracterização de biótipos como subsídio à adoção de medidas fitossanitárias

De acordo com a Convenção Internacional de Proteção de Plantas (CIPV) praga é “qualquer espécie, raça ou biótipo de vegetais, animais ou agentes patogênicos, nocivos aos vegetais ou produtos vegetais” e as pragas quarentenárias são aquelas que “apresentam expressão econômica potencial

² CROFT, B.A.; HOYT, S. C. (1983) *Integrated management of insect pest of pome and stone fruits*. New York: Wiley Interscience. (454p.).

para a área posta em perigo e onde ainda não estão presentes ou, se estão, não se encontram amplamente distribuídas e são oficialmente controladas” (FAO 1997). Biótipos de uma espécie resistentes a pesticidas, mais nocivos ou que apresentam hospedeiros e/ou características biológicas distintas também podem ser considerados pragas quarentenárias, mesmo que a espécie seja assinalada e apresente ampla distribuição no país (Baker *et al.* 1993; FAO 2004).

Os ácaros estão entre os organismos que apresentam expressão como pragas quarentenárias (Navia *et al.* 2007). Há diversas características que fazem desse grupo uma ameaça aos sistemas de produção agro-silvo-pastoris, propiciando que se tornem espécies invasoras, como: nocividade aos hospedeiros (Jeppson *et al.* 1975; Flechtmann 1985; Yaninek & Moraes 1991); capacidade de sobreviver em condições adversas (Jeppson *et al.* 1975); reprodução por partenogênese (Jeppson *et al.* 1975; Lindquist *et al.* 1996); adaptação a novas plantas hospedeiras (Skorupska & Boczek 1985; Gotoh *et al.* 1993; Goka *et al.* 1996; Goka & Takafuji 1997); vetores de doenças de plantas (Oldfield & Proeseler 1996; Chagas *et al.* 2001; Childers *et al.* 2001); difícil detecção (Ferreira, 1997) e resistência a pesticidas (Michigan State University 2002).

O possibilidade de novas introduções de *T. urticae* no Brasil, em virtude do trânsito internacional de material vegetal e do volume e frequência de importações de produtos potencialmente infestados pelo ácaro, pode resultar na introdução de biótipos nocivos às plantas cultivadas no país.

Observa-se, cada vez mais, a necessidade dos países justificarem seus regulamentos fitossanitários, junto às Organizações Regionais e Nacionais de Proteção de Plantas. Assim sendo, o Brasil apenas poderá impor restrições fitossanitárias visando evitar a introdução de novos biótipos de *T. urticae* se forem caracterizados os biótipos que ocorrem no país e nos países exportadores. Portanto, o conhecimento aprofundado das populações de *T. urticae* que ocorrem no país é de fundamental importância para o fortalecimento do sistema nacional de defesa fitossanitária. Da mesma forma, o desenvolvimento de métodos diagnósticos para a identificação de categorias subespecíficas será essencial para viabilizar a adoção justificável de medidas fitossanitárias. Entre esses métodos destaca-se a utilização de marcadores moleculares que também são

úteis em estudos de processos de bioinvasões, fornecendo informações sobre a espécie invasora, sua origem e as fontes de infestação (Villablanca *et al.* 1998; Davies *et al.* 1999; Bonizzoni *et al.* 2001; Navia *et al.* 2005).

2.2. Utilização de marcadores moleculares em Acarologia

A escolha de marcadores genéticos com variabilidade adequada para a resolução das questões as quais se deseja investigar deve ser a etapa prévia a todos os estudos de variabilidade genética de espécies. Os marcadores genéticos devem apresentar elevado polimorfismo permitindo a detecção de movimentos mínimos entre as populações. É necessário conhecer as propriedades gerais, os campos de aplicação e as limitações de cada marcador para se efetuar uma escolha compatível com os objetivos da pesquisa.

Estudos com marcadores moleculares auxiliam no entendimento da sistemática, da filogenética e das estruturas populacionais em Acarologia. As técnicas moleculares representam ferramentas úteis para acarólogos e sistematas, facilitam não apenas a separação de espécies aparentadas, mas também na distinção de categorias subespecíficas e na caracterização de biótipos, beneficiando pesquisadores envolvidos em defesa fitossanitária, controle biológico, parasitologia, biologia de populações, ecologia molecular, controle e diversas outras áreas (Mozes-Koch & Gerson 1998).

Os primeiros trabalhos utilizando marcadores moleculares em ácaros datam dos anos 1990. Kaliszewski *et al.* (1992) utilizaram a técnica de *PCR* (*Polymerase Chain Reaction*) para amplificar o DNA e, posteriormente, sequenciaram o DNA de 17 espécies de ácaros de diversos grupos taxonômicos. Para comparação dos genomas dessas espécies utilizaram um fragmento de 377pb da região 18S do rDNA nuclear e outro de 500pb da região 16S do mtDNA mitocondrial. Os resultados indicaram que a técnica de *PCR* poderia ser utilizada para auxiliar na obtenção de sequências de ácaros de diferentes ordens e contribuir para o avanço dos estudos filogenéticos em acarologia.

Revisões sobre a utilização de marcadores moleculares em estudos de sistemática e filogenética de ácaros, nas quais foram compiladas informações

sobre os métodos utilizados, os principais resultados e as perspectivas foram publicados por Navajas & Fenton (2000); Navajas (2001), Cruickshank (2002) e Navajas & Roderick (2008).

Os ácaros apresentam grande diversidade e as espécies de importância agrícola que tem sido foco de estudos com técnicas moleculares pertencem, principalmente, às famílias Tetranychidae e Eriophyidae, (ácaros fitófagos) e Phytoseiidae (ácaros predadores) (Navajas *et al.* 1992, 1998, 1999, 2000; Tsagkarakou *et al.* 1999; Navajas & Fenton 2000; Noronha *et al.* 2003; Tixier *et al.* 2006).

Os marcadores mais comumente utilizados em sistemática molecular de ácaros são o *mtDNA* e o *rDNA*, os quais diferem consideravelmente em sua organização genômica (sendo um de origem mitocondrial e outro nuclear), no modo de evolução (apresentam taxas diferenciais de evolução) e de transmissão (transmissão maternal e transmissão bi-parental, respectivamente). Alguns estudos utilizando marcadores RAPD foram utilizados com ácaros fitoseídeos (Perrot-Minot & Navajas 1995) e *Tetranychus* sp. (Dong *et al.* 1997; Hence *et al.* 1998). É importante considerar como as propriedades contrastantes destes marcadores podem afetar suas habilidades na construção de filogenias (Navajas & Boursot 2003) e que, estudos filogenéticos baseados em resultados de um único marcador molecular são frágeis e podem conduzir a conclusões infundadas (Brower *et al.* 1996; Ross *et al.* 1999; Navajas & Boursot 2003).

Considerando a importância e a utilidade dos marcadores de DNA mitocondrial (*mtDNA*) e ribossomal (*rDNA*) nas pesquisas em Acarologia, foram revisadas para esses marcadores suas características gerais, a utilização e os temas mais importantes a eles relacionados.

2.2.1. DNA mitocondrial - *mtDNA*

Cerca de 70% dos estudos com marcadores de DNA utilizam o *mtDNA* como ferramenta genética (Zhang & Hewitt 2003). As sequências do *mtDNA* representam um recurso poderoso para os estudos evolutivos e têm sido utilizadas no entendimento da estrutura de populações, fluxo gênico, hibridização,

biogeografia e relações filogenéticas (Avice *et al.* 1987). A maior parte do *mtDNA* de animais apresenta uma série de características que os torna marcadores ideais em estudos filogenéticos: 1) estrutura genética simples, sem a presença de regiões repetitivas, elementos transponíveis, pseudogenes ou introns; 2) geralmente evolui rapidamente, pois apresenta uma taxa de divergência de sequências relativamente rápida. Primariamente, as variações se apresentam como substituições de bases; 3) herança materna, o modo de transmissão ao longo das gerações é efetivamente haplóide, não há recombinação; seus genes representam um loco genético único; 4) ordem e composição dos genes conservada; 5) sequências curtas em comparação às do genoma nuclear (Avice *et al.* 1987; Hoy 1994; Roderick, 1996).

A taxa de evolução dos genes mitocondriais varia entre linhagens, entre genes e mesmo dentro dos genes. No *mtDNA* há regiões que divergem rapidamente, enquanto outras são altamente conservadas, sendo que diferentes regiões podem ser utilizadas em diferentes níveis taxonômicos. Em insetos, observa-se que a taxa de evolução dos genes mitocondriais é, em média, de 1-2 vezes mais rápida que a dos genes nucleares (Hoy 1994).

As características e o modo de evolução do *mtDNA* em 20 espécies da superfamília Tetranychidea foram similares àqueles conhecidos para os insetos, sugerindo que estes artrópodes compartilharam caracteres ancestrais. Nesse estudo foram utilizadas sequências da região Cito cromo Oxidase I (*COI*) do *mtDNA*. Os resultados da filogenia baseados nas sequências *COI* foram compatíveis com aqueles obtidos pela classificação tradicional baseada em características morfológicas e biológicas (Navajas *et al.* 1996a).

Para ácaros da família Tetranychidae, as sequências do *mtDNA* estão sendo utilizadas basicamente para investigar os padrões evolutivos, pois fornecem informações sobre a estrutura geográfica e de padrões de colonização de uma dada espécie. As diferenças nas sequências são substanciais e precedem a divergência das espécies. A explicação recai na possível retenção de um polimorfismo ancestral que pode causar divergência molecular, sendo essa mais antiga do que a divergência da espécie, refletindo, assim, a história da colonização (Navajas *et al.* 1996; Navajas *et al.* 1998, 2001; Navajas & Boursot 2003).

2.2.2. DNA nuclear ribossomal - rDNA

As sequências de rDNA são comumente utilizadas para o estudo das relações filogenéticas, da variabilidade genética, e de divergências dentro e entre espécies por apresentarem propriedades adequadas, como: taxas diferenciais de evolução entre diferentes regiões e genes repetidos (Gebri³ citado por Weekers *et al.* 2001). Nos organismos eucariontes, o rDNA apresenta unidades transcricionais repetitivas (tandem), as quais são separadas por espaços intergênicos. Dentro de cada unidade transcricional, o “Internal Transcribed Spacer 1” (ITS1) separa a pequena subunidade 18S da 5,8S, enquanto o “Internal Transcribed Spacer 2” (ITS2) separa a unidade 5,8S da grande subunidade 28S. As regiões codantes apresentam pequena divergência entre espécies próximas, entretanto as regiões ITS podem apresentar maior variabilidade. Mutações ocorrem em taxas relativamente rápidas nestas regiões ITS (Weekers *et al.* 2001). Assim, as regiões codantes e os espaçadores diferem largamente em sua taxa de evolução, de modo que estas regiões do rDNA apresentam potencial para revelar relações filogenéticas de filós a populações, sendo consideradas muito versáteis para filogenia (Ele & Dixon 1991).

Uma limitação primária da região ITS em análises filogenéticas e no estudo de populações é a existência de polimorfismos entre unidades repetidas, que pode causar variação dentro de um mesmo indivíduo. Como exemplo, estudos filogenéticos sobre o besouro *Cincindela dorsalis* Say (Coleoptera: Cincidellidae) baseados na região ITS1 mostraram que a variação dentro dos indivíduos era quase tão alta quanto a variação em toda a linhagem. O padrão de variação das sequências sugeriu que existiam duas formas de ITS1, as quais eram mantidas em cromossomos diferentes (Vogler & DeSalle 1994). Entretanto, esta tendência para diversificação é “reparada” por um processo conhecido como “direção molecular”, o qual resulta na homogeneização das repetições individuais permitindo a produção de sequências uniformes em todas as repetições de uma dada espécie (Vogler & DeSalle 1994; Polanco *et al.* 1998). Por isto, a utilidade da região ITS para estudos populacionais deve ser analisada para cada espécie

³ GEBRI, S. A. (1985). Evolution of ribosomal DNA. In MACINTYRE, R. J. (Org.). *Molecular evolutionary genetics*. New York: Plenum (p.419-517).

(Roderick 1996). Até o momento, em ácaros fitófagos, não têm surgido problemas associados à diversidade intra-individual e este marcador tem sido amplamente utilizado (Navajas & Fenton 2000).

Navajas (2001) e (2002) concluíram que o estudo da região do ITS2 (rDNA) é útil na distinção de táxons intimamente relacionados e utilizaram as sequências ITS2 para efetuar a distinção entre *T. urticae* e *T. turkestanii* Ugarov & Nikolskii, espécies que ocorrem em populações sobrepostas nos plantios em casa-de-vegetação no Sul da França. Os autores observaram diferenças entre as sequências de nucleotídeos da região ITS2, e relataram que a enzima de restrição *rSal* corta a sequência ITS2 da molécula de DNA duas vezes em *T. urticae* e somente uma vez em *T. turkestanii*. Um terceiro tetraniquídeo, *Tetranychus ludeni* Zacher, que pode eventualmente ser confundido com *T. urticae* nas observações de campo e está frequentemente presente nas plantações no Sudoeste da França, apresentou a sua sequência ITS2 cortada três vezes pela enzima *Rsal*. Essas duas últimas espécies podem ser separadas precisamente pela morfologia do macho. Esses exemplos ressaltam a importância das sequências ITS2 na diagnose de espécies de tetraniquídeos.

2.2.3. DNA nuclear ribossomal versus DNA mitocondrial

As filogenias não devem ser construídas utilizando-se um único marcador. É importante comparar os resultados de marcadores com propriedades distintas para um melhor entendimento das populações estudadas. Por exemplo, análises filogenéticas utilizando sequências das regiões *COI* do *mtDNA* e ITS2 do rDNA de duas espécies do gênero *Tetranychus*, *T. urticae* e *T. turkestanii*, mostraram que estas espécies são polifiléticas para o *mtDNA*, mas monofiléticas para o rDNA. A diversidade de nucleotídeos foi de 3-4% para a região CO-I, e menor que 0,5% para a região ITS2. Os resultados indicaram que, apesar da transmissão biparental e multiplicidade de cópias no genoma, o rDNA apresentou menor tamanho populacional efetivo que o *mtDNA* nestas espécies (Navajas & Boursot 2003). Os autores sugerem que a conjunção do “reparo evolutivo” e/ou conversão de genes nas regiões do rDNA, a haplodiploidia e a proporção sexual

superior de fêmeas podem influenciar esta aparente contradição ao padrão esperado. Também, a filogenia das espécies japonesas do gênero *Panonychus* Yokoyama, baseada em sequências da região *COI* do *mtDNA*, foram discordantes daquelas obtidas utilizando-se regiões do rDNA (Toda *et al.* 2000).

De um modo geral, as variações no *mtDNA* em estudos populacionais parecem ser mais úteis que as variações nos genes ribossomais. Dentro de uma população, a frequência de um único haplótipo de *mtDNA* pode flutuar mais rapidamente que as frequências dos alelos de DNA nucleares e, por isto, o *mtDNA* seria mais sensível que o DNA nuclear ao "efeito fundador" e aos tamanhos reduzidos das populações invasoras. A perda ou aquisição de um haplótipo é importante em pequenas populações e a migração de poucos indivíduos entre populações seria suficiente para fixar uma linhagem de *mtDNA* nestas (Roderick 1996).

Navajas *et al.* (1998) constataram que, em populações de *T. urticae* com origens diferentes e amostradas em uma ampla área geográfica, havia cerca de 5% de divergência de nucleotídeos na região *COI* do *mtDNA*, enquanto nenhuma variação ocorria na região do ITS2. Os autores compararam também as taxas de evolução dos dois marcadores em um grupo de espécies do mesmo gênero e não obtiveram os mesmos resultados, observando-se que em outras espécies de *Tetranychus* a região ITS 2 também variava. Os resultados indicaram que a região do ITS evoluía 2,5 vezes mais rapidamente do que a região CO-I em outras espécies de *Tetranychus*. Os autores sugeriram que a homogeneização das sequências ITS2 em *T. urticae* era devido ao seu alto potencial de colonização e, conseqüentemente, a um fluxo gênico relativamente alto.

Variabilidade intraespecíficas e interespecíficas nos gêneros *Mononychellus* Wainstein e *Panonychus* Yokoyama (Tetranychidae) têm sido estudada utilizando-se sequências de ITS2 e CO-I (Navajas *et al.* 1994; Toda *et al.* 2000). A estrutura genética de um ácaro tetraniquídeo invasor, *Mononychellus progressivus* Doreste, originário da região neotropical e, acidentalmente introduzido no leste da África nos anos 70, foi estudada utilizando-se sequências de *COI* e de ITS2. Os resultados sugeriram que *M. progressivus* foi introduzido a partir de populações da Colômbia (Navajas *et al.* 1994).

Baseados em análises das sequências de DNA ribossomal (ITS) e mitocondrial (16S e *COI*), Navia *et al.* (2005), por exemplo, estudaram os aspectos filogeográficos de *Aceria guerreronis* Keifer (Eriophyidae), sugeriram a América como local de origem da espécie e definiram as rotas de introdução na África e na Ásia.

Quin (1997) realizou um estudo com aloenzimas para traçar a origem de um ácaro-praga invasor, *Halotydeus destructor* (Tucker) (Penthaleidae). O autor apresentou evidências de que sua provável área de origem seria a África do Sul e que, a partir de lá, foi introduzido na Austrália. Variações populacionais do grupo de ácaros parasitas de abelhas, *Varroa jacobsoni* Oudemans (Acari: Varroidae) têm sido amplamente estudadas. Os métodos utilizados para o estudo desses organismos têm muito em comum e variam de técnicas como, AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*), RAPD (*Random Ampified Polymorphic DNA*) ou DALP (*Direct Amplification of Length Polymorphisms*), PCR (*Polymerase Chain Reaction*) a análises específicas como os microssatélites (Navajas & Fenton 2000).

Navajas *et al.* (2001) estabeleceram a sinonímia entre *T. kanzawai* Kishida e *T. hydrangea* Pritchard & Baker baseando-se em análises de sequências da região ITS2 e em estudos de cruzamentos. O gênero *Amphytetranychus* Oudemans foi restaurado como base em estudos comparados dos caracteres moleculares (ITS2 e *COI*) e morfológicos de *Tetranychus viennensis* Zacher (sinônimo de *Amphytetranychus viennensis* (Zacher, 1920) com os de outras oito espécies de Tetranychidae (Navajas *et al.* 1997). Variação intraespecífica foi observada em *T. kanzawai* nos estudos com sequências de ITS e *COI* (Hinomoto & Takafuji 2001).

2.2.4. Estudos filogenéticos e filogeográficos

Os estudos de sistemática filogenética têm como objetivo reconstruir a história evolutiva dos grupos de organismos (Amorim 1994).

Avanços recentes nas teorias da genética de populações, especialmente com a teoria de coalescência, associada ao rápido avanço das técnicas moleculares, tem permitido o acesso a detalhada informação filogenética populacional, nas quais diferentes haplótipos representam unidades taxonômicas operacionais (OTU) (Crandall & Templeton 1996). A revolução na tecnologia de sequenciamento de genes tem permitido a construção de genealogias ou filogenias mais acuradas, as quais podem ajudar no entendimento dos processos biológicos que vêm ocorrendo em diferentes níveis de hierarquia dos organismos (Harvey & Nee 1996). Informações sobre sequências de DNA podem ser utilizadas como ferramentas importantes na reconstrução das relações evolutivas entre organismos (Weekers *et al.* 2001).

Os primeiros trabalhos em que foram utilizadas abordagens de filogenética molecular em estudos de genética de populações, especialmente relacionados a padrões biogeográficos, foram publicados no final dos anos 1980 (Avise *et al.* 1987; Avise 1989). Estes trabalhos exploraram qualitativamente a relação entre divergência de linhagens e a extensão da partição geográfica entre haplótipos (Crandall & Templeton 1996). De acordo com Avise (1989), os levantamentos sobre a diversidade de haplótipos no *mtDNA* forneceram os primeiros dados empíricos para a estimativa de árvores de genes em uma escala microevolutiva intraespecífica. As relações entre filogenia e distribuição geográfica constituem os padrões filogeográficos para uma determinada espécie. Árvores filogeográficas podem ser interpretadas em termos de demografia histórica considerando os modelos de distribuição de linhagens de genes.

A estrutura geográfica de uma determinada espécie trata da distribuição e abundância de genótipos inter e intra-populações (Roderick 1996). Esta definição inclui dois componentes distintos, mas relacionados: a estrutura demográfica e genética da espécie (Slatkin⁴ citado por Roderick 1996). A estrutura demográfica

⁴ SLATKIN, M.(1994). Gene flow and population structure. In REAL, L.A. (org.). *Ecological genetics*. Princeton: Princeton University Press (p. 3-17).

refere-se aos processos que influenciam o número e a distribuição das classes fenotípicas dos indivíduos. A estrutura genética pode ser descrita como a distribuição da variação genética e o resultado de migração, seleção, mutação, deriva genética e outros fatores relacionados a estes processos, para uma dada espécie. Devido ao fato da demografia estar relacionada a estes processos genéticos, a estrutura genética e demográfica são, necessariamente, interligadas. Por esta razão, a estrutura genética pode ser utilizada para inferir sobre os processos e o histórico demográfico de uma espécie (Roderick 1996).

A estrutura geográfica de uma espécie pode ser inferida indiretamente através de dados genéticos. Estes dados genéticos podem ser analisados de duas maneiras distintas: 1) tradicionalmente, de modo que as populações são tratadas como unidades genéticas e são estimadas medidas de similaridade entre populações; 2) através de estudos filogeográficos, nos quais as relações entre os genótipos (filogenias de alelos ou haplótipos) de uma ou mais populações podem ser examinadas em relação à sua localização geográfica. Neste segundo caso, analisa-se a variação nas sequências de DNA para estabelecer relações entre os haplótipos do mesmo loco (Roderick 1996).

Na Europa e na Ásia a diferenciação genética entre populações de *T. urticae* tem sido estudada através de métodos moleculares, conjuntamente com a avaliação de parâmetros biológicos, comportamentais e morfológicos (Gotoh *et al.* 1993; Hence *et al.* 1998; Navajas 1998; Tsagkarakou *et al.* 1999; Navajas *et al.* 2000). Os resultados indicam que a variabilidade da espécie pode estar associada à distribuição geográfica ou à seleção de plantas hospedeiras. Esse ponto tem sido alvo de amplas discussões para essa espécie.

Gotoh *et al.* (1993) estudaram a formação de raças hospedeiras em *T. urticae* através da avaliação das diferenças genéticas, preferência pela planta hospedeira, seleção para acasalamentos em linhagens coletadas em abóbora e tomate e concluíram que houve formação de duas raças hospedeira, biologicamente isoladas em simpatria.

Goka *et al.* (1996) detectou por eletroforese diferenças genéticas entre as formas verdes e vermelhas de *T. urticae* e registraram que a forma vermelha está geneticamente isolada da verde. Os autores afirmaram que embora ocorra hibridização em condições de laboratório, o isolamento reprodutivo em condições

de campo foi observado e que esse fato é comum em muitas espécies de insetos, no qual duas linhagens simpátricas se hibridizam em laboratório, mas no campo o fluxo gênico entre elas é restrito.

Tsagkarakou *et al.* (1997) não encontraram diferenças genéticas entre populações de *T. urticae* coletadas em diferentes hospedeiros quando as plantas selecionadas estavam localizadas dentro de um raio de 50 metros, mas quando a distância foi superior a 150 metros, a diferenciação foi encontrada.

Tsagkarakou *et al.* (1998) estudando *T. urticae* em campo aberto de citros na região do mar mediterrâneo encontraram maior similaridade genética entre as populações coletadas no citros em diferentes regiões do que entre aquelas coletadas em diferentes hospedeiros em uma mesma região.

A filogeografia e a estrutura genética de *T. urticae* têm sido estudadas utilizando-se sequências de *COI* do *mtDNA*. Nesse caso, observou-se o padrão genético geográfico deste ácaro ao longo de sua área de distribuição, com a caracterização de duas linhagens: uma colonização antiga no Mediterrâneo e uma recente nas regiões temperadas do hemisfério norte (Navajas 1998).

Análises de aloenzimas e estudos da variação nas sequências ITS2 de populações de *T. urticae* da região Mediterrânea permitiram uma avaliação do papel da planta hospedeira e da distância geográfica no processo de diferenciação genética (Navajas, *et al.* 1998; Tsagkarakou *et al.* 1999; Navajas *et al.* 2000).

Geralmente, condições geográficas e ecológicas causam um isolamento parcial de subpopulações, reduzindo o fluxo gênico entre as mesmas, mas não o impedindo completamente. Entretanto, após um certo tempo, sob seleção divergente, acumulam diferenças suficientes para que, caso se encontrem, sejam reprodutivamente isoladas. Por sua vez, as alterações de hospedeiros em insetos fitófagos, por exemplo, representam o melhor exemplo de que a seleção de recursos distintos pode ocorrer e promover a especiação em simpatria, com o isolamento incompleto. Se a especiação será completa sob estas condições é uma questão aberta (Stearns & Hoekstra 2003).

Tetranychus urticae apresenta ampla distribuição geográfica e um grande número de hospedeiros no Brasil. Estudos com marcadores moleculares e pesquisas básicas em filogenética e filogeografia são ferramentas úteis na

caracterização de populações, auxiliando na determinação da presença ou não de biótipos. Por sua vez, esses resultados podem subsidiar as decisões sobre as medidas de controle desse ácaro, bem como, identificar as populações que representam risco para o Brasil e que devem ser interceptadas nas inspeções quarentenárias.

2.2.5. Métodos em análise filogenética molecular

No estudo da evolução das espécies é necessário procurar por homologies, ou seja, similaridades resultantes da herança de um ancestral comum entre as espécies envolvidas, buscando-se encontrar uma árvore evolutiva assumindo que diferentes espécies derivam de um ancestral comum.

A construção de árvores filogenéticas hipotéticas atualmente faz parte da análise exploratória de sequências moleculares. A análise comparativa de sequências é uma ferramenta importante em genética e é representada sob a forma de árvores filogenéticas, que descrevem a relação evolutiva entre as sequências de nucleotídeos resultantes das extrações de DNA. A reconstrução de sequências ancestrais pode mostrar o tempo e a direção das mutações (Holder & Lewis, 2003).

O processo de inferência filogenética é, basicamente, composto por quatro etapas (Holder & Lewis, 2003): 1) coleta das sequências que serão comparadas; 2) alinhamento das sequências (pareamento das bases de uma sequência às de sequências homólogas); 3) escolha de um modelo de evolução das sequências (normalmente utilizam-se *softwares* que testam vários modelos e inferem os que melhor se adequam às sequências sob análise); 4) a partir das sequências em análise e dos modelos de evolução escolhidos, é criado um conjunto de árvores filogenéticas (utilizando-se os métodos de reconstrução filogenética, através das buscas de árvores múltiplas seguidas de “*bootstrap*” ou do algoritmo “Markov chain Monte Carlo” (MCMC). Este conjunto de árvores fornecido pode ser resumido utilizando-se técnicas de “árvores consensus”, as quais mostram as partes das árvores que são encontradas na maioria ou em todas as árvores.

Para o alinhamento de sequências de DNA de diferentes espécies considera-se a hipótese de homologia entre as bases (ou nucleotídeos) que constituem os genes que estão sendo comparados naqueles organismos. Encontrar um bom alinhamento entre as sequências de várias espécies envolve algumas dificuldades. A similaridade pode ser alta em certos trechos das sequências e baixa em outras. As sequências podem ser de tamanhos variados ou muito diferentes entre si. Entre os programas utilizados para o alinhamento de sequências, o Clustal W (Thompson, 1994) é uma ferramenta básica que produz alinhamentos múltiplos biologicamente significativos de sequências (DNA ou proteína) divergentes, calculando o melhor escore, alinhando as sequências para que identidades, similaridades e diferenças possam ser visualizadas. As diferenças evolutivas podem ser vistas em cladogramas ou filogramas.

Dessa forma, os métodos de reconstrução filogenética tradicionais fornecem uma série de árvores filogenéticas possíveis a partir das sequências analisadas. A relação entre essas sequências é representada nas árvores. O método estatístico do *bootstrap*, proposto para estabelecer intervalos de confiança nas filogenias (Felsenstein, 1985), traz informação sobre a robustez de cada ramificação. Por ser versátil, este método tem sido o mais tradicionalmente utilizado em filogenia molecular. Um detalhamento sobre a metodologia estatística *bootstrap* pode ser encontrada em Solignac *et al.* (1995). De um modo geral, *bootstrap* fornece informações sobre quais partes das árvores apresentam baixo suporte. Comparações que dependem fortemente de ramificações com baixo suporte *bootstrap* devem ser feitas com precaução. A interpretação exata do valor *bootstrap* é relativa. Certamente, quanto maior o valor *bootstrap* obtido, melhor. Mas qual seriam os valores limite abaixo dos quais os agrupamentos deveriam ser considerados com precaução? Por tratar-se de uma medida conservadora de suporte, valores iguais ou superiores a 70% indicam forte suporte ao grupo. Deve-se ressaltar que as proporções *bootstrap* auxiliam na previsão das possibilidades de que as mesmas árvores sejam obtidas se mais dados forem coletados e, não, se o resultado é correto ou incorreto. Pode-se considerar que altas proporções *bootstrap* são condições necessárias, mas não suficientes para se ter alta confiabilidade em um grupo (Holder & Lewis, 2003).

Os métodos tradicionalmente utilizados em reconstruções filogenéticas são: algoritmo NJ (*Neighbour-Joining*) e árvores, que utilizam critérios de otimização como parcimônia máxima (MP) ou probabilidade máxima (ML). Os princípios de cada um destes métodos, assim como vantagens e desvantagens, foram apresentados por Solignac *et al.* (1995) e Holder & Lewis (2003).

Métodos de análises promissores trazem novas perspectivas para a biologia evolutiva como a abordagem Bayesiana (Huelsenbeck *et al.* 2001; Holder & Lewis 2003;). Outros métodos que auxiliam as conclusões estatísticas são o método da coalescência e o algoritmo Markov chain Mont Carlo (MCMC) discutidos por Luikart & England (1999) e Holder & Lewis (2003).

CAPÍTULO 1

Ácaros tetraniquídeos (Prostigmata: Tetranychidae) no Brasil - novos hospedeiros, localidades e táxons

RESUMO

A família Tetranychidae Donnadieu compreende um grande número de ácaros estritamente fitófagos e inclui os ácaros pragas de maior importância para a agricultura nacional e mundial. Atualmente, esta família é composta por mais de 1.250 espécies em todo o mundo, das quais 182 foram relatadas na América do Sul e 104 no Brasil. Apesar dos importantes avanços sobre o conhecimento relativo aos ácaros tetraniquídeos no Brasil, as informações estão concentradas na Região Sudeste e/ou a espécies associadas a culturas agrícolas. Algumas regiões do país, culturas em expansão, ou espécies vegetais em áreas não agrícolas têm sido pouco exploradas em relação à ocorrência de ácaros fitófagos de um modo geral, incluindo os tetraniquídeos. O presente trabalho teve como objetivo contribuir para o conhecimento taxonômico dos ácaros tetraniquídeos no Brasil. Para tanto, realizou-se um levantamento em 15 Estados e no Distrito Federal, durante o qual foram coletadas 550 amostras de 120 espécies vegetais. Infestações por ácaros tetraniquídeos foram confirmadas em 207 amostras e 20 espécies da subfamília Tetranychinae foram identificadas em 58 diferentes hospedeiros. Foram relatados novos hospedeiros para tetraniquídeos no Brasil, na América do Sul ou em nível mundial, para as espécies: *Eutetranychus banksi* (McGregor); *Mononychellus tanajoa* (Bondar); *Oligonychus anonae* Paschoal; *O. mangiferus* (Rahman & Sapra); *Tetranychus bastosi* Tuttle, Baker & Sales; *T. evansi* Baker & Pritchard; *T. ludeni* Zacher; *T. mexicanus* (McGregor); *T. neocaledonicus* André; e *T. urticae* Koch. Novas localidades no Brasil foram registradas para *Eotetranychus tremae* De Leon; *O. anonae*; *Panonychus ulmi* (Koch); e *T. gloveri* Baker & Pritchard. *Eotetranychus smithi* Pritchard & Baker é relatado pela primeira vez no Brasil, tendo sido coletado em rosa (*Rosa* sp.), em Rio Branco, Acre. Foram identificadas quatro espécies novas de tetraniquídeos: duas pertencentes ao gênero *Oligonychus* Berlese, em uva (*Vitis vinifera* L.) e rosa (*Rosa* sp.), nos municípios de Pirapora e Três Marias, Minas Gerais, respectivamente; e duas pertencentes aos gêneros *Monoceronychus* McGregor e *Schizotetranychus* Tragardh, ambas em capim coqueirinho (*Eustachys distichophylla* Lag. Nees), nos municípios de Itaara e São Luiz Gonzaga, Rio Grande do Sul, respectivamente.

Palavras chaves: Acari, América do Sul, Bryobiinae, região Neotropical, taxonomia, Tetranychinae.

TETRANYCHID MITES (PROSTIGMATA: TETRANYCHIDAE) IN BRAZIL – NEW HOSTS, LOCALITIES AND TAXA

ABSTRACT

The Tetranychidae Donnadieu family contains a large number of strictly phytophagous mites, and includes the most important pest mites to the national and worldwide agriculture. At present this family is composed for more than 1250 species worldwide, being 182 reported from South America and 104 from Brazil. Although the important progress on the knowledge of tetranychid mites in Brazil, information is concentrated in the Southeast Region and/or on species associated with agriculture crops. Some regions of the country, crops that are in expansion, or plant species in non-agricultural areas have been poorly exploited in relation to the occurrence of phytophagous mites in general, including the tetranychids. The present study had as purpose contributes to the taxonomic knowledge of tetranychid mites in Brazil. To that a survey in 15 States and the Federal District was conducted, when 550 samples of 120 plant species were collected. Tetranychid mite infestations were confirmed on 207 samples and 20 species in the Tetranychinae subfamily were identified on 58 different hosts. New hosts for tetranychids in Brazil, South America or worldwide were reported for the following species: *Eutetranychus banksi* (McGregor); *Mononychellus tanajoa* (Bondar); *Oligonychus anonae* Paschoal; *O. mangiferus* (Rahman & Sapra); *Tetranychus bastosi* Tuttle, Baker & Sales; *T. evansi* Baker & Pritchard; *T. ludeni* Zacher; *T. mexicanus* (McGregor); *T. neocaledonicus* André; and *T. urticae* Koch. New localities in Brazil were reported for *Eotetranychus tremae* De Leon; *O. anonae*; *Panonychus ulmi* (Koch); and *T. gloveri* Baker & Pritchard. *Eotetranychus smithi* Pritchard & Baker is reported for the first time in Brazil, being collected on rose (*Rosa* sp.), in Rio Branco, Acre. Four new species of tetranychids were identified: two belonging to *Oligonychus* Berlese genus, on grape (*Vitis vinifera* L.) and rose (*Rosa* sp.), from Pirapora and Três Marias municipalities, Minas Gerais, respectively; and two belonging to *Monoceronychus* McGregor and *Schizotetranychus* Tragardh genera, both from weeping fingergrass (*Eustachys distichophylla* Lag. Nees), from Itaara and São Luiz Gonzaga municipalities, Rio Grande do Sul, respectively.

Palavras chaves: Acari, Bryobiinae, Neotropical region, South America, taxonomy, Tetranychinae.

1.1. INTRODUÇÃO

A família Tetranychidae compreende um grande número de espécies de ácaros estritamente fitófagos, e inclui pragas importantes para a agricultura nacional e mundial. Mais de 100 espécies são nocivas às lavouras e aproximadamente 10 se destacam pelos elevados prejuízos no campo (Migeon & Dorkeld 2006). Yaninek & Moraes (1991) relataram 54 espécies de tetraniquídeos como pragas de diferentes culturas em todo o mundo.

Os ácaros tetraniquídeos têm sido referidos na literatura nacional como “ácaros-de-teia” e, na literatura de língua inglesa, como “spider mites”, dado o comportamento de muitas das espécies de produzir quantidade variável, às vezes abundante, de teia (Moraes & Flechtmann 2008), um dos sinais da presença desses ácaros na planta. As injúrias causadas pelos tetraniquídeos são provocadas pela ação dos estiletos que esvaziam as células epidérmicas e parenquimatosas, que são ocupadas por ar, resultando no aparecimento de pontuações translúcidas. Confluindo, dão origem a áreas prateadas ou verde-pálidas devido à remoção dos cloroplastos. Ocorre também a oxidação das áreas atacadas, que acabam por conferir tons bronzeados à folha. Sob ataques mais intensos, a folha pode apresentar manchas necróticas, de extensão variável, chegando a causar rasgadura e até queda da mesma (Moraes & Flechtmann 2008).

De acordo com Bolland *et al.* (1998) o número de espécies de tetraniquídeos descritas permaneceu estável por 75 anos, entretanto, quando os prejuízos decorrentes da incidência desses ácaros na agricultura foram detectados houve um notável incremento no número de espécies descritas. Cento e duas espécies, pertencentes a 15 gêneros, foram listadas inicialmente por McGregor em 1950. Cinco anos após, alcançou 204 em 18 gêneros (Pritchard & Baker 1955). Em 1998, passou a 1.189 espécies, em 71 gêneros, inscritas no World Catalogue of the Spider Mite Family (Acari: Tetranychidae) (Bolland *et al.* 1998) e, atualmente, são aproximadamente 1.250 espécies, em 76 gêneros, relacionadas no Spider Mites Web: a comprehensive database for the Tetranychidae (Migeon & Dorkeld 2006).

No Brasil, os estudos taxonômicos de tetraniquídeos foram conduzidos a partir de 1920-30. Os primeiros relatos foram pontuais como, por exemplo, a constatação de *Tetranychus gloveri* Banks, 1900 e a descrição de *Mononychellus tanajoa* Bondar, 1938, a partir de espécimens coletados no Brasil por G. Bondar, um pesquisador russo radicado na Bahia (Bondar 1930, 1938). Em seguida, a partir dos anos 1960, contou-se com numerosas contribuições de pioneiros da Acarologia Agrícola no país - C. H. W. Flechtmann (Flechtmann 1967, 1967a, 1967b, 1972, 1975, 1976; Flechtmann & Baker 1970; Flechtmann & Bastos 1972) e A. D. Paschoal (ESALQ, USP, Piracicaba) (Paschoal 1970, 1970a), seguidos por R. J. F. Feres (UNESP, São José do Rio Preto São Paulo) (Feres 1986, 1992, Feres & Flechtmann 1986, 1986a, 1988, 1995, 1995a, 1995b). A partir de então, estes e novos pesquisadores vêm conduzindo estudos importantes com tetraniquídeos no Brasil em diversas áreas (taxonomia, ecologia, biologia, controle e resistência) o que tem possibilitado um incontestável avanço no conhecimento deste grupo de ácaros no país. Atualmente, entre as 1.250 espécies de tetraniquídeos descritas de todo o mundo, 182 foram relatadas na América do Sul e 104 no Brasil (Bolland *et al.* 1998; Migeon & Dorkeld 2006).

Apesar dos importantes avanços sobre o conhecimento relativo aos ácaros tetraniquídeos no Brasil, as informações estão concentradas na Região Sudeste e/ou muitas vezes estão associadas somente a culturas de importância agrícola. Algumas regiões do país e/ou culturas em expansão e/ou espécies vegetais em áreas não agrícolas têm sido pouco exploradas em relação à ocorrência de ácaros fitófagos de um modo geral, incluindo os tetraniquídeos. Com a expansão agrícola alcançando novas regiões do país, inclusive aproximando-se de áreas de reservas biológicas, é importante a continuidade das pesquisas com tetraniquídeos, somando novas informações que contribuam para o aumento do conhecimento dessa importante família de ácaros fitófagos.

Nesse capítulo são apresentadas informações sobre a ocorrência de tetraniquídeos nas cinco Regiões brasileiras, em espécies ornamentais, frutíferas, hortaliças, gramíneas, oleaginosas e culturas extensivas. Novos

registros de hospedeiros e localidades são descritos para ácaros tetraniquídeos já conhecidos no país, bem como a ocorrência de quatro espécies novas para a ciência. Durante a realização desses levantamentos foi possível a obtenção de amostras de ácaro rajado, *Tetranychus urticae* Koch, para os estudos de variabilidade genética propostos no projeto de tese, cujos resultados são apresentados nos capítulos seguintes.

OBJETIVOS

Esse capítulo foi elaborado com o objetivo geral de contribuir para o conhecimento dos ácaros tetraniquídeos no Brasil. Para isso estabeleceram-se como objetivos específicos:

1. Identificar as espécies de tetraniquídeos coletadas nas Regiões Sul, Sudeste, Centro-Oeste, Nordeste e Norte, em espécies vegetais ornamentais, frutíferas, hortaliças, gramíneas e culturas extensivas;
2. Registrar informações sobre novas localidades de ocorrência no Brasil e novos hospedeiros em escala mundial para algumas das espécies coletadas;
3. Apresentar as diagnoses, características morfológicas, hospedeiros e localidade tipo para espécies identificadas como novas para a ciência.

1.2. MATERIAL E MÉTODOS

As atividades deste trabalho foram desenvolvidas em cinco etapas principais: 1) obtenção de amostras de ácaros tetraniquídeos através de coleta em diferentes regiões e hospedeiros no Brasil, bem como de solicitação a colaboradores; 2) processamento e inspeção das amostras coletadas; 3) preservação dos ácaros tetraniquídeos em lâminas de microscopia; 4) identificação morfológica e; 5) diagnose e caracterização morfológica de novas espécies de tetraniquídeos no Brasil.

Previamente, ao início das atividades de coleta, procedeu-se à formalização dos procedimentos legais para a coleta e transporte de material zoológico junto ao Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Renováveis (IBAMA) (ANEXO 1). A autorização concedida foi registrada no referido instituto sob o número 231/2006 CGFAU e permitiu a captura, coleta e transporte de material zoológico no âmbito desse projeto.

1.2.1 Obtenção de Amostras

Para a obtenção de amostras de ácaros tetraniquídeos foram realizados levantamentos no período compreendido entre outubro de 2004 e julho de 2008, em 15 Estados das cinco Regiões do Brasil: Acre, Bahia, Ceará, Espírito Santo, Goiás, Minas Gerais, Mato Grosso do Sul, Paraná, Pernambuco, Rio Grande do Norte, Rio Grande do Sul, Roraima, Santa Catarina, São Paulo e Sergipe e no Distrito Federal (Figura 1.1; ANEXO 2). Os levantamentos contaram com o apoio da equipe do Laboratório de Quarentena Vegetal, Embrapa Cenargen, e com o auxílio de colaboradores externos de universidades, institutos de pesquisa e órgãos de extensão rural.

No período em que se realizaram as coletas no Rio Grande do Sul foi efetuada, em caráter excepcional, uma única coleta no Uruguai.

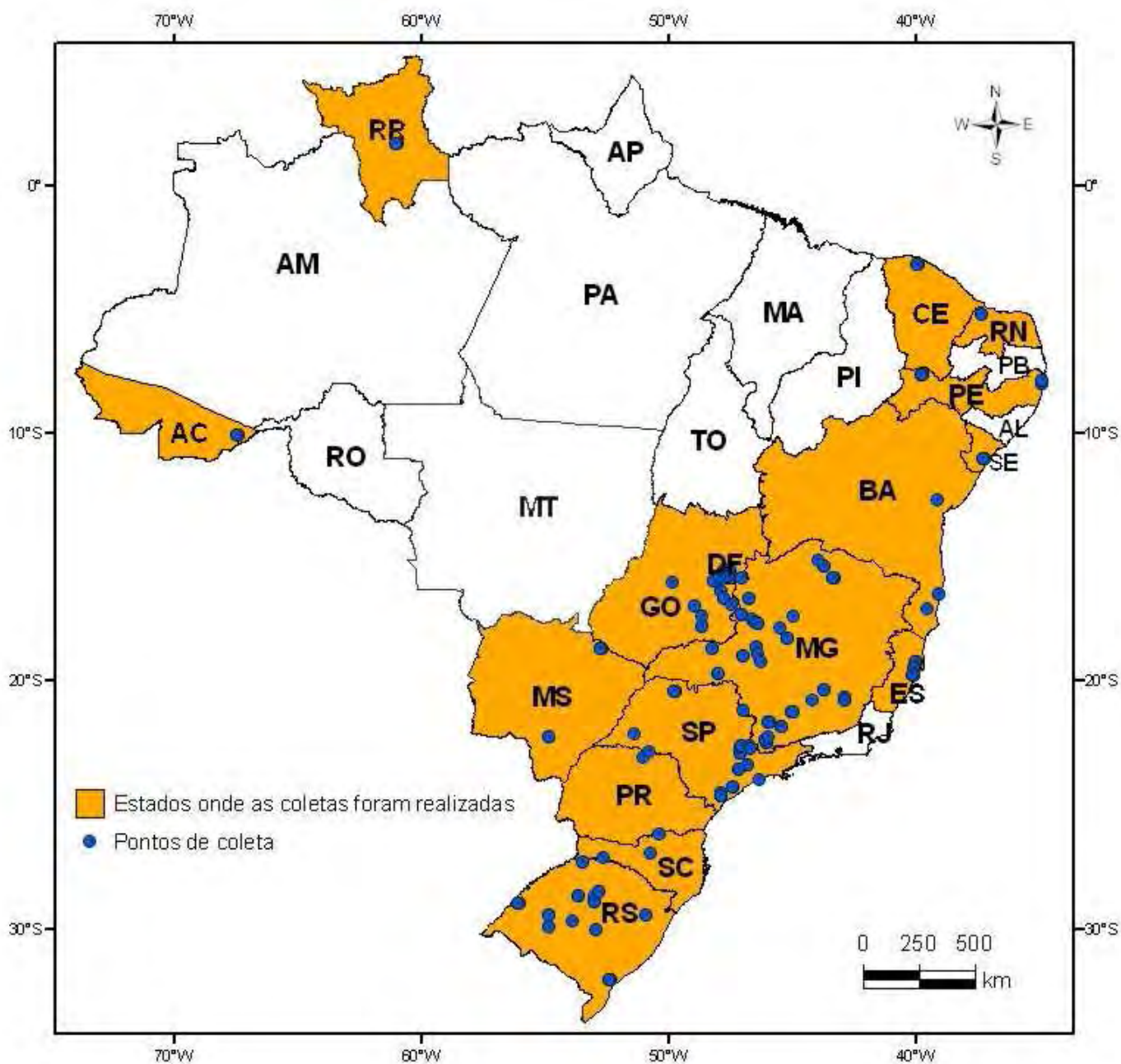


Figura 1.1. Estados e respectivos pontos de amostragem de material vegetal, visando a coleta de ácaros tetraníquídeos no Brasil, no período de outubro de 2004 a julho de 2008.

Foram coletadas amostras de espécies vegetais ornamentais, frutíferas, hortaliças, gramíneas e culturas extensivas, em cultivos comerciais, experimentais e/ou domésticos. As plantas ornamentais foram coletadas em jardins e/ou em viveiros públicos. Também foram realizadas coletas em propriedades particulares, ao longo dos trechos programados nas viagens, quando se encontravam espécies vegetais de importância econômica relatadas como hospedeiras de ácaros tetraniquídeos de acordo com Moraes & Flechtmann (2008) (ANEXO 2).

As amostras de material vegetal foram compostas por ramos e folhas formadas e novas, internas e externas, dos distintos substratos dos hospedeiros (Figura 1.2). Amostras foram coletadas quando as plantas apresentavam os sintomas característicos de ataque por ácaros tetraniquídeos, presença de teia nas folhas ou quando se observava a presença de ácaros tetraniquídeos visualmente, com o auxílio de uma lupa de mão (10x).

As amostras foram acondicionadas em sacos de papel devidamente fechados (Figura 1.3), sendo estes, colocados dentro de sacos de plásticos, visando minimizar a perda de umidade do substrato (Figura 1.4).

Efetuuou-se a identificação das amostras registrando-se os dados de coleta no saco de papel (Figura 1.5; Tabela 1.1) e, concomitantemente, na caderneta de campo. Para o acondicionamento das amostras durante o transporte do campo ao laboratório, foram utilizadas caixas de isopor com bolsas térmicas com gel polímero vinílico (Gelox®) congeladas (Figura 1.6), visando manter a temperatura baixa dentro da caixa, para preservar os tecidos vegetais evitando condições de estresse e o comportamento de fuga dos ácaros. Algumas plantas foram identificadas somente até gênero. A posição geográfica do local de coleta foi registrada utilizando-se um GPS Garmin 12, *datum* WGS84 (World Geodetic System 84) (Figura 1.7). No laboratório todos os dados de coleta foram transferidos para um livro de registro. Em seguida, as coordenadas geográficas foram tabuladas no programa Microsoft Excel (2003) e transformadas em graus decimais, o que possibilitou a confecção dos mapas de distribuição dos pontos de coleta e das espécies encontradas, utilizando-se

o programa ARCGIS versão 9.0 (ESRI Company) e o programa DIVA-GIS (Hijmans *et al.* 2001) para a distribuição das espécies encontradas no Brasil

Tabela 1.1. Dados de coleta registrados para cada amostra.

Cultura:		
Número da amostra:		
Coletor:		
Localização:		
Endereço:		
Coordenadas:		
Proprietário:		
Responsável:		
Telefone:	Fax:	Data:
Condições ambientais:		
Pulverização: Sim () Não ()		
Observações:		

1.2.2. Inspeção e Processamento de Amostras

Estas atividades e as consecutivas foram conduzidas na Unidade de Acarologia, Laboratório de Quarentena Vegetal, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia (Cenargen). Após as coletas, as amostras permaneceram por um período máximo de dois dias, na geladeira, até serem inspecionadas, pelo exame direto e/ou lavagem do material vegetal.

O exame direto consistiu na observação direta do material vegetal ao estereoscópio (Zeiss – Stemi SV 6) a um aumento de 20x, observando as superfícies inferiores e superiores das folhas, ramos, nervuras e frutos.

Posteriormente, as amostras de material vegetal foram submetidas ao método de lavagem em solução detergente. Este método consiste em submergir a amostra em uma solução com detergente, agitar, descansar por cinco minutos e, em seguida, submeter o material ao peneiramento (Figura 1.8), em um jogo de três peneiras sobrepostas (1,00 μ m 16 Mesh; 500 μ m 32 Mesh, 53 μ m 270 Mesh), sendo os detritos de maior espessura retidos nas duas primeiras e os de menor espessura, incluindo os ácaros, na terceira, a qual teve seu interior lavado com jatos de álcool etílico 70% (Figura 1.9).



Figura 1.2 – Coleta de amostra de material vegetal.



Figura 1.3 – Acondicionamento da amostra de material vegetal em saco de papel.



Figura 1.4 – Acondicionamento da amostra de material vegetal em saco plástico.



Figura 1.5 - Amostra embalada contendo a etiqueta de identificação.



Figura 1.6 – Caixa de isopor contendo bolsas térmicas de gelo sintético utilizadas no armazenamento e transporte das amostras.



Figura 1.7 – GPS (Global Positioning System) marca Garmin modelo 12 utilizado na determinação das coordenadas geodésicas

A solução em álcool resultante desta lavagem foi vertida em pote plástico (Figura 1.10) e preservada em câmara climatizada (TcnaI TE-400) com temperatura constante mantida a 4°C, até o procedimento de triagem dos ácaros nas amostras (Figura 1.11). Cada pote plástico recebeu o respectivo número da amostra e uma etiqueta em papel vegetal contendo os dados de coleta. A triagem da “solução”, proveniente do método de lavagem, consistiu em separar os ácaros tetraniquídeos da solução de álcool etílico a 70%. Os ácaros foram coletados manualmente com o auxílio de um estilete de ponta fina e um pincel de cerdas finas, ao microscópio estereoscópico (20x) (Carl Zeiss – Jena e Olympus SZx122 acoplado a um transiluminador Highlight 3000-1). Os ácaros pertencentes a outras famílias foram mantidos na solução de álcool 70% para estudos posteriores.

1.2.3 Preservação de ácaros tetraniquídeos em lâminas de microscopia

Os ácaros tetraniquídeos foram montados em meio de Hoyer (Flechtmann 1985), com o auxílio de um microscópio estereoscópico, aumento de 50x. Após a montagem das lâminas, as mesmas foram dispostas para secagem em estufa (Biomatic), a 50°C, por 10 dias. Logo em seguida, foram seladas com esmalte incolor e etiquetadas no lado esquerdo com os dados de coleta: nome científico e família do hospedeiro, localidade, data de coleta e nome do coletor. De cada amostra foram preparadas aproximadamente cinco lâminas de fêmeas, contendo cinco espécimes cada, e 10 lâminas individuais de machos, conforme a disponibilidade de exemplares. Em algumas amostras foram encontrados pouco machos, o que é comum à algumas espécies de tetraniquídeos. Nestes casos, todos os machos disponíveis na amostra foram montados, entretanto muitas vezes não se alcançou o número de preparações previamente estipulado. Cerca de 1.200 lâminas foram preparadas.



Figura 1.8 - Método de lavagem utilizado para extração de ácaros - peneiramento após a submersão do material vegetal em solução com detergente



Figura 1.9 - Método de lavagem utilizado para extração de ácaros - lavagem da peneira de menor abertura com jato de álcool 70%



Figura 1.10 - Método de lavagem utilizado para extração de ácaros - transferência de partículas retidas na peneira de menor abertura para pote plástico utilizado no armazenamento das amostras em álcool etílico a 70%



Figura 1.11 - Acondicionamento dos potes plásticos contendo a solução em álcool etílico a 70% resultante da lavagem do material vegetal.

1.2.4 Identificação Morfológica de ácaros tetraniquídeos

Os ácaros tetraniquídeos encontrados nas amostras foram identificados utilizando-se um microscópio óptico Leitz Wetzlar - Orthoplan de contraste de fases e Nikon Eclipse 80i com contraste de fases e de interferência, com base nas descrições de cada uma das espécies e na literatura pertinente, especialmente, Pritchard & Baker (1955); Meyer (1974, 1987); Baker & Tuttle (1994). A comparação dos exemplares coletados com espécimes depositados na Coleção de Ácaros de Referência da Embrapa Cenargen também auxiliou na identificação dos mesmos. Alguns espécimes foram identificados com a colaboração do professor Dr. Carlos H. W. Flechtmann, pesquisador do CNPq, Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” (ESALQ), Universidade de São Paulo (USP), Piracicaba, São Paulo, Brasil.

1.2.5. Diagnose e caracterização morfológica de novas espécies de tetraniquídeos do Brasil

Essa atividade foi realizada com a colaboração do Dr. Carlos H. W. Flechtmann.

Foram feitas a diagnose e a caracterização morfológica dos ácaros tetraniquídeos identificados como novos táxons para a ciência. Os desenhos foram elaborados com auxílio de câmara clara, acoplada ao microscópio de contraste de fases (Leitz Wetzlar – Orthoplan) utilizando-se as objetivas com os aumentos de 40x e 100x. As medidas foram tomadas utilizando-se a ocular micrométrica no aumento de 100x. As fotos foram obtidas utilizando-se o sistema digital composto de um microscópio de contraste de fases e contraste de interferência (Nikon Eclipse 80i) conectado a uma câmara digital (Nikon DS-Fil com DS-L2) e a um computador. As imagens dos caracteres taxonômicos mais importantes foram editadas utilizando-se os programas Helicon Focus Software versão 4.10 (2007) e Helicon Filter versão 4.5 (2007). Para a

composição das imagens foi utilizado o programa ArcSoft Panorama Maker versão 4.2.0.59.

Todas as medidas foram dadas em micrômetros (μm). Para as fêmeas, cada medida do holótipo precede a amplitude da variação das medidas dos parátipos. O comprimento do corpo incluiu o rostro. As cerdas foram medidas do centro da base até a sua extremidade distal. A distância entre as cerdas foi medida de centro a centro de suas respectivas bases.

Material tipo designado para esses novos táxons foi depositado na Coleção de Referência do Laboratório de Quarentena Vegetal da Embrapa Recursos genéticos e Biotecnologia, Brasília, DF, Brasil e também na Coleção de Ácaros do Departamento de Entomologia, Fitopatologia e Zoologia Agrícola da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, São Paulo, Brasil.

1.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

No total foram coletadas 550 amostras de material vegetal e, em 37,64% (n=207) foram encontrados ácaros tetraniquídeos (ANEXO 1). Nas 207 amostras foram identificadas 20 espécies da subfamília Tetranychinae nos diferentes locais e hospedeiros inspecionados (Tabela 1.2).

Tabela 1.2. Espécies de ácaros tetraniquídeos da subfamília Tetranychinae coletadas no Brasil, no período de 10/2004 a 07/2008, com o número de locais, hospedeiros e coletas realizadas para cada espécie.

Espécie	Nº de locais	Nº de hospedeiros	Nº de coletas
1. <i>Eutetranychus banksi</i> (McGregor, 1914)	10	10	13
2. <i>Eotetranychus tremae</i> De Leon, 1957	1	1	1
3. <i>E. smithi</i> Pritchard & Baker, 1955	1	1	1
4. <i>Mononychellus planki</i> (McGregor, 1950)	18	5	26
5. <i>M. tanajoa</i> (Bondar, 1938)	17	4	23
6. <i>Oligonychus anonae</i> Paschoal, 1970	1	1	1
7. <i>O. ilicis</i> (McGregor, 1917)	1	1	1
8. <i>O. mangiferus</i> (Rahman & Saprà, 1940)	2	3	3
9. <i>O. aff. mangiferus</i>	1	1	1
10. <i>Panonychus ulmi</i> (Koch, 1836)	1	1	1
11. <i>Tetranychus abacae</i> Baker & Pritchard, 1962	1	1	1
12. <i>T. bastosi</i> Tuttle, Baker & Sales, 1977	4	5	5
13. <i>T. desertorum</i> Banks, 1900	15	11	19
14. <i>T. evansi</i> Baker & Pritchard, 1960	1	2	2
15. <i>T. gloveri</i> Baker & Pritchard, 1962	1	1	1
16. <i>T. ludeni</i> Zacher, 1913	15	10	20
17. <i>T. mexicanus</i> (McGregor, 1950)	14	12	23
18. <i>T. neocaledonicus</i> André, 1933	4	5	5
19. <i>T. ogmophallos</i> Ferreira & Flechtmann, 1997	1	1	1
20. <i>T. urticae</i> Koch, 1836	53	32	99

* Os números das colunas não somam as 207 coletas devido a repetições de hospedeiros em alguns locais.

A presença de mais de uma espécie de Tetranychidae em um mesmo hospedeiro e localidade, muitas vezes em uma mesma folha, foi observada em diversas amostras, havendo a sobreposição de espécies de tetraniquídeos, inclusive daquelas do gênero *Tetranychus* (ANEXO 1.2). Infestações mistas

foram constatadas, por exemplo, em feijão (*T. urticae* e *E. banksi*; *T. urticae* e *Mononychellus planki*; *T. urticae*, *T. ludeni* e *T. desertorum*; *T. desertorum* e *M. planki*; ou ainda, *T. ludeni* e *M. planki*); em soja (*T. urticae* e *M. planki*; *T. urticae* e *T. desertorum*; *T. urticae*, *T. desertorum* e *M. planki*; *T. ludeni* e *M. planki* e *T. desertorum* e *M. planki*); em algodão (*T. urticae* e *M. planki*; *T. ludeni* e *M. planki* e; *T. ludeni* e *T. mexicanus*); em quiabo (*T. neocaledonicus* e *M. planki*); e berinjela (*T. urticae* e *M. tanajoa*). Outro exemplo de sobreposição de espécies ocorreu em uva, no município de Pirapora, onde foram encontradas populações de *T. mexicanus*, *P. ulmi*, *O. aff. mangiferus* e uma nova espécie do gênero *Oligonychus*. Aspectos da coexistência de espécies de ácaros fitófagos em um mesmo hospedeiro foi relatada por Foott (1962, 1963). A freqüente ocorrência de infestações mistas nos levantamentos de ácaros da família Tetranychidae reforça a necessidade de se aumentar o tamanho da amostra a ser inspecionada e o número de espécimes de cada amostra a serem identificados, visando obter uma maior representatividade da acarofauna. Isto pode elevar a probabilidade de identificar todas as espécies de tetraniquídeos presentes em um determinado hospedeiro/localidade.

1.3.1. Novos hospedeiros para os ácaros da família Tetranychidae no Brasil, América do Sul e no mundo

Foram encontrados novos hospedeiros para 11 espécies de ácaros tetraniquídeos - *E. banksi*, *M. tanajoa*, *O. anonae*, *O. mangiferus*, *T. bastosi*, *T. desertorum*, *T. evansi*, *T. ludeni*, *T. mexicanus*, *T. neocaledonicus* e *T. urticae*. A relação de novos hospedeiros, por espécie de ácaro, encontra-se a seguir, ordenada por família da planta hospedeira.

***Eutetranychus banksi* (McGregor, 1914)**

(Tetranychinae Berlese, Eurytetranychini Reck)

Tetranychus banksi, McGregor, 1914. Hospedeiro tipo: *Ricinus communis* L.
Local tipo: Orlando, Flórida, Estados Unidos.

Fabaceae

- *Acacia* sp. (acácia), Universidade Federal Rural de Pernambuco, UFRPE, Recife, Pernambuco, 11.VIII.2006.
- *Mucuna aterrima* Holland (mucuna preta), Instituto Agronômico de Campinas, ICA, Campinas, São Paulo, 10.I.2006.
- *Phaseolus lunatus* L. (feijão de lima), Embrapa Hortaliças, Gama, Distrito Federal, 07.XII.2005.

A ocorrência de *E. banksi* em *Acacia* sp. já havia sido registrada na Colômbia (Ureta 1975), o registro no estado de Pernambuco é o primeiro para o Brasil.

Este é o primeiro relato de ocorrência de *E. banksi* em *M. aterrima* na America do Sul. McGregor (1914) descreveu *E. banksi* de *M. pruriens* nos Estados Unidos da América e Livshits & Salinas-Croche (1968) registraram a presença desse tetraniquídeo sobre *Mucuna* sp. em Cuba.

Infestações de *E. banksi* sobre *P. lunatus* foram relatadas no Havaí por Garret *et al.* (1967), sendo encontradas pela primeira vez nesse hospedeiro na America do Sul.

Magnoliaceae

- *Michelia champaca* L. (magnólia amarela), Faculdade da Terra, Recanto das Emas, Distrito Federal, 28.XI.2005.

Passifloraceae

- *Passiflora edulis* Sims (maracujá azedo), Lagoa Grande, Minas Gerais, 07.IV.2006.

Michelia champaca e *P. edulis* são novos hospedeiros de *E. banksi*.

Mononychellus tanajoa (Bondar, 1938)
(Tetranychinae Berlese, Tetranychini Reck)

Tetranychus tanajoa Bondar, 1938. Hospedeiro tipo: *Manihot utilissima* e *M. aipim*. Local tipo: Bahia, Brasil.

Fabaceae

- *Phaseolus vulgaris* L. (feijão), Vargem Bonita, Núcleo Bandeirantes, Distrito Federal, 23.XI.2005.

É o primeiro relato de *M. tanajoa* infestando feijão (*P. vulgaris*) em condições de campo. Essa espécie de ácaro tem como principais hospedeiros espécies do gênero *Manihot*. Entretanto, a sua ocorrência foi relatada em outras plantas da família Euphorbiaceae, e também em espécies de Asteraceae, Caesalpiniaceae, Curcubitaceae, Passifloraceae, Malvaceae, Rubiaceae e Solanaceae, em diversos Estados da região Nordeste do Brasil (Tuttle *et al.* 1977; Moraes *et al.* 1995). Outras plantas da família Fabaceae foram citadas como hospedeiras de *M. tanajoa* no Brasil (*Canavalia brasiliensis* Mart. ex Benth., *Macroptilium martii* Benth) (Moraes *et al.* 1995), na América Central e México, como, *Erythrina* sp.; *Gliricidia maculata* Kunth; *Gliricidia sepium* (Jacq.) Kunth (Migeon & Darkeld 2006).

Passifloraceae

- *Passiflora edulis* Sims (maracujá amarelo), Faculdades Integradas da União Pioneira de Integração Social, UPIS, Planaltina, Distrito Federal, 06.XII.2005.

A população de *M. tanajoa* encontrada sobre *P. edulis* (maracujá amarelo) no Distrito Federal representa o primeiro relato nesse hospedeiro. Entretanto, presença de *M. tanajoa* sobre *Passiflora cincinnata* Mart., espécie

de maracujá silvestre, não comercial, conhecida como maracujá mochila ou maracujá do mato, foi anteriormente registrada por Moraes *et al.* (1995) na região Nordeste.

Destaca-se que ao lado das plantas de maracujá (*P. edulis*) e próximo àquelas de feijão (*P. vulgaris*) em que foram detectadas infestações de *M. tanajoa*, observou-se uma plantação de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz), principal hospedeiro desse ácaro, altamente infestada por essa espécie. De acordo com Moraes *et al.* (1995), quando as populações de *M. tanajoa* estão elevadas nos plantios de mandioca, essa espécie pode infestar temporariamente hospedeiros alternativos, dispersando-se pelo vento até alcançar a vegetação mais próxima.

***Oligonychus anonae* Paschoal, 1970**

(Tetranychinae Berlese, Tetranychini Reck)

Oligonychus anonae Paschoal, 1970. Hospedeiro tipo: *Annona muricata* L.,
Local tipo: Jaboticabal, Brasil.

Annonaceae

- *Annona squamosa* L. (fruta-do-conde ou pinha), área do Projeto Jaíba, Mucambinho, Minas Gerais, 08.IV.2006.

Essa espécie também ocorre em São Paulo em graviola (*A. muricata*) (Annonaceae) (Paschoal 1970) sendo o relato em fruta-do-conde, *A. squamosa*, em Minas Gerais, o primeiro para o mundo. De acordo com Paschoal (1970a) *O. anonae* também foi coletado em plantas de Lauraceae (*Persea americana* Mill.) e Vitaceae (*Vitis vinifera* L.) no Brasil.

Oligonychus mangiferus (Rahman & Saprà, 1940)

(Tetranychinae Berlese, Tetranychini Reck)

Paratetranychus mangiferus Rahman & Saprà, 1940. Hospedeiro tipo: *Mangifera indica* L. Local tipo: Paquistão.

Euphorbiaceae

- *Ricinus communis* L. (mamona), BR 040, km 40, Luziânia, Goiás, 19.XII.2005.

Punicaceae

- *Punica granatum* L. (romã), Recanto Novo, Minas Gerais, 13.V.2006.

Rubiaceae

- *Mussaenda* sp. (mussaenda rosa), Recanto Novo, Minas Gerais 13.V.2006.

Trata-se do primeiro relato de *O. mangiferus* em mamona e romã na região Neotropical. Foi citado anteriormente nesses hospedeiros na Índia (Gupta 1976, Gupta & Gupta 1994).

Uma planta do gênero *Mussaenda* L. é relatada pela primeira vez como hospedeira de *O. mangiferus*.

Tetranychus bastosi Tuttle, Baker & Sales, 1977

(Tetranychinae Berlese, Tetranychini Reck)

Tetranychus (Tetranychus) bastosi Tuttle, Baker & Sales, 1977. Hospedeiro: *Morus rubra* L. Local tipo: Crato, Brasil.

Malvaceae

- *Gossypium barbadense* L. (algodão silvestre), Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais – EPAMIG, Nova Porteirinha, Minas Gerais, 10.IV.2006.

Refere-se ao primeiro relato de *T. bastosi* em algodão (*G. barbadense*). Até o presente momento, a presença desse ácaro em Malvaceae havia sido citada apenas para malva (*Malva rotundifolia* L.) (Tuttle *et al.* 1977).

Tetranychus desertorum Banks, 1900
(Tetranychinae Berlese, Tetranychini Reck)

Tetranychus desertorum Banks, 1900. Hospedeiro tipo: *Larrea tridentata* J. M. Coult, *Phacelia crenulata* Torr. ex S. Watson. Local tipo: Mesilla, Estados Unidos da América.

Fabaceae

- *Mucuna aterrima* Holland (mucuna preta), Instituto Agronômico de Campinas, ICA, Campinas, São Paulo, 10.I.2006.

Baker & Pritchard (1962) relataram a presença de *T. desertorum* sobre *M. pruriens* na América Central, sendo *M. aterrima* um novo hospedeiro da família Fabaceae registrado para *T. desertorum* na América do Sul.

Magnoliaceae

- *Michelia champaca* L. (magnólia amarela), Faculdade da Terra de Brasília, Recanto das Emas, Distrito Federal, 28.XI.2005 e Universidade Federal de Lavras, Lavras, Minas Gerais, 06.V.2006.

Michelia champaca é novo hospedeiro para *T. desertorum*.

Solanaceae

- *Solanum melongena* L. (berinjela), Faculdade da Terra, Recanto das Emas, Distrito Federal, 28.XI.2005.
- *Solanum gilo* Raddi (jiló), Pipiripau, Planaltina, Distrito Federal, 22.XI.2005 e Sítio Caturra, Vale do Ribeira, Miracatu, São Paulo, 16.I.2006. Sítio Caturra, Miracatu, Vale do Ribeira, São Paulo, 16.I.2006.

O registro de *T. desertorum* em berinjela no Distrito Federal é o primeiro para a América do Sul. A ocorrência de *T. desertorum* em *S. melongena* foi registrada por Ehara (1956) no Japão. Em Solanaceae, no Brasil, infestações de *T. desertorum* foram registradas em *Acnistus cauliflorus* (Flechtmann 1967); *Brugmansia suaveolens* (Furtado *et al.* 2006); *Brunfelsia sp.* (Flechtmann 2004); *Lycopersicon esculentum* (Flechtmann 1967) e *Solanum tuberosum* (Paschoal 1970a).

Solanum gilo é relatado como novo hospedeiro de *T. desertorum*.

***Tetranychus evansi* Baker & Pritchard, 1960**

(Tetranychinae Berlese, Tetranychini Reck)

Tetranychus evansi Baker & Pritchard, 1960. Hospedeiro tipo: *Lycopersicon esculentum* L.. Local tipo: Ilha Maurício (Oceano Índico)

Caricaceae

- *Carica papaya* L. (mamão), Fazenda Mumbecas, Recife, Pernambuco, 11.VIII.2006.

Tetranychus evansi foi originalmente descrito de exemplares coletados em *L. esculentum* Mille na Ilha Maurício em 1960 (Baker & Pritchard 1960). Entretanto, esse ácaro já havia sido encontrado no Brasil por Silva (1954) que o descreveu como *T. marianae* McGregor. Desde então, foi relatado nos Estados Unidos (Bolland *et al.* 1998) e, mais recentemente, na África, Argentina, China Espanha, França, Grécia, Israel, Itália, Porto Rico, Portugal e Taiwan (Migeon & Dorkeld 2006). Até o momento, *T. evansi* foi relatado em 93 espécies de hospedeiros (Migeon & Dorkeld 2006) estando assinalado principalmente em plantas da família Solanaceae (Bolland *et al.* 1998; Moraes *et al.* 1987). Na Europa, foram relatadas grandes infestações em plantas de várias famílias (Ferragut & Escudero 1999), no entanto, não há relatos sobre a biologia de *T. evansi* a não ser em tomateiro.

A sua presença em folhas de mamão (*C. papaya*) em Pernambuco é a primeira ocorrência nesse hospedeiro.

***Tetranychus ludeni* Zacher, 1913**
(Tetranychinae Berlese, Tetranychini Reck)

Tetranychus ludeni Zacher, 1913 (Zacher 1913¹ *apud* Pritchard & Baker 1955).
Hospedeiro tipo: *Cucurbita* sp., *Salvia splendens* Ker Gawl. Local tipo: St. Cloud (próximo a Paris), França.

Cucurbitaceae

- *Citrullus lanatus* (Thunb.) Matsum & Nakai (melancia), Embrapa Roraima, Boa Vista, Roraima, 29.III.2005, 12.III.2005 e 30.III.2005.

Geraniaceae

- *Pelargonium hortorum* L. H. Bailey (gerânio), Patos de Minas, Minas Gerais, 19.XII.2005.

Rosaceae

- *Prunus domestica* L. (ameixa), Universidade Federal de Lavras, Lavras, Minas Gerais, 09.V.2006.

A ocorrência de *T. ludeni* em *C. lanatus*, *P. hortorum* e *P. domestica* foi registrada anteriormente na África, América Central (El Salvador), Austrália e Índia (Meyer & Ryke 1959; Davis 1968; Andrews & Poe 1980; Gutierrez & Schicha 1983; Gupta & Gupta 1994), sendo o primeiro relato para a América do Sul, nesses hospedeiros.

Rutaceae

- *Citrus limonia* L. (limão-cravo), Universidade Federal de Lavras, Lavras, Minas Gerais, 09.V.2006.

¹ Zacher, F.(1933). Übersicht der deutschen Spinnmilben. *Mitteilungen aus dem Zoologischen Museum in Berlin*, 19, 584-589.

Citrus limonia é relatado pela primeira vez como hospedeiro de *T. ludeni*.

Tetranychus mexicanus (McGregor, 1950)
(Tetranychinae Berlese, Tetranychini Reck)

Tetranychus mexicanus, (McGregor, 1950), Hospedeiro tipo: *Citrus sinensis* L.
Local tipo: México.

Fabaceae

- *Erythrina indica* Lam. (folhagem brasileira), Três Marias, Minas Gerais, 09.IV.2006.

Esse é o primeiro registro de *T. mexicanus* infestando a planta ornamental *E. indica* na América do Sul. De acordo com Migeon & Dorkeld (2006), *T. mexicanus* infesta os seguintes hospedeiros da família Fabaceae: *Arachis hypogaea* L., *Bauhinia* sp., *Centrosema pubescens* Benth, *Crotalaria retusa* L., *Erythrina poeppigiana* O. F. Cook e *Phaseolus vulgaris* L.

Vitaceae

- *Vitis vinifera* L. (uva), Pirapora, Minas Gerais, 12.IV.2006.

Trata-se do primeiro relato de *T. mexicanus* em plantas da família Vitaceae.

Tetranychus neocaledonicus André, 1933
(Tetranychinae Berlese, Tetranychini Reck)

Eotetranychus neocaledonicus André, 1933. Hospedeiro tipo: *Gossypium* sp.
Local tipo: Nova Caledonia (Oceano Pacífico Ocidental Sul).

Lamiaceae

- *Ocimum basilicum* L. (manjerição), Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia - Cenargen, Brasília, Distrito Federal, 23.VII.2006.

Moraceae

- *Morus rubra* L. (amora), SQS 202 Sul, Brasília, Distrito Federal, 23.VI.2008

Solanaceae

- *Cestrum intermedium* Sendtn. (dama-da-noite), Recanto Novo, Minas Gerais, 13.V.2006

Cestrum intermedium, *O. basilicum* e *M. rubra* são novos hospedeiros para *T. neocaledonicus* no mundo. Entretanto, a presença de *T. neocaledonicus* em *Cestrum* sp. foi relatada no estado do Rio de Janeiro (Flechtmann 1981). Outras espécies de plantas pertencentes aos gêneros *Ocimum* e *Morus* (*O. sanctum* L., *M. alba* L., *M. australis* Poir, *M. indica* L., *M. nigra* L., *M. sp.*) foram registrados anteriormente como hospedeiras de *T. neocaledonicus* em Cuba, Índia, Japão e Tailândia (Livshits & Salinas-Croche 1968; Baker 1975; Gupta 1992; Gupta & Gupta 1994; Ehara & Yamaguchi 2001).

***Tetranychus urticae* Koch, 1836**

(Tetranychinae Berlese, Tetranychini Reck)

Tetranychus urticae Koch, 1836. (Koch 1836¹ *apud* Pritchard & Baker 1955).
Hospedeiro tipo: *Urtica* sp. Local tipo: Regensburg, Alemanha.

Asteraceae

- *Ambrosia polystachya* DC. (cravo-da-roça, losna-do-mato), Itaqui, Rio Grande do Sul, 29.IX.2007.

¹ Koch, C. L. (1836). Deutschlands Crustaceen Myriapoden und Arachniden, 1:8.

- *Parthenium* sp. (partenium), Universidade Federal de Santa Maria, Rio Grande do Sul, 26.IX.2007.

Paschoal (1970a) constatou a presença de *T. urticae* em *Ambrosia trifida* L. (erva-de-Santiago) no estado de São Paulo, sendo *A. polystachya* coletada no Rio Grande do Sul um novo hospedeiro relatado para *T. urticae* no Brasil.

O primeiro relato de *T. urticae* sobre *Parthenium* sp. foi feito por Gupta & Gupta (1994) na Índia. A constatação de infestações em *Parthenium* sp. no Rio Grande do Sul, Brasil, representa o primeiro relato nesse hospedeiro para o novo mundo.

Bignoniaceae

- *Pyrostegia venusta* Miers (cipó-de-São-João), Universidade Federal de Lavras, Lavras, Minas Gerais, 09.V.2006.

Trata-se da primeira constatação de *T. urticae* infestando *Pyrostegia*, cipó-de-São-João (Bignoniaceae) no Brasil. Infestações de *T. urticae* em *Pyrostegia ignea* C. Presl. foram descritas, anteriormente, por Vargas *et al.* (1996) na Costa Rica.

Fabaceae

- *Phaseolus lunatus* L. (feijão-de-lima), Embrapa Hortaliças, Gama, Distrito Federal, 07.XII.2005.
- *Macroptilium atropurpureum* (L.) (siratro), Fazenda Caliman, Cruz das Almas, Bahia.

Infestações de *T. urticae* sobre *P. lunatus* foram relatadas nos Estados Unidos da América, Índia e Tailândia (Reeves 1963; Gupta & Gupta 1994; Ho *et al.* 1997), sendo *P. lunatus* um novo hospedeiro de *T. urticae* na América do Sul.

A presença de *T. urticae* em siratro (*M. atropurpureum*) foi constatada na Grécia (Hatzinikolis 1969), sendo a sua ocorrência em Cruz das Almas, Bahia, o primeiro registro para a América do Sul.

Passifloraceae

- *Passiflora edulis* Sims (maracujá amarelo), Embrapa Roraima, Boa Vista, Roraima, 17.V.2007.

O registro de *T. urticae* na cultura do maracujá (*P. edulis*) no Brasil é desconhecido, sendo essa a primeira constatação na cultura. *Tetranychus urticae* em maracujá (*P. caerulea* L. e *P. edulis*) foi anteriormente relatado na Venezuela (Doreste 1967) e na Austrália (*Passiflora* sp.) (Gutierrez & Schicha 1983).

Poaceae

- *Triticum aestivum* L. (trigo), Embrapa Trigo, Passo Fundo Rio Grande do Sul, 27.IX.2006.

A ocorrência de *T. urticae* em trigo, no Rio Grande do Sul, Brasil, representa o primeiro registro nesse hospedeiro no novo mundo. A primeira infestação de *T. urticae* em plantios de trigo (*Triticum* sp.) foi registrada na Grécia (Hatzinikolis 1969).

Zingiberaceae

- *Alpinia purpurata* K. Schum (alpínia), Faculdade da Terra de Brasília, Recanto das Emas, Distrito Federal, 28.XI.2005.

É o primeiro registro de *T. urticae* sobre alpínia (*A. purpurata*) no mundo. O primeiro relato em Zingiberaceae ocorreu na Índia em cúrcuma (*Curcuma longa* L.), planta utilizada como especiaria na fabricação do *curry* (Gupta & Gupta 1994).

Os resultados para a coleta realizada, em caráter excepcional, no Uruguai indicaram a presença em um novo hospedeiro para o ácaro rajado, *T. urticae*, conforme o relato abaixo.

Verbenaceae

- *Lantana camara* L. (Cambará-de-cheiro), Rio Negro, San Javier, Uruguai, 06.VI.2007.

A presença de *T. urticae* em *L. camara* no Uruguai representa o primeiro registro nessa planta hospedeira na América do Sul. Registros anteriores de *T. urticae* sobre *L. camara* são dos Estados Unidos e Índia (Thewke & Enns 1969; Gupta & Gupta 1994).

1.3.2. Novas localidades de ocorrência para espécies de Tetranychidae no Brasil

As localidades de coleta dos ácaros tetraniquídeos no Brasil obtidas durante os levantamentos realizados no período de 2004 a 2008 (Tabela 1.2), podem ser visualizadas nos mapas das Figura 1.12.A. (*Eutetranychus banksi*, *Eotetranychus tremae*, *E. smithi*, *Monoceronychus* n. sp. 1, *Oligonychus anonae*, *O. llicis*, *O. mangiferus*, *Oligonychus* n. sp. 1, *Oligonychus* n. sp. 2; *Panonychus ulmi*, *Schizotetranychus* n. sp. 1, *Tetranychus abacae*, *T. bastosi*, *T. evansi*, *T. gloveri* e *T. ogmophallos*) e Figura 1.12.B. (*Mononychellus planki*, *M. tanajoa*, *T. desertorum*, *T. ludeni*, *T. mexicanus*, *T. neocaledonicus* e *T. urticae*).

As coletas foram concentradas nas regiões Sul, Sudeste e Centro-Oeste do Brasil. As espécies *T. abacae*, *T. bastosi* e *T. ogmophallus* restringiram-se às localidades amostradas entre os paralelos 15°S e 18°S, o que corresponde a região Norte de Minas Gerais, Goiás e Distrito Federal. *Tetranychus neocaledonicus* e *O. mangiferus* foram coletados entre os

paralelos 14°S e 20°S, no estado de Minas Gerais e no Distrito Federal. As demais espécies (*M. planki*, *T. desertorum*, *T. ludeni*, *T. mexicanus*, *T. urticae*) foram encontradas em maior ou menor número em todas as regiões do Brasil (Figuras 1.12A e 1.12B).

Novas localidades de ocorrência foram registradas para *Eotetranychus tremae*, *O. anonae*, *T. gloveri*, *P. ulmi*, e *E. smithi*. Essa última espécie é relatada pela primeira vez no Brasil.

***Eotetranychus tremae* De Leon, 1957**

(Tetranychinae Berlese, Tetranychini Reck)

Eotetranychus tremae De Leon, 1957. Hospedeiro tipo: *Trema floridanum*.

Local tipo: Coral Gables, Estados Unidos da América

Eotetranychus tremae é relatado em Viçosa, Minas Gerais, infestando a planta ornamental *Acalypha* sp. Relatos anteriores no Brasil foram registrados nos estados do Rio de Janeiro (Flechtmann 1981) e São Paulo (Flechtmann 2004; Daud & Feres 2005; Feres *et. al.* 2005).

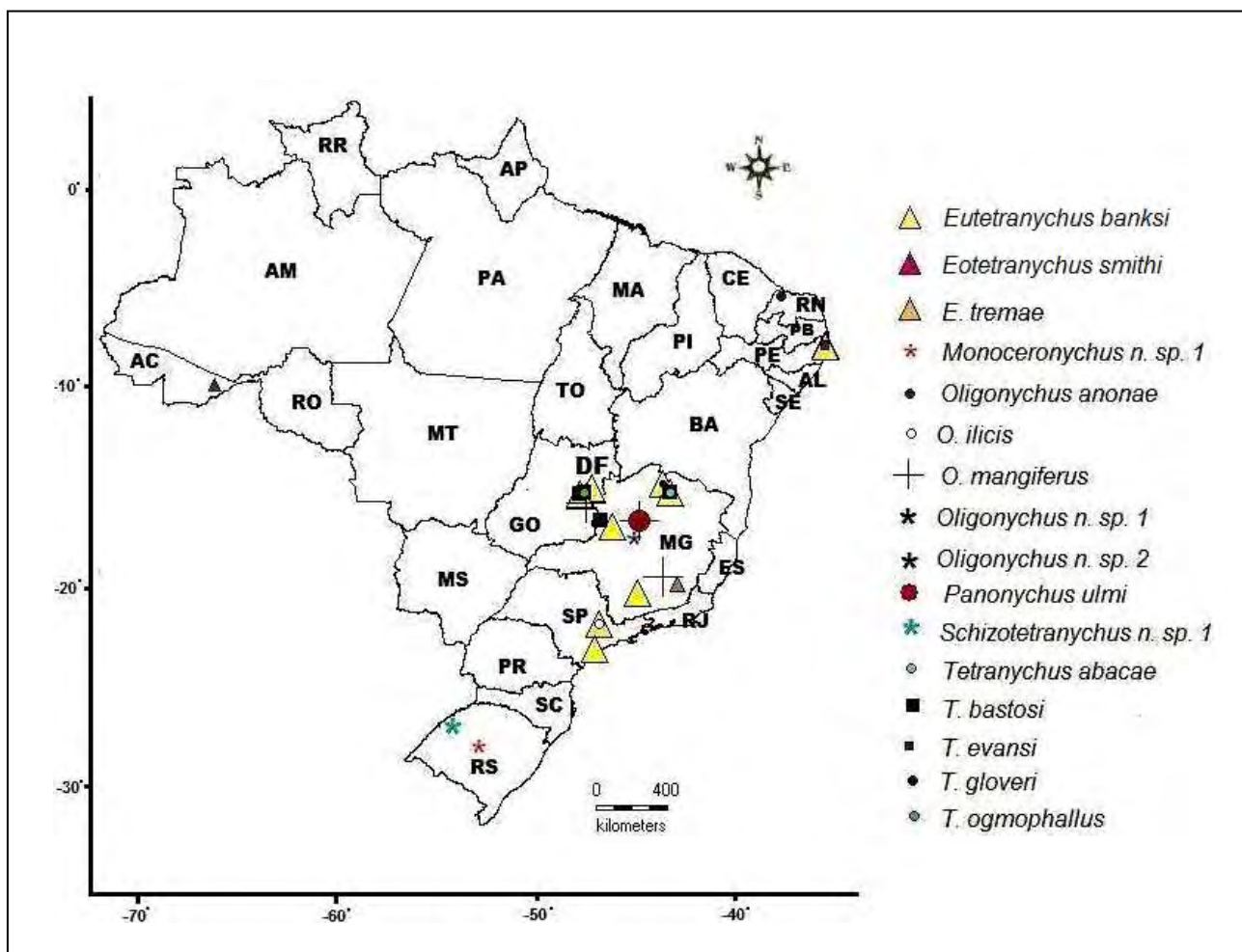


Figura 1.12. A. Espécies de ácaros tetraniquídeos coletados no Brasil no período de outubro de 2004 a julho de 2008.

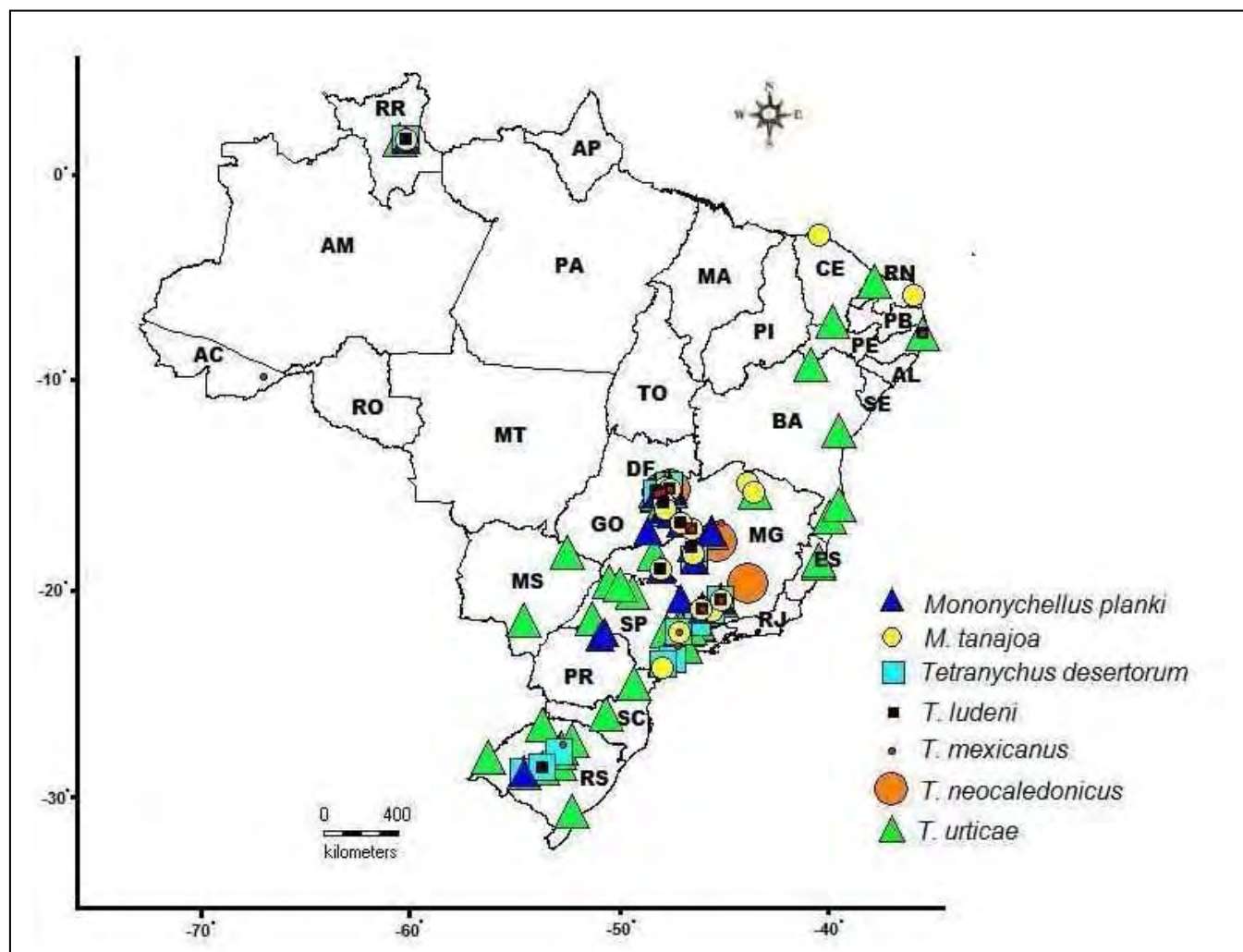


Figura 1.12. **B.** Espécies de ácaros tetraniquídeos coletados no Brasil no período de outubro de 2004 a julho de 2008.

***Eotetranychus smithi* Pritchard & Baker, 1955**

(Tetranychinae Berlese, Tetranychini Reck)

Eotetranychus smithi Pritchard & Baker, 1955. Hospedeiro tipo: *Rosa* sp., *Rubus phoenicolasius*. Local tipo: Maryland, Estados Unidos da América

Eotetranychus smithi (Figura 1.13) é novo registro para o Brasil e representa a primeira ocorrência na América do Sul (Figura 1.14). Os exemplares, machos e fêmeas, foram coletados em rosas, *Rosa* sp., por Denise Navia e Patrícia Drumond no município de Rio Branco, Acre, em 26.V.2008, nas imediações da Embrapa Acre (latitude 9°58'18.49" Sul e longitude 67°49'5.74" Oeste). Até o presente, *E. smith* tinha sido relatado na América do Norte, África e Ásia (Bolland *et al.* 1998; Migeon e Dorkeld 2006).

Essa espécie foi originalmente descrita por Pritchard e Baker (1955) a partir de exemplares coletados em *Rosa* spp. e *Rubus phoenicolasius* Maxim nos Estados Unidos da América. Posteriormente, foi encontrada em Madagascar e Ilhas Seychelles (África), China, Filipinas, Japão, Coreia e Taiwan (Ásia) (Bolland *et AL.* 1998; Migeon & Dorkeld 2006).

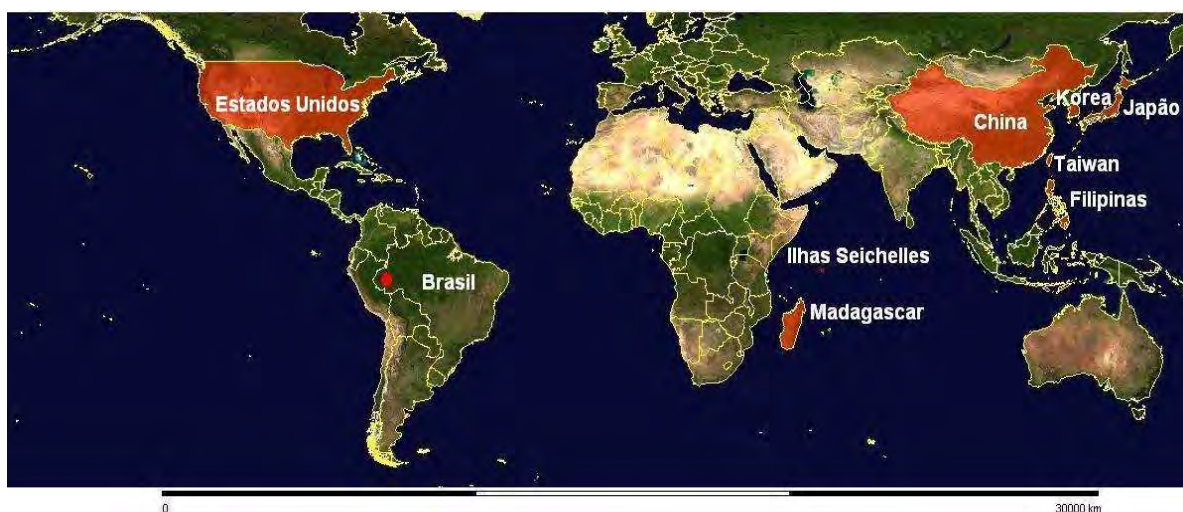


Figura 1.14. Mapa de distribuição do ácaro *Eotetranychus smithi* Pritchard & Baker (Tetranychidae), com a indicação da sua presença na região Norte do Brasil no município de Rio Branco, Acre, primeiro relato para a América do Sul. 2008.

■ Países onde *Eotetranychus smithi* está presente.



Figura 1.13. *Eotetranychus smithi* Pritchard & Baker, 1955. Macho, aedeagus.

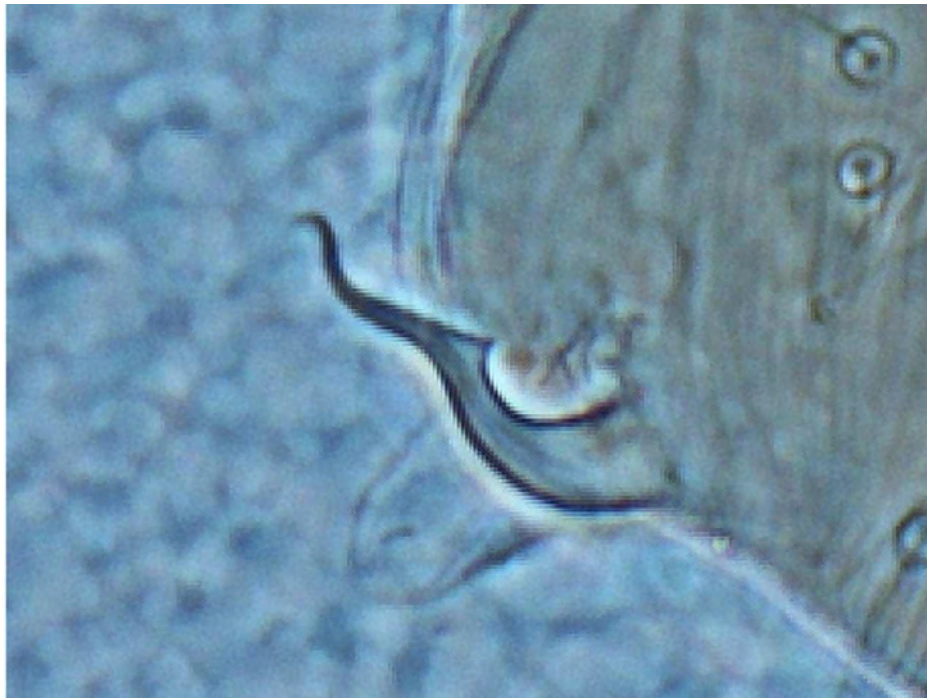


Figura 1.15. *Oligonychus* n. sp. 2. Macho, aedeagus

***Oligonychus anonae* Paschoal, 1970**

(Tetranychinae Berlese, Tetranychini Reck)

Oligonychus anonae Paschoal, 1970. Hospedeiro tipo: *Annona muricata* L., *Persea americana* Mill., *Vitis vinifera* L. Local tipo: Brasil

Essa espécie foi descrita por Paschoal (1970, 1970a) a partir de exemplares coletados em graviola (*Annona muricata*) no estado de São Paulo. Sua presença no Norte de Minas Gerais, no Município de Mocambinho, representa uma nova localidade para a espécie no Brasil.

***Tetranychus gloveri* Banks, 1900**

(Tetranychinae Berlese, Tetranychini Reck)

Tetranychus gloveri Banks, 1900. Hospedeiro tipo: *Gossypium hirsutum* L..
Local tipo: Baton Rouge, Estados Unidos da América

Tetranychus gloveri foi relatado em feijão na Bahia (Bondar, 1930) e em mamão (local não especificado) (Migeon & Dorkeld 2006), sendo a sua constatação em mamão (*Carica papaya* L.) no estado do Rio Grande do Norte, uma nova localidade para essa espécie.

Panonychus ulmi, (Koch, 1836)
(Tetranychinae Berlese, Tetranychini Reck)

Tetranychus ulmi, Koch, 1836. Koch (1836). Hospedeiro tipo: *Ulmus sp.* Local tipo: Regensburg, Alemanha.

A ocorrência do ácaro vermelho europeu, *P. ulmi*, em videiras (*Vitis vinifera* L.) foi relatada pela primeira vez no Brasil em 2008, quando foram observados os primeiros danos desse ácaro nos plantios do Rio Grande do Sul (Ferla & Botton 2008). O registro de *P. ulmi* infestando videiras em Pirapora, Minas Gerais, constitui o segundo relato desse ácaro em uva no país.

De acordo com Ferla & Botton (2008) o ataque de *P. ulmi* em videiras causou bronzeamento com folhas avermelhadas na face adaxial. O vinhedo apresentou queda prematura de folhas. Embora o dano não tenha sido quantificado, as lesões produzidas por *P. ulmi* provocaram menor atividade fotossintética na pós-colheita, reduzindo o acúmulo de reservas na entressafra.

A primeira constatação de *P. ulmi* no Brasil foi feita por Flechtmann (1967a), que o encontrou em frutos de maçã procedentes da Argentina. Em seguida, Bleicher (1974) registrou sua presença em macieiras (*Malus domestica* L.) nos pomares do Sul do país, onde é considerado de importância econômica para a cultura. Na Europa *P. ulmi* é considerada uma praga de videira e sua presença foi registrada na França, Áustria, Portugal, Itália e Grécia (Rambier 1958; Artofer 1976; Carmona & Dias 1980; Girolami & Mozzi 1983; Papaioannou-Souliotis *et al.* 1994). Sua presença foi constatada também no Marrocos e nos Estados Unidos da América (Reeves 1963; Tixier *et al.* 2003).

Destaca-se que, desde a constatação de *P. ulmi* em macieiras no Brasil, em 1967 (Flechtmann, 1967a), sua presença em videiras não havia sido observada, mesmo considerando que esse ácaro causava consideráveis prejuízos nos vinhedos da Europa. Navia *et al.* (1998) levantaram a hipótese de que as populações que atacavam videiras na Europa poderiam ser biótipos distintos daqueles que infestavam macieiras. Moraes & Flechtmann (2008)

enfatazaram a necessidade de atenção para evitar a introdução das populações européias em nosso meio e ressaltaram ser desconhecida a razão pela qual essa espécie não era encontrada em videiras no país. Argumentaram a possibilidade da existência de diferenças biológicas entre as populações do Brasil e aquelas da Europa.

A perspectiva da disseminação de *P. ulmi* em videiras se confirmou no Rio Grande do Sul em 2005/2006 e em Minas Gerais em 2006 com a suspeita de disseminação desse ácaro-praga a partir do comércio interno de material de propagação vegetativa entre esses dois estados.

No momento, não se pode afirmar que as populações coletadas em uva no Rio Grande do Sul (Ferla & Botton 2008) e Pirapora, Minas Gerais, são resultantes de novas introduções no Brasil. Entretanto, a hipótese de introdução de populações européias em nosso país não deve ser descartada, considerando que, decorridos aproximadamente 40 anos da introdução de *P. ulmi* no Brasil, apenas recentemente sua presença foi observada causando danos em videiras. Ferla & Botton (2008) apontaram as seguintes causas para a dispersão de *P. ulmi* no Brasil: proximidade da cultura da maçã com os vinhedos do Sul do país; trânsito de material vegetativo infestado tanto do Brasil, como do exterior e; desequilíbrio dos pomares em razão do uso excessivo de produtos químicos, principalmente os fungicidas não-seletivos.

1.3.3. Novas espécies de ácaros tetraniquídeos (Acari: Tetranychidae) do Brasil

Quatro espécies de tetraniquídeos, novas para a ciência, foram identificadas durante os levantamentos: *Monoceronychus* n. sp. 1 (Bryobiinae Berlese, 1913, Hystrichonychini Pritchard & Baker, 1955), *Oligonychus* n. sp. 1, *Oligonychus* n. sp. 2 (Figura 1.15) e *Schizotetranychus* n. sp. 1 (Tetranychinae Berlese, 1913, Tetranychini Reck, 1950). As informações relativas à localidade, hospedeiro, data de coleta e coletor para essas espécies estão agrupadas na Tabela 1.3.

Tabela .1.3. Informações sobre localidade, hospedeiro, data de coleta e coletor para as quatro novas espécies de tetraníquídeos coletadas no Brasil.

Localidade				Nº	Hospedeiro	Data	Espécie	Coletor
UF	LONG	LAT	Cidade		nome científico, família, nome vulgar			
MG	-44,9419	-17,345	Pirapora	101	<i>Vitis vinifera</i> L. (Vitaceae), uva	12.VI.2006	<i>Oligonychus fileno</i> n. sp.	D. Navia, L. C. Miranda, R. S. Mendonça
MG	-45,2071	-18,2400	Três Marias	123	<i>Rosa</i> sp. (Rosaceae) rosa	09.IV.2006	<i>Oligonychus</i> n. sp. 2	D. Navia, L. C. Miranda, R. S. Mendonça
RS	-54,9613	-28,4085	São Luiz Gonzaga	207	<i>Eustachys disticophylla</i> (Lag.) Nees (Poaceae), capim coqueirinho	13.II.2007	<i>Schizotetranychus</i> n. sp. 1	D. Navia, P. R. V. S. Pereira
RS	-53,7647	-29,6097	Itaara	206	<i>Eustachys disticophylla</i> (Lag.) Nees (Poaceae), capim coqueirinho	08.II.2007	<i>Monoceronychus tchesensis</i> n. sp.	D. Navia, P. R. V. S. Pereira

A descrição de *Oligonychus* n. sp. 1 e *Monoceronychus* n. sp. 1. foi elaborada na forma de um manuscrito, submetido e aceito para publicação à revista científica *International Journal of Acarology*. Esse trabalho foi redigido em língua inglesa e encontra-se no ANEXO 3. As outras duas espécies serão descritas posteriormente.

1.4. CONCLUSÕES

1. Há 35 novos hospedeiros para 11 espécies de tetraniquídeos já conhecidas no Brasil, sendo estas *E. banksi* (5 hospedeiros), *M. tanajoa* (2), *O. anonae* (1), *O. mangiferus* (3), *T. bastosi* (1), *T. desertorum* (4), *T. evansi* (1), *T. ludeni* (4), *T. mexicanus* (2), *T. neocaledonicus* (3) e *T. urticae* (9);

2. Há novas localidades de ocorrência no Brasil para quatro espécies de tetraniquídeos, sendo estas *E. tremae*, *O. anonae*, *T. gloveri* e *P. ulmi*.

3. *Eotetranychus smithi* ocorre no Brasil, em rosa, no Estado do Acre.

4. Quatro espécies de tetraniquídeos coletadas durante o levantamento são novas para a ciência - duas pertencentes ao gênero *Oligonychus* Berlese, em uva (*Vitis vinifera* L.) e rosa (*Rosa* sp.), nos municípios de Pirapora e Três Marias, Minas Gerais, respectivamente; e duas pertencentes aos gêneros *Monoceronychus* McGregor e *Schizotetranychus* Tragardh, ambas em capim coqueirinho (*Eustachys distichophylla* Lag. Nees), nos municípios de Itaara e São Luiz Gonzaga, Rio Grande do Sul, respectivamente.

CAPÍTULO 2

Confiabilidade taxonômica das sequências de DNA em bancos de dados de livre acesso: uma revisão crítica com ácaros *Tetranychus* do grupo *telarius* (Prostigmata: Tetranychidae)

RESUMO

Tem-se observado um problema crescente relacionado a erros de identificação taxonômica em bancos de dados de DNA de livre acesso que ameaça a utilidade das sequências depositadas. Esse assunto tem sido relatado por autores que trabalham com diferentes grupos de organismos, incluindo mamíferos, alguns artrópodes, fungos e bactérias. O impacto de identificações errôneas não é restrito a problemas de sistemática ou filogenética, mas pode também alcançar muitas outras áreas, como a pesquisa em biologia e ecologia, estudos faunísticos, comércio internacional e o manejo integrado de pragas. Nesse trabalho, são apresentadas evidências adicionais de identificações errôneas de ácaros fitófagos do grupo *telarius*, família Tetranychidae, em bancos de dados de DNA. Essas espécies são morfológicamente muito próximas e a sinonímia entre a espécie *T. urticae* Koch e *T. cinnabarinus* (Boisduval) ainda está em discussão. Para essa investigação foram revisados e analisados 99 acessos depositados no GenBank da região ITS2 do rDNA e 96 da região *COI* do *mtDNA*, incluindo *T. urticae*, *T. kanzawai* Kishida, *T. truncatus* Ehara, *T. cinnabarinus*, *T. turkestanii* (Ugarov & Nikolskii), *T. pueraricola* Ehara & Gotoh, *T. neocaledonicus* André e *T. piercei* McGregor, de várias partes do mundo. Adicionalmente, foram incluídas novas sequências ITS2 e *COI* de 18 populações de *T. urticae* do Brasil, França, Espanha e Grécia obtidas nesse estudo. Análises filogenéticas, estudos de sítios polimórficos, distância genética e divergência de nucleotídeos foram os parâmetros utilizados para comparações das sequências de ácaros. Entre as sequências depositadas no GenBank foram identificados numerosos casos de prováveis erros de identidade entre as espécies do grupo *telarius*, especialmente entre *T. urticae*, *T. cinnabarinus*, *T. kanzawai* e *T. truncatus*. As causas mais prováveis para os erros apontados foram discutidas, e sugestões para evitar novos erros durante o delineamento de estudos foram apresentadas.

Palavras chaves: Acari, *Citocromo Oxidase 1*, DNA mitocondrial, DNA ribossômico, erros de identificação, sequências intergênicas transcritas, Tetranychoidea.

Taxonomic reliability of DNA sequences in public DNA databases: a critical review of *Tetranychus* mites of the *telarius* group (Prostigmata: Tetranychidae)

ABSTRACT

There is a growing problem of taxonomic misidentification in public DNA databases which threatens the utility of the deposited sequences. This issue has been highlighted by authors working on different groups of organisms including mamiferous, some arthropods, fungi and bacteria. The impact of misidentifications is not restrict to systematic and phylogenetic problems, but it can reach also many other issues, as in biological and ecological research, faunistic studies, trade between countries and pest management. In this paper, are provide additional evidence of the misidentification in DNA databases by investigating a group of phytophagous mites, named spider mites, with high economic and quarantine importance in the Tetranychidae family: the species belonging to *Tetranychus telarius* group. These species are morphologically very close and the synonym between the species *T. urticae* Koch and *T. cinnabarinus* (Boisduval) still being discussed. To this investigation were reviewed and analyzed 99 GenBank accessions numbers matching ITS2 rDNA sequences and 96 *COI* mtDNA including *T. urticae*, *T. kanzawai* Kishida, *T. truncates* Ehara, *T. cinnabarinus*, *T. turkestanii* (Ugarov & Nikolskii), *T. pueraricola* Ehara & Gotoh, *T. neocaledonicus* André and *T. piercei* McGregor from worldwide. In addition were included new ITS2 and *COI* sequences of 18 *T. urticae* populations from Brazil, France, Spain and Greece obtained in this study. Phylogenetic, polymorphic sites and genetic distance analisys and nucleotide divergence was used for comparisons in mites sequences collection. Among the deposited sequences from GenBank were identified numerous cases of apparent mistaken identity in the *Tetranychus telarius* group, especially between *T. urticae*, *T. cinnabarinus*, *T. kanzawai* and *T. truncatus*. The most probable causes to the indicated errors were discussed and suggestions to avoid mistaken during the design of new studies were proposed.

Key words: Acari, *Cytochrome Oxidase 1*, Internal Transcribed Spacer, misidentification, mitochondrial DNA; ribosomal DNA, Tetranychoidea.

2.1. INTRODUÇÃO

Com o aumento do número de sequências de nucleotídeos depositadas nos bancos de dados moleculares de livre acesso, como o GenBank, observou-se a presença de erros de identificação taxonômica dos exemplares utilizados na obtenção de DNA, o que ameaça a utilidade das sequências disponíveis nos mesmos. Esse assunto tem sido relatado por vários autores que trabalham com diferentes grupos de organismos, incluindo mamíferos e aves (Ruedas *et al.* 2000), alguns artrópodes (Marreli *et al.* 2006), fungos (Sperling *et al.* 1994; Ruedas *et al.* 2000; Vilgalys 2003; Bridge *et al.* 2003) e bactérias (Hugenholtz & Huber, 2003). Em alguns grupos o problema pode tornar-se extremo, como apresentado no estudo de Bridge *et al.* (2003) que estimou que mais de 20% das sequências depositadas em bancos públicos de dados moleculares, para um grupo importante de fungos escolhido aleatoriamente (Helotiales, *Amanita* e *Phoma*), podem estar erradas. Os erros mais comuns decorreram de identificações errôneas do material biológico. Também foram detectados problemas relacionados às técnicas de isolamento do DNA, resultando em falhas de extração e/ou amplificação dos fragmentos do DNA. Outra origem importante de erro foi a divergência entre os taxonomistas no que diz respeito ao uso de caracteres plesiomórficos e homoplásticos na delimitação das espécies baseada em morfologia (Vilgalys 2003; Diéguez-Uribeondo *et al.* 2007).

Esses exemplos concretizam a existência de sequências atribuídas erroneamente nos estudos biológicos e, mais uma vez destaca a necessidade do depósito de material *voucher* em coleções públicas para a conferência dos exemplares (Hawksworth 2004). O impacto de erros de identificação de espécimes e o respectivo depósito das sequências de DNA refletem na confiabilidade de conclusões de estudos filogenéticos, filogeográficos, taxonômicos e ecológicos inferidos a partir dessas sequências (Holst-Jensen *et al.* 2004).

A diversidade dos exemplos indicando a presença de erros nos bancos de dados moleculares sugere que problemas semelhantes podem estar ocorrendo em outros grupos taxonômicos ainda não estudados sob esse aspecto.

Nesse trabalho foi investigado um de grupo de ácaros fitófagos de expressiva importância econômica e quarentenária. A família Tetranychidae está entre as mais importantes e é composta por aproximadamente 1250 espécies distribuídas em 76 gêneros. Entre esses, o gênero *Tetranychus* Dufour, 1832 agrupa 142 espécies

válidas (Migeon & Dorkeld 2008) e inclui muitas espécies de importância agrícola (Moraes & Flechtmann 2008; Jeppson *et al.* 1975) o que o torna o gênero mais estudado dessa família.

Algumas espécies do gênero *Tetranychus*, especialmente aquelas do grupo *Tetranychus telarius* são morfologicamente muito próximas o que dificulta sobremaneira a identificação específica, normalmente realizada a partir do *aedeagus*, estrutura da genitália do macho, que deve ser montada em posição lateral para a identificação específica sob microscópio óptico de contraste de fases. Devido à proximidade morfológica das espécies desse grupo, restam ainda questões sobre a definição de complexos e sinonímias das espécies. No grupo *T. telarius*, o ácaro rajado, *Tetranychus urticae* 1836 Koch é uma espécie altamente polífaga, cosmopolita e é provavelmente a espécie mais estudada do gênero. São reconhecidas duas formas dessa espécie, em função da coloração do corpo, verde ou vermelha. De acordo com De Boer (1985) a cor observada no corpo dos ácaros é resultante de pigmentos presentes na hemolinfa. Entretanto, a forma avermelhada de *T. urticae* é, muitas vezes, denominada *T. cinnabarinus* (Boisduval). A validade do táxon *T. cinnabarinus* (forma avermelhada) foi questionada por muitos autores e ainda hoje é foco de discussões. Pritchard & Baker (1955) consideraram ambos os nomes com sinonímias sob o nome *T. telarius* (= *T. urticae* Koch, 1836). Boudreaux (1956) após a revisão dessas duas espécies manteve a validade do nome *T. cinnabarinus* e separou-as com base no formato dos lobos integumentares dorsais da fêmea. Entretanto, a confiabilidade dos lobos integumentares dorsais como caráter taxonômico foi questionada por Van der Bund & Helle (1960) e por Robson (1961) uma vez que a aparência desses lobos pode ser afetada pelas técnicas de montagem e pelo equipamento óptico utilizado. Mesmo com essa argumentação Boudreaux & Dosse (1963ab) mantiveram a validade do nome. Baker & Tuttle (1994) apresentaram as diferenças morfológicas utilizadas para a distinção de machos e fêmeas de *T. cinnabarinus* e *T. urticae*. De modo geral, a espécie *T. cinnabarinus* não é aceita como válida (Veerman, 1974; Dupont, 1979; Meyer, 1974, 1987, Gotoh & Tokioka, 1996) e não foi mencionada como nome válido no World Catalogue of Spider Mite (Bolland *et al.* 1998), onde é citada como sinonímia de *T. urticae*. Essa mesma conclusão foi confirmada por Ehara (1999) e Hinomoto *et al.* (2001) com base em critérios morfológicos e moleculares. Carbonnelle *et al.* (2007) descreveram os lobos integumentares nas duas formas separadamente (*T. cinnabarinus* e *T.*

urticae) e mostraram que esses lobos não estão sempre presentes ou podem estar incompletos em algumas fêmeas, sugerindo que essas alterações ocorrem provavelmente em função das condições microclimáticas e, portanto, essas estruturas não poderiam ser utilizadas como caráter discriminativo entre essas duas formas (verde e vermelha).

Os dados moleculares são muito importantes para o avanço da sistemática de ácaros (Navajas *et al.* 1996; Navajas *et al.* 1997; Navajas *et al.* 1998., Navajas *et al.* 2001) e podem esclarecer aspectos biológicos e ecológicos do grupo desde que simultaneamente sejam complementados por estudos morfológicos detalhados e precisos. Além do auxílio na diagnose de espécies, as técnicas moleculares são ferramentas importantes na resolução de questões relacionadas à variabilidade intraespecífica (Navajas 1998; Navajas *et al.* 1998, 1999, 2000; Navajas & Fenton 2000; Hinomoto & Takafuji 2001; Tixier *et al.* 2006; Ben-David *et al.* 2007).

Entre os grupos de ácaros fitófagos, o maior número de publicações na área molecular tem focado principalmente as espécies de ácaros da família Tetranychidae (Navajas *et al.* 1998; Tsagkarakou *et al.* 1999; Navajas *et al.* 2000; Hinomoto *et al.* 2001; Takafuji *et al.* 2001; Navajas *et al.* 2002; Osakabe *et al.* 2002; Xie *et al.* 2006; Hinomoto *et al.* 2007; Ros & Breeuwer 2007; Xie *et al.* 2008). Nessa família, as espécies do gênero *Tetranychus* Dufour, 1832 são inquestionavelmente as que detêm mais informações disponíveis acerca das espécies.

A dificuldade na identificação das espécies do gênero *Tetranychus*, especialmente aquelas do grupo *telarius*, pode resultar no registro de dados moleculares incorretos em bancos de dados de livre acesso, conduzindo a inferências filogenéticas inexatas. Outro agravante trata-se das sequências inéditas, ou seja, sequências que foram submetidas diretamente a um banco de dados sem que fossem registradas em um trabalho científico. Esse é o caso de muitas espécies do gênero *Tetranychus* em que mais de 50% das sequências disponíveis não foram publicadas (Ros & Breeuwer 2007). Ocorre também o caso de sequências que foram publicadas, entretanto, os métodos de identificação específica não são mencionados. Hinomoto *et al.* 2007 registrou pela primeira vez problemas de identificação em ácaros tetraniquídeos, indicando 13 sequências depositadas erroneamente no GenBank como *T. urticae* que na verdade representariam espécimes de *T. truncatus*.

Nesse trabalho pretendeu-se explicar a confusão existente entre as sequências depositadas no Genbank considerando todos os acessos disponíveis do grupo *Tetranychus telarius*. Para a realização das análises foram incluídas novas populações de *T. urticae* coletadas no Brasil, França, Espanha, Grécia e Ilhas Canárias que juntamente com as sequências depositadas como *T. cinnabarinus*, *T. truncatus*, *T. kanzawai*, *T. turkestanii*, *T. pueraricola*, *T. piercei*, *T. neocaledonichus* e outras espécies de *Tetranychus* de coloração avermelhada que poderiam estar sendo confundidas com *T. cinnabarinus*, conduzindo a erros de identificação taxonômica. A relação filogenética entre esses táxons foi investigada a partir de sequências Internal Transcribed Spacer (ITS) do DNA ribossômico e Citocromo Oxidase I (*COI*) do DNA mitocondrial. Posteriormente, foi realizado um estudo dos sítios diagnósticos entre as espécies utilizando as sequências ITS. A distância genética foi calculada para as sequências *COI* de *T. cinnabarinus* e a distância entre as espécies do grupo *telarius* foi inferida a partir de sequências ITS e *COI*.

Considerando as divergências que cercam o nome *T. cinnabarinus*, no início do presente trabalho foram analisadas as sequências da região ITS2 do DNA ribossômico e *COI* do DNA mitocondrial, para a espécie *T. cinnabarinus*, depositadas no GenBank em função de sua sinonímia com *T. urticae*, e verificou-se a similaridade entre essas duas espécies. Em seguida, buscou-se comparativamente entre as sequências das espécies do grupo *T. telarius* disponíveis no GenBank aquelas que apresentavam identidade com as sequências depositadas como *T. cinnabarinus*. Foram identificados os problemas e as suas possíveis causas foram discutidas. Sugestões para aumentar a confiabilidade das informações disponíveis nos bancos públicos de dados moleculares e no delineamento de novos estudos foram apresentadas. Acima de tudo, o trabalho buscou ressaltar a importância da identificação taxonômica como ponto de partida para os estudos de biologia molecular e destacar o mérito e o avanço que os dados moleculares conferem à diagnose de espécies e aos estudos filogenéticos e filogeográficos em Tetranychidae.

Considerando a importância econômica das espécies do gênero *Tetranychus*, salienta-se que o impacto de erros de identificação não se restringe a sistemática ou a questões filogenéticas. Esses erros podem afetar também áreas aplicadas, como a biologia, estudos ecológicos e faunísticos, manejo de pragas ou questões de quarentena vegetal, para as quais é requerida uma identificação acurada de

organismos associados a produtos vegetais no comércio entre os países envolvidos em acordos internacionais.

O trabalho referente a esse capítulo foi escrito originalmente em inglês e intitula-se “Taxonomic reliability of DNA sequences in public DNA databases: a critical review on *Tetranychus* mites of the *telarius* group (Prostigmata: Tetranychidae)“, de autoria de R. S. Mendonça, D. Navia, I. R. Diniz e M. Navajas, foi submetido à publicação no periódico *Zoologica Scripta An International Journal of Systematic Zoology*.

OBJETIVOS

O presente trabalho tem como objetivo investigar a aparente confusão que existe em algumas sequências de DNA depositadas no Genbank nos acessos das espécies que compõem o grupo *telarius*

2.2. MATERIAL E MÉTODOS

2.2.1 Amostragens de *Tetranychus urticae*

Dezoito novas sequências das regiões ITS2 (rDNA) e *COI* (mtDNA) de espécimes de *T. urticae* coletados no Brasil (1), França (6), Grécia (1), Espanha (5) e Ilhas Canárias (5) (Tabela 2.1) foram analisadas juntamente com aquelas disponíveis no Genbank para *T. urticae* e para as suas espécies aparentadas. Tanto para aquelas consideradas como sinônimas como *T. cinnabarinus*, como para as que formam o grupo *telarius* de espécies como, *T. truncatus*, *T. kanzawai*, *T. turkestanii*, *T. pueraricola*, *T. piercei*, *T. neocaledonicus* e, ainda, outras espécies de cor avermelhada de *Tetranychus* que, poderiam estar sendo erroneamente identificadas como algumas dessas espécies mencionadas.

Todos os ácaros coletados foram vermelhos, exceto aqueles da Grécia e do Brasil que eram verdes. Em cada localidade, pelo menos, 50 indivíduos foram coletados, preservados em etanol a 100% para as análises moleculares e a 70% para a identificação morfológica. As sequências da região ITS2 foram comparadas e utilizadas para confirmar o diagnóstico específico para as aquelas espécies do grupo *telarius*, cujas sequências foram recolhidas do GenBank.

2.2.2. Identificação morfológica das espécies

Os espécimens acondicionados no etanol a 70% foram montados e preparados no meio Hoyers's. Os caracteres foram observados sob microscópio de contraste de fase e de interferência, com objetivas de 40x e 100x (Leitz Wetzlar e Nikon Eclipse 80i) segundo Pritchard & Baker (1955) e Baker & Tuttle (1994). Para cada população coletada, 25 fêmeas (posição dorso-ventral) e 10 machos (posição lateral) foram montados para a identificação morfológica das espécies. Em algumas amostras poucos machos estavam presentes, o que é comum para certas espécies de Tetranychidae e, nesses casos, todos os machos encontrados na amostra foram preparados.

A identificação morfológica foi feita em todos os indivíduos montados, para cada população. Os caracteres taxonômicos relevantes dos tetraniquídeos foram examinados especialmente a forma do *aedeagus* (genitália do macho) baseando-se

na literatura pertinente (Pritchard & Baker 1955, Meyer 1974, 1987, Baker & Tuttle 1994). Os exemplares montados foram também comparados com os espécimens da Coleção de Referência da Unidade de Acarologia, Laboratório de Quarentena Vegetal, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia (Cenargen) - Embrapa Cenargen.

2.2.3. Extração de DNA

O DNA genômico foi extraído de uma fêmea adulta usando o “DNeasy tissue Kit” (Qiagen, USA), seguindo o protocolo para cultura de células animal. As instruções dos fabricantes foram modificadas para possibilitar a extração do DNA de ácaros, como segue: após a remoção do etanol 100%, 90 µl de solução tampão fosfato (PBS) foi adicionada aos tubos de microcentrifugação de 1,5 ml. Os ácaros permaneceram intactos, ou seja, não foram macerados. No próximo passo, foram adicionadas 10µl de proteinase K, seguida de 100 µL de tampão AL do kit Qiagen e a mistura foi homogeneizada em vortex. Os tubos foram incubados a 70°C por 1-2 horas. Para as etapas seguintes observou-se o protocolo principal da Qiagen, exceto para os volumes recomendados, que foram reduzidos à metade. O DNA foi recuperado dos tubos de microcentrifugação pela adição de 50 µl de água ultrapura na membrana da coluna de mini-spin que integra o kit Qiagen. Após a extração os tubos contendo o DNA foram armazenados a -20°C.

2.2.4. Amplificação por PCR e sequenciamento

Dois fragmentos de DNA foram amplificados e sequenciados por PCR (*Polymerase Chain Reaction*) para cada indivíduo: a região intergênica ITS (18S rRNA, ITS1, 5.8S rRNA, ITS2, do 28S) do DNA ribossômico (cerca de 1200 bp) e um fragmento do gene mitocondrial o *COI* (cerca de 950 bp). As reações de amplificação foram realizadas no volume total de 25 µL contendo: 2,5 µl de tampão 10x fornecido pelo fabricante; 0,13 un/µL (5 unidades) de *Taq* polimerase (Qiagen); 2 µL de dNTP (2,5 mM de cada base); 0,5 µM de cada oligonucleotideo iniciador – *primer* (10 mM); 2 µl de MgCl₂ (25 mM); 15,37 µL ou 13,37 µL de água e 2 µL ou 4µL do DNA genômico a ser amplificado para ITS e *COI*, respectivamente. As amostras foram desnaturadas a 94°C por 3 min e submetidas a 35 ciclos de: 1 min a 94 °C -

desnaturação; 1 min a 51 °C – anelamento; 1,5 min a 72 °C – extensão; finalizando com 72°C por 10 min até o resfriamento (10°C) e retirada das amostras. Os produtos de PCR (5 µl) foram visualizados em gel de agarose corados em solução de brometo dietideo (1%) em solução tampão 0,5x TBE (45mM tris base, 45 mM ácido bórico e 1mM EDTA, ph 8,0).

Na reação de *PCR* foram utilizados os *primers* 18S e 28SC para a região ITS (Navajas *et al.* 1998). Em adição a esses *primers*, dois outros internos foram usados para sequenciar a região completa de ITS (*InternalS* e *InternalSRev*). Estes *primers* foram definidos por parear em regiões altamente conservadas do fragmento ITS, na região 5,8S e 28S (Navajas *et al.* 1994). Os *primers* usados para amplificar o fragmento de *COI* foram os C1J1718 e 773 (Navajas & Boursot 2003). Da mesma forma, dois *primers* adicionais foram utilizados para o sequenciamento do fragmento do *COI*, o IntCOI e o IntCOI/Rev (Tabela. 2.2). Os fragmentos amplificados foram sequenciados diretamente. Cinco indivíduos de cada localidade foram sequenciados e para cada exemplar foi obtido o fragmento ITS e *COI*. Para o sequenciamento de ambos os fragmentos utilizou-se o sequenciador de DNA automático ABI 3700 (*Applied Biosystems*).

Tabela 2.1. Procedência das populações de *Tetranychus urticae* cujas sequencias de DNA foram utilizadas no presente estudo.

Código	País	Localidade	Planta Hospedeira			Latitude	Longitude
			Nome científico	Família	Nome Comum		
REF France	França	Elne	<i>Nerium oleander</i>	Apocynaceae	Espirradeira	42° 35' 57,28" N	02° 57' 59,02" L
6_1 France	França	Elne	<i>Nerium oleander</i>	Apocynaceae	Espirradeira	42° 36' 33,02" N	02° 58' 05,68" L
12_1 France	França	Perpignan	<i>Datura stramonium</i>	Solananceae	Estramônio	42° 42' 05,66" N	02° 53' 38,94" L
8_2_07 Spain	Espanha	S,Susanna/Cami de la Riera	<i>Solanum melongena</i>	Solananceae	Berinjela	41° 38' 26,50" N	02° 43' 00,74" L
24_3 France	França	Saint Nazaire	<i>Datura stramonium</i>	Solananceae	Estramônio	42° 40' 09,61" N	02° 59' 27,44" L
116_2 France	França	La Gaude-Bord du Var	<i>Urtica dioica</i>	Urticaceae	Urtiga	43° 43' 17,95" N	07° 09' 04,98" L
120_1 France	França	Nice-F, Bertaux	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Phabaceae	Feijão	43° 42' 11,45" N	07° 15' 09,13" L
41_2 Spain	Espanha	Vilademuls/Galliners	<i>Lycopersicum sculentum</i>	Solananceae	Tomate	42° 8' 57,084" N	02° 52' 26,26" L
42_1 Spain	Espanha	Bordils/Juià	<i>Lycopersicum sculentum</i>	Solananceae	Tomate	42° 02' 12,70" N	02° 54' 54,18" L
Ej Spain	Espanha	Bordils/Juià	<i>Lycopersicum sculentum</i>	Solananceae	Tomate	42° 02' 12,70" N	02° 54' 54,18" L
43_1 Spain	Espanha	S, Andreu de Llanerres	<i>Solanum nigrum</i>	Solananceae	Erva moura	41° 34' 20,52" N	02° 28' 56,52" L
97_1 Canary	Ilhas Canárias	Santiago del Teide	<i>Musa acuminata</i>	Musaceae	Banana Cavendish	28° 17' 46,04" N	16° 48' 52,26" O
116_2 Canary	Ilhas Canárias	Granadilla de Abona	<i>Lycopersicum sculentum</i>	Solananceae	Tomate	28° 04' 15,32" N	16° 33' 47,38" O
119_2 Canary	Ilhas Canárias	Arico, Playa del Rio	<i>Lycopersicum sculentum</i>	Solananceae	Tomate	28° 10' 39,92" N	16° 28' 45,96" O
119_3 Canary	Ilhas Canárias	Arico, Playa del Rio	<i>Lycopersicum sculentum</i>	Solananceae	Tomate	28° 10' 21,68" N	16° 28' 23,82" O
128_2 Canary	Ilhas Canárias	Agüimes, Playa	<i>Lycopersicum sculentum</i>	Solananceae	Tomate	27° 54' 14,80" N	15° 26' 44,32" O
13_1 Greece	Grécia	Ieraptera	<i>Solanum melongena</i>	Solananceae	Berinjela	35° 01' 22,00" N	25° 44' 35,00" L
175_1 Brazil	Brasil	Recife, Pernambuco	<i>Carica papaya</i>	Caricaceae	Mamão	07° 49' 25,32" S	34° 54' 59,79" O

2.2.5. Conjunto de dados de sequências

O banco de dados foi constituído pelas sequências de ITS e *COI* de *T. urticae* e *T. cinnabarinus* do GenBank mais aquelas novas de *T. urticae* obtidas no presente estudo. A consulta ao GenBank foi realizada em 20 de Março de 2008. Os dados incluem um total de 75 sequências ITS (30 de *T. urticae* 27 de *T. cinnabarinus* do GenBank e 18 desse estudo) e 94 sequências *COI* (48 *T. urticae* e 28 *T. cinnabarinus* do GenBank e 18 do presente estudo). Outras sequências de espécies do grupo *telarius* disponíveis no GenBank foram incluídas neste estudo: *Tetranychus kanzawai* Kishida, 1927 (4 ITS2, 42 *COI*), *T. truncatus* Ehara, 1956 (3 ITS2, 3 *COI*), *T. turkestanii* (Ugarov & Nikolskii, 1937) (6 ITS2, 6 *COI*), *T. pueraricola* Ehara & Gotoh, 1996 (2 ITS2), *T. neocaledonicus* André, 1933 (1 ITS2, 1 *COI*) e *T. piercei* McGregor, 1950 (2 ITS2, 2 *COI*). As espécies de *Tetranychus* de cor avermelhada que poderiam estar sendo confundidas com aquelas do grupo *telarius* também foram incluídas: *T. ludeni* Zacher, 1913 (5 ITS2), *T. evansi* Baker & Pritchard, 1960 (8 ITS2), *T. gloveri* Banks, 1900 (1 *COI*), *T. phaselus* Ehara, 1960 (3 ITS2), *T. ezoensis* Ehara, 1962 (1 ITS2), *T. parakanzawai* Ehara, 1999 (1 ITS2) e *T. okinawanus* Ehara, 1995 (6 ITS2). Todas as sequências, seus números de acesso no GenBank, os nomes específicos, informações sobre planta hospedeira (nome comum e família), localidades das amostras, tamanho dos pares de bases e referências primárias foram anotadas para as regiões ITS (ANEXO 4) e *COI* (ANEXO 5).

Diferentes combinações de *primers* têm sido utilizadas nos vários estudos moleculares com as espécies do gênero *Tetranychus*, o que origina fragmentos de comprimentos heterogêneos do gene sequenciado. Este estudo utilizou o fragmento ITS2 da região ITS com 481 pares de base (pb) para todas as sequências utilizadas na análise. Para as sequências da região mitocondrial foi utilizado um fragmento central de 390 bp no gene *COI*, o qual estava presente no maior número de sequências *COI* disponíveis no Genbank.

Os acessos cujas sequências continham ambiguidades nestas regiões foram excluídos das análises [AF131105 (*T. urticae*), AF131106 (*T. cinnabarinus*), AF131107 e AY750704 (*T. kanzawai*), AF131108 (*T. truncatus*), AF131110 (*T. piercei*)]. A sequência *COI* de *T. gloveri* foi obtida do trabalho original de Navajas *et al.* (1996) e o acesso a X808660 (*T. gloveri*) não foi usado porque era idêntico ao acesso de número X80859 (*T. neocaledonicus*). Após estes ajustes, o alinhamento das sequências foi direto e implicou apenas em poucas inserções/deleções. Quando sequências idênticas foram encontradas, tanto no GenBank quanto nas obtidas nesse estudo, apenas uma foi incluída nos dados e o número de vezes que essas sequências se repetiram foi indicado entre parênteses.

2.2.6. Alinhamento das sequências e análises filogenéticas

As sequências foram alinhadas usando o programa *CLUSTAL W Multiple Alignment* versão 7.09 (Thompson *et al.* 1994) implementado pelo programa BIOEDIT (Hall 1999). A análise filogenética pelo programa MEGA 4 (Kimura 1980; Tamura *et al.* 2007) e a reconstrução filogenética pelo método de *Neighbor Joining* (NJ), que se baseia nas distâncias das sequências calculadas pelo método de correção de Kimura 2-parâmetros (*two-parameter correction method*). Para as análises de robustez de NJ foram utilizadas 10.000 replicações para a determinação dos valores de *bootstrap*. Os sítios polimórficos e o número e a diversidade dos haplótipos¹ foram calculados no programa DnaSP versão 4.50 (Rozas *et al.* 2003). A análise filogenética inferida das sequências ITS2 e *COI* incluiu primeiramente *T. urticae* e *T. cinnabarinus* separadamente. Em seguida, foi realizada análise conjunta dessas duas espécies e, posteriormente, todas as sequências do conjunto de dados (espécies do grupo *telarius* e aquelas de cor avermelhadas) foram incluídas nas análises filogenéticas.

¹ Haplótipo – combinação de polimorfismos do DNA (sequências de nucleotídeos) transmitidos em conjunto para os descendentes; constituição genética de um indivíduo com relação a um dos membros de um par de genes de alelos.

Tabela 2.2. Fragmentos amplificados e *primers* utilizados na reação de *PCR* e no seqüenciamento do DNA dos espécimens de *Tetranychus urticae*.

Fragmento	Comprimento (bp)	Localidade	Referências	Primers	Uso
rDNA	1200	3' of 18S	Ben David <i>et al.</i> 2007	5'-AGAGGAAGTAAAAGTCGTAACAAG-3'	PCR e seqüenciamento
		5' of 28SC	***	5'-ATATGCTTAAATTCAGCGGG-3'	PCR e seqüenciamento
		5.8S-InternS	Navia <i>et al.</i> 2005	5'-GATCACTCGAATTACCAATCG-3'	Seqüenciamento
		5.8S InternSRev	Navia <i>et al.</i> 2005	5'-CGATTGGTAATTCGAGTGATC-3'	Seqüenciamento
mtDNA COI	890	C1J 1718	Simon <i>et al.</i> 1994 Navajas et Boursot 2003	5'-GGAGGATTTGGAAATTGATTAGTTCC-3'	PCR e seqüenciamento
		773	Navajas <i>et al.</i> 1992	5'-TACAGCTCCTATAGATAAAAC-3'	PCR e seqüenciamento
		IntCOI	**	5'-GGNGANCCTATTTTATATCAAC-3'	Seqüenciamento
		IntCOI Rev	**	5'-GTTGATATAAAATAGGNTCNCC-3'	Seqüenciamento

*** 28SC 3' modificado de HC2 *in* Depres *et al.* (1992), Ben-David *et al.* (2007); ** nesse estudo

2.2.6.1. Variação nas sequências ITS2 do DNA ribossômico para as espécies do grupo *telarius*

As substituições de nucleotídeos que separam as espécies do grupo *telarius*, foram apresentadas considerando quatro grupos distintos: 1) *T. urticae*, *T. kanzawai* e *T. cinnabarinus*; 2) *T. urticae*, *T. truncatus*, e *T. cinnabarinus*; 3) *T. urticae*, *T. turkestanii* e *T. cinnabarinus*; 4) *T. urticae*, *T. pueraricola* e *T. cinnabarinus*. A sequência de *T. urticae* incluída representa um conjunto de 37 sequências idênticas.

2.2.6.2. Divergência dos pares ordenados de nucleotídeos (pairwise nucleotide divergence)

A divergência dos pares ordenados de nucleotídeos (divergência de nucleotídeos) para o fragmento ITS2 foi calculada para cinco espécies de tetraniquídeos (*T. urticae*, *T. kanzawai*, *T. truncatus*, *T. turkestanii* e *T. pueraricola*) e para um grupo de cinco sequências (DQ517305, DQ517792, DQ512870, DQ523840, DQ523841) depositadas no GenBank como *T. cinnabarinus*. Para o fragmento *COI* a divergência dos pares ordenados foi calculada para quatro espécies de tetraniquídeos (*T. urticae*, *T. kanzawai*, *T. truncatus* e *T. turkestanii*) e para dois grupos de sequência depositadas como *T. cinnabarinus*, o primeiro com cinco sequências (DQ437548, DQ437553, DQ437559, DQ437564, DQ437565), e o segundo com três (DQ437551, DQ437544, DQ437566). Estes valores também foram calculados incluindo as demais sequências ITS2 e *COI*, depositadas no GenBank como *T. cinnabarinus*. O cálculo da divergência de nucleotídeos baseou-se no método de correção Kimura 2-parâmetros implementado no programa MEGA 4 (Kimura 1980; Tamura *et al.* 2007) utilizando as sequências ITS2 e *COI*.

2.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Muitas das sequências disponíveis no GenBank foram submetidas diretamente ao banco de dados de DNA, sem constar num artigo publicado. Mais de 50% das sequências de *Tetranychus* encontradas no GenBank não foram sequer publicadas (Ros & Breeuwer 2007) e, para a maioria daquelas publicadas, os métodos utilizados na identificação dos espécimes não foram mencionados. Em geral, não há menção ao trabalho de nenhum taxonomista ou se as características morfológicas foram utilizadas na identificação da espécie. As sequências publicadas de *T. urticae*, por exemplo, (Xie *et al.* 2006) e *T. cinnabarinus* (Xie *et al.* 2008) são confusas pois, os autores não mencionam claramente, como foram feitas as identificações e, inclusive, destaca-se que a última espécie não é considerada como válida para muitos autores, como mencionado anteriormente. A seguir, um exemplo real do problema causado por identificações duvidosas, frágeis e provenientes de trabalhos não publicados é apresentado para os ácaros tetraníquídeos.

2.3.1. Variação das sequências da segunda região intergênica codificadora (ITS2) do DNA ribossômico nas espécies do grupo *telarius*

As 27 sequências ITS2 de *T. cinnabarinus* depositadas no GenBank formaram grupos distintos, incluindo seis tipos diferentes de sequências. O comprimento dessas sequências variou de 645 pb a 647 bp e para as análises moleculares foram considerados um total de 482 posições. Na implementação do alinhamento de todas as sequências de *T. cinnabarinus* foram introduzidas duas falhas nas posições 336 e 337 para as sequências DQ523842, DQ515788, e DQ512868. Foram encontradas 11 posições variáveis com um total de 11 mutações e nove posições informativas parcimoniosas.

As análises filogenéticas preliminares de *T. cinnabarinus* foram baseadas somente em 27 sequências ITS2 e a árvore NJ mostrou três clados. O Clado 1, dividiu-se em dois grupos distintos sustentados por baixos valores de *bootstrap*. Os Clados 2 e 3 foram sustentados por valores de *bootstrap*

superiores a 80%. Esse mesmo padrão foi conservado na análise filogenética final (Figura 2.1).

As sequências ITS2 de *T. urticae* obtidas nesse estudo foram idênticas à maioria daquelas do GenBank. Resultados similares foram obtidos para essa espécie para amostras de várias origens geográficas no mundo (Navajas *et al.* 1998; Navajas & Boursot 2003). As análises filogenéticas preliminares de *T. urticae* baseadas nas sequências ITS2 (GenBank e as do presente estudo, N=48 sequências), mostraram que somente três acessos AB257736, AB257737 e AB257738 formaram um grupo isolado com alto valor de bootstrap (99%), o que indica que estas sequências provavelmente não representam amostras de *T. urticae* (árvore não apresentada). Surge a seguinte questão: que espécie essas sequências representam? Os espécimens *vouchers* foram conservados para a confirmação da identificação específica?

Tendo em vista os resultados preliminares obtidos separadamente para *T. cinnabarinus* e *T. urticae*, e considerando que estas espécies são sinônimas para muitos autores, um novo grupo de dados foi organizado agrupando 27 sequências de ITS2 de *T. cinnabarinus* e 48 *T. urticae*. Os resultados da análise filogenética revelou que 94% das sequências de *T. urticae* são diferentes daquelas de *T. cinnabarinus*, com exceção dos três acessos (AB257736, AB257737, AB257738) que foram agrupados no Clado 2 de *T. cinnabarinus* (Figura 2.1). Estas são as mesmas três sequências que permaneceram isoladas na análise filogenética realizada somente para *T. urticae*. Os altos escores de bootstrap (94%) suportam que as sequências de *T. urticae*, exceto as três já mencionadas, foram isoladas daquelas depositadas como *T. cinnabarinus*. No entanto, esperava-se que as sequências de *T. cinnabarinus* fossem agrupadas àquelas de *T. urticae*.

Com o propósito de investigar a identificação correta das sequências de *T. cinnabarinus* e, também, das três de *T. urticae* (AB257736, AB257737, AB257738) que se agruparam no Clado 2 de *T. cinnabarinus*, foi conduzida uma análise conjunta incluindo as sequências ITS2 de *T. cinnabarinus*, *T. urticae*, as sequências das espécies do grupo *telarius* e, ainda, àquelas das espécies vermelhas de *Tetranychus*.

A análise indicou que as sequências de *T. cinnabarinus* e *T. urticae* foram diferentes de muitas das formas vermelhas de *Tetranychus* (*T. neocaledonicus*, *T. piercei*, *T. ludeni*, *T. evansi*, *T. phaselus*, *T. ezoensis*, *T. parakanzawai*, *T. okinawanus*) apoiada em valores robustos de *bootstrap*. Isto mostra que o nome *T. cinnabarinus* não tem sido confundido no processo de identificação com as formas vermelhas *Tetranychus*. Essas sequências não foram utilizadas nas análises subsequentes. Foi observado que uma sequência de *T. ezoensis* (AB257728) e outra de *T. parakanzawai* (AB257745) foram agrupadas às de *T. kanzawai*.

A filogenia (Figura 2.1) mostrou que parte das sequências do GenBank, tidas como *T. cinnabarinus* foram de três espécies do grupo *telarius*, *T. kanzawai*, *T. truncatus* e *T. pueraricola*. A alocação dessas sequências de *T. cinnabarinus em cladus* distintos traz, também, os problemas relativos à consistência desses dados.

No Clado 2 estão agrupadas (com 80% de *bootstrap*) as quatro sequências disponíveis no GenBank de *T. kanzawai* (X99876, AB257729, AB076370, AY750702), seis depositadas como *T. cinnabarinus* (DQ517304, DQ523836, DQ523837, DQ523838, DQ523839, DQ512866), e as três de *T. urticae* (AB257736, AB257737, AB257738) que permaneceram isoladas nas primeiras análises. Logo, é possível que essas três sequências de *T. urticae* e as seis de *T. cinnabarinus* pertençam, de fato, à *T. kanzawai*.

No Clado 3, as 13 sequências depositadas como *T. cinnabarinus* foram agrupadas àquelas três de *T. truncatus* disponíveis no GenBank (Figura 2.1). Este grupo é suportado pelo alto escore de *bootstrap* (99%).

No Clado 1, dois grupos de sequências de *T. cinnabarinus* foram encontradas, porém com baixo suporte dos escores de *bootstrap*. Um deles incluiu cinco sequências e o outro três juntamente com duas de *T. pueraricola* (Figura 2.1). O resultado do segundo grupo sugere que as sequências deste Clado devem pertencer a *T. pueraricola*. O primeiro grupo de cinco sequências ainda permanece indefinido.

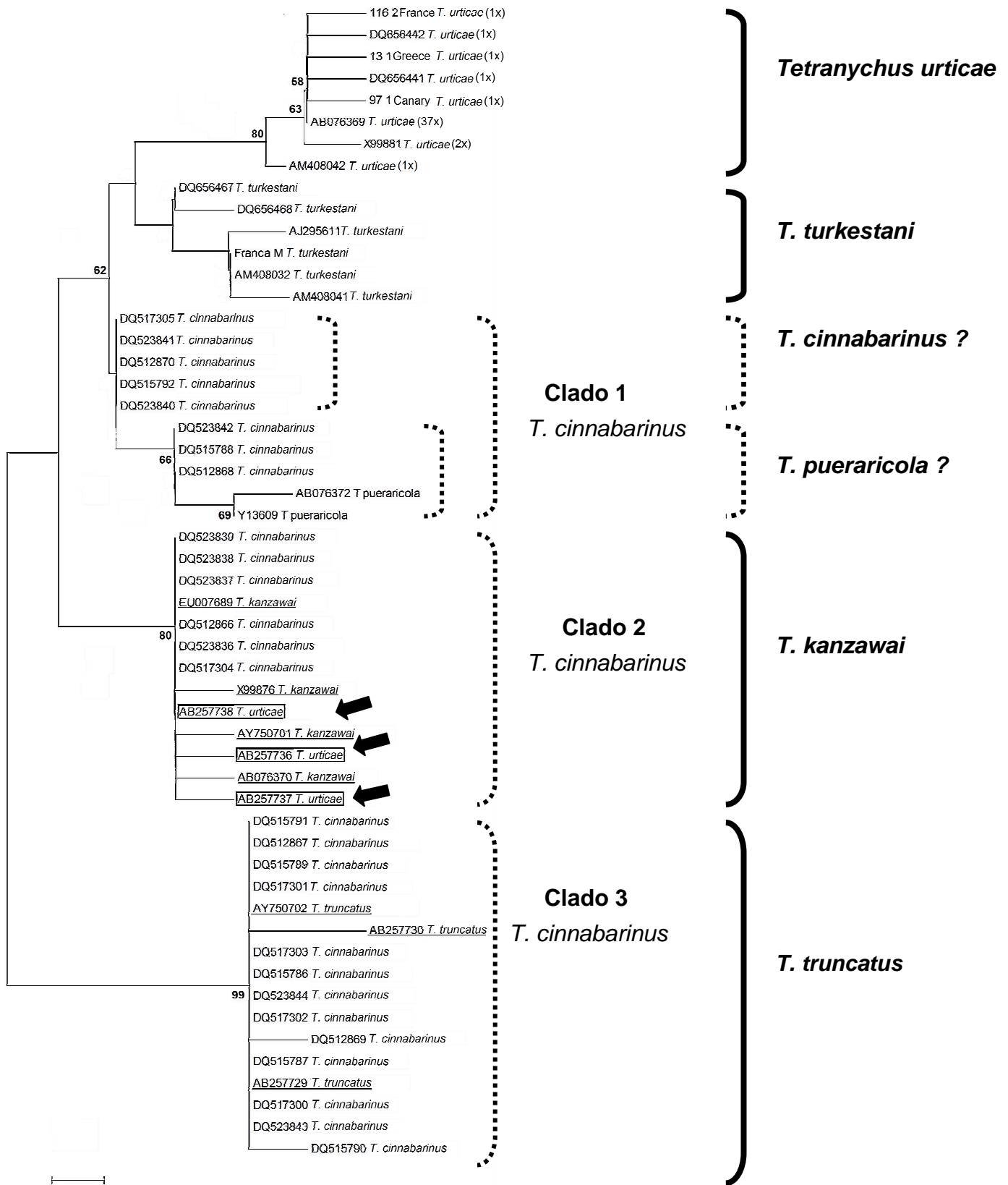


Figura 2.1. Relações filogenéticas baseadas nas sequências ITS2 de *Tetranychus cinnabarinus*, *T. urticae*, *T. kanzawai*, *T. truncatus*, *T. turkestanii* e *T. pueraricola* (ANEXO 4). O método Neighbour-Joining foi usado baseado nas distâncias calculadas pelo algoritmo Kimura 2 parâmetros. Valores de *bootstraps* (10.000 replicações) em porcentagem são mostrados próximos às ramificações. A escala indica as distâncias evolutivas inferidas pelos números de substituições de bases por posição

As posições polimórficas das espécies do grupo de *T. telarius* foram analisadas. As posições variáveis das sequências de *T. kanzawai*, *T. urticae* e *T. cinnabarinus* agrupadas no Clado 2 foram comparadas com as de *T. urticae*. As mesmas seis posições (79, 309, 339, 406, 411 e 454) representam diferenças diagnósticas (ANEXO 6, A) entre as sequências de *T. urticae* e todas as outras do Clado 2.

Nove posições diagnósticas nas sequências (68, 305, 309, 311, 321, 337, 339, 411 e 454) de *T. truncatus* e naquelas depositadas como *T. cinnabarinus* no grupo do Clado 3 foram encontradas e separam as sequências do Clado 3 daquelas de *T. urticae* (ANEXO 6, B).

A hipótese de que o primeiro grupo de cinco sequências de *T. cinnabarinus* do Clado1 pertençam a *T. turkestanii* foi testada (ANEXO 6, C). As três posições diagnósticas (339, 411 e 454) relatadas por Navajas & Boursot (2003) para *T. urticae* e *T. turkestanii* foram observadas quando as cinco sequências do Clado 1 foram incluídas juntamente com *T. turkestanii*. Entretanto, algumas diferenças foram observadas. Navajas & Boursot (2003) encontraram na posição 358 as bases "T" ou "G", enquanto em *T. cinnabarinus*, esta posição foi ocupada pela base "C". A posição 309 em *T. turkestanii* foi ocupada pelas bases "A" e "C" alternadamente, enquanto nas de *T. cinnabarinus*, a base "A" foi sempre presente. O segundo grupo de sequências de *T. cinnabarinus* (DQ515788, DQ512868, DQ523842) agrupadas no Clado 1, apresentaram a inserção de duas bases nas posições 338 e 339, sendo "C" e "A", respectivamente e a base "C" na posição 336. No estudo comparativo dos sítios diagnósticos esse padrão foi similar ao obtido para *T. pueraricola* (ANEXO 6, D).

Foram calculados os valores de divergência de nucleotídeos entre cinco espécies do grupo *telarius* distribuídas na filogenia (Figura 2.1), com e sem as sequências depositadas como *T. cinnabarinus* e aquelas três de *T. urticae*, obedecendo os agrupamentos formados nos três Clados (Figura 2.1) e a matriz da distância está na Tabela 2.3.

Tabela 2.3. Matriz de distância entre cinco espécies de tetraniquídeos, usando a correção Kimura 2-Parâmetros baseada nas sequências de ITS2 do DNA ribossômico. Os resultados, entre parênteses, indicam os valores de distâncias obtidos após a inclusão das sequências de *T. cinnabarinus* e *T. urticae* agrupadas nos Clados 1, 2 e 3, respectivamente (Figura 2.1).

	<i>T. urticae</i>	<i>T. kanzawai</i>	<i>T. truncatus</i>	<i>T. turkestanii</i>	<i>T. pueraricola</i>
<i>T. urticae</i>	0.1 (0.1)				
<i>T. kanzawai</i>	1.5 (1.5)	0.2 (0.2)			
<i>T. truncatus</i>	2.2 (2.1)	1.9 (1.7)	0.3 (0.1)		
<i>T. turkestanii</i>	1.1 (1.1)	1.3 (1.2)	2.0 (1.9)	0.3 (0.3)	
<i>T. pueraricola</i>	1.5 (1.3)	1.4 (1.3)	2.1 (2.0)	1.0 (1.0)	0.2 (0.2)

Blocos sombreados = valores intraspecíficos; blocos brancos = valores interspecíficos.

Observou-se que os valores de divergência, depois da adição das sequências de ITS2 depositadas como *T. cinnabarinus* e das três de *T. urticae* agrupadas no clado de *T. kanzawai* (Clado 2) não mudaram, ou melhor continuaram idênticos aos obtidos quando se considerou apenas as sequências de *T. kanzawai*. Da mesma forma, os valores encontrados para todas as sequências agrupadas no Clado 3 de *T. truncatus*, foram próximos, antes (2,2) e depois (2,1) da inclusão das sequências depositadas com *T. cinnabarinus*. Estes resultados corroboram aqueles encontrados na análise filogenética e no estudo dos sítios polimórficos.

A divergência entre as sequências ITS2 para as espécies (interespecífica) do grupo *T. telarius* foi de 1,0 (*T. turkestanii* e *T. pueraricola*) a 2,2 % (*T. urticae* e *T. truncatus*) e dentro das espécies (intraespecífica) de 0,1 (*T. urticae*) a 0,3 % (*T. turkestanii*). Os resultados mostraram baixa divergência entre *T. urticae* e *T. turkestanii* (1,1%). Os valores de divergência baseados nas sequências ITS2 para espécies aparentadas do gênero *Tetranychus*, usualmente são baixos como 1,4% (*T. urticae* e *T. turkestanii*) (Navajas *et al.* 1992), 1,3% (*T. urticae* e *T. kanzawai*) e 1,5% (*T. mcdanieli* e *T. pacificus*) (Navajas *et al.* 1998). Ben-David *et al.* (2007) usaram as sequências ITS2 como regiões de “código de barra” e discriminaram 16 espécies (nove

gêneros) de Tetranychidae provenientes de Israel. Os autores estabeleceram uma margem de 2% (valor da divergência) para diagnose de espécies e, em 14 das 16 espécies, as identificações foram confirmadas pelos caracteres morfológicos. Eles, também, encontraram valores de divergência entre 1.0 - 1.5% para *T. urticae* e *T. turkestanii*. De acordo com Navajas & Boursot (2003) esses valores de divergência são significativos e foram fixados pela alternância de três bases de nucleotídeos que representam as diferenças diagnósticas que separam essas duas espécies irmãs. Os mesmos três nucleotídeos diagnósticos foram identificados no presente trabalho (ANEXO 6, C).

Com respeito às oito sequências ITS2 de *T. cinnabarinus* remanescentes no Clado 1, sugere-se que três acessos (DQ515788, DQ512868, DQ523842) devam pertencer a *T. pueraricola*, enquanto os outros cinco (DQ517305, DQ517792, DQ512870, DQ523840, DQ523841), talvez possam pertencer a *T. turkestanii*. Entretanto, pode-se afirmar que essas oito sequências de *T. cinnabarinus* agrupadas no Clado 1, as de *T. turkestanii* e de *T. pueraricola* são diferentes daquelas de *T. urticae* quando é acessada a região ITS2 do DNA ribossômico. Que espécies realmente representam estas oito sequências do Clado 1? Neste momento, qualquer afirmativa pode ser prematura. Outros estudos assim como novas coletas de populações acompanhadas de outras sequências de *T. turkestanii* e *T. pueraricola*, devem ser realizados, para clarificar as substituições e inserções de bases observadas nas sequências ITS2. Após estes estudos, se nenhuma sequência de *T. cinnabarinus* permanecer como representante da espécie, a sinonímia, com *T. urticae*, poderá se confirmar.

Observando-se ainda o grupo formado exclusivamente pelas cinco sequências depositadas como *T. cinnabarinus* (DQ517305, DQ517792, DQ512870, DQ523840, DQ523841), pode-se sugerir, apesar do baixo suporte aportado pelos valor de *bootstrap*, que se esta espécie é válida, ela poderia ser representada por estas sequências.

2.3.2. Variação das sequências do *Citocromo Oxidase I*, região do DNA mitocondrial nas espécies do grupo *telarius*

As anotações da localidade e da planta hospedeira para uma determinada sequência ITS2 (ANEXO 4) são coincidentes às encontradas nos acessos das sequências COI (ANEXO 5) para *T. cinnabarinus*. Isto sugere que estas sequências foram obtidas de ácaros da mesma população ou, talvez, até do mesmo indivíduo.

O tamanho das sequências COI de *T. cinnabarinus* depositadas no GenBank variou de 410 pb a 598 bp e o comprimento final utilizado nas análises foi 390 pb. O alinhamento foi obtido, sem ambiguidade, e nenhuma inserção ou deleção foi observada. Oitenta e sete posições variáveis com 94 mutações e 68 de posições informativas parcimoniosas foram encontradas. Entre as 28 sequências COI disponíveis de *T. cinnabarinus*, 16 haplótipos foram observados e o índice de diversidade (Hd) foi de 0.9550.

As distâncias genéticas entre as sequências COI depositadas como *T. cinnabarinus* mostraram altos valores (Figura 2.2) atingindo 0.126 (12.6%). Quarenta e três por cento das sequências mostraram valores entre 0.076 a 0.119 (7.6% e 11.60%), indicando variação interespecífica e não uma variação intraespecífica de populações de *T. cinnabarinus*. Navajas *et al.* (1998) calcularam as distâncias genéticas baseadas nas sequências COI de cinco espécies de *Tetranychus* (*T. urticae*, *T. kanzawai*, *T. mcdanieli*, *T. pacificus* e *T. neocaledonicus*) e encontraram valores entre 0.062 a 0.116 (6.2 a 11.6%). Os valores encontrados para *T. cinnabarinus* também foram mais altos do que a média de 7.59%, encontrada por Ros & Breeuwer (2007) entre gêneros em Tetranychidae.

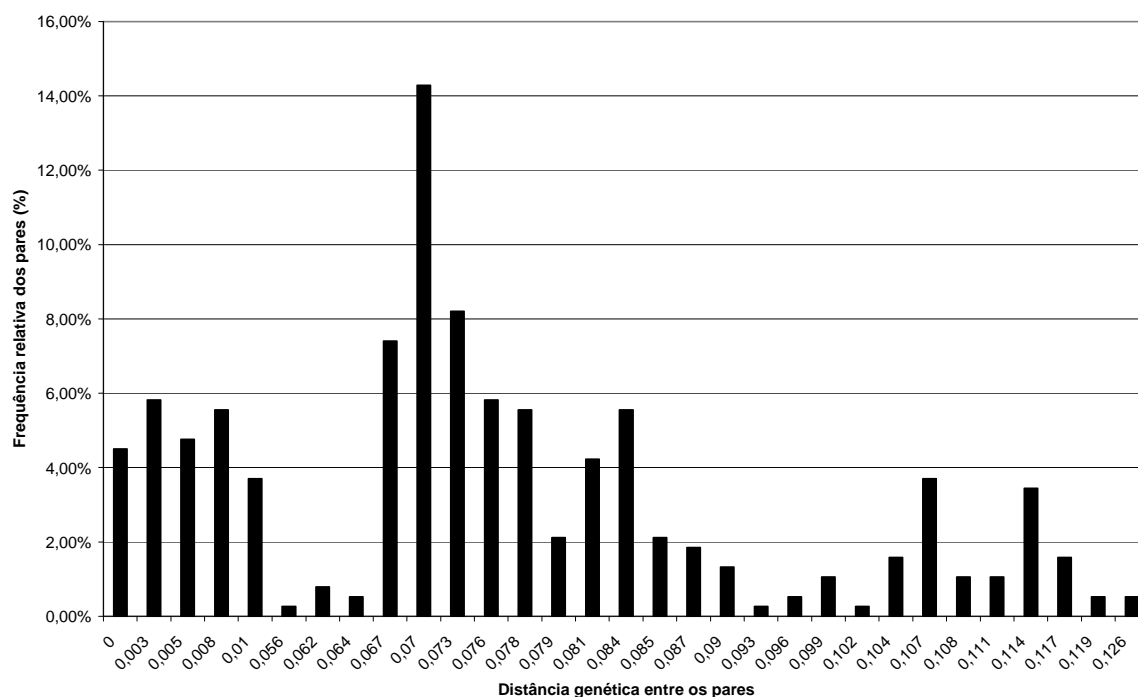


Figura 2.2. Distribuição da distância genética entre 28 populações do ácaro, *Tetranychus cinnabarinus* (ANEXO 5), baseada nas sequências do gene mitocondrial, fragmento *COI*.

A análise das sequências de *T. cinnabarinus* com aquelas das espécies avermelhadas de *Tetranychus* não detectou erros de eventual identificação nessas sequências.

A análise filogenética (Figura 2.3) revelou que as sequências *COI* depositadas como *T. cinnabarinus* também se dividiram em três clados, nos quais foram incluídas outras espécies do grupo *telarius*. Um grupo externo (*out group*) formado por três sequências (DQ437551, DQ437544, DQ437566) foi observado. Dois acessos (DQ6456483, DQ437546) de *T. cinnabarinus* ramificaram-se juntamente com *T. urticae*.

O Clado 2 agrupou as sequências de *T. kanzawai* e mais as seis depositadas como *T. cinnabarinus* formando grupo sólido. O Clado 3 (99% de *bootstrap*) agrupou as três sequências de *T. truncatus*, as 12 depositadas como *T. urticae* (Xie *et al.* 2006) provenientes da China e outras 12 depositadas como *T. cinnabarinus* (Xie *et al.* 2008). Estes autores não mencionaram se fizeram o exame morfológico para a identificação das espécies. Hinomoto *et al.* (2007) renomeou estas sequências de *T. urticae*

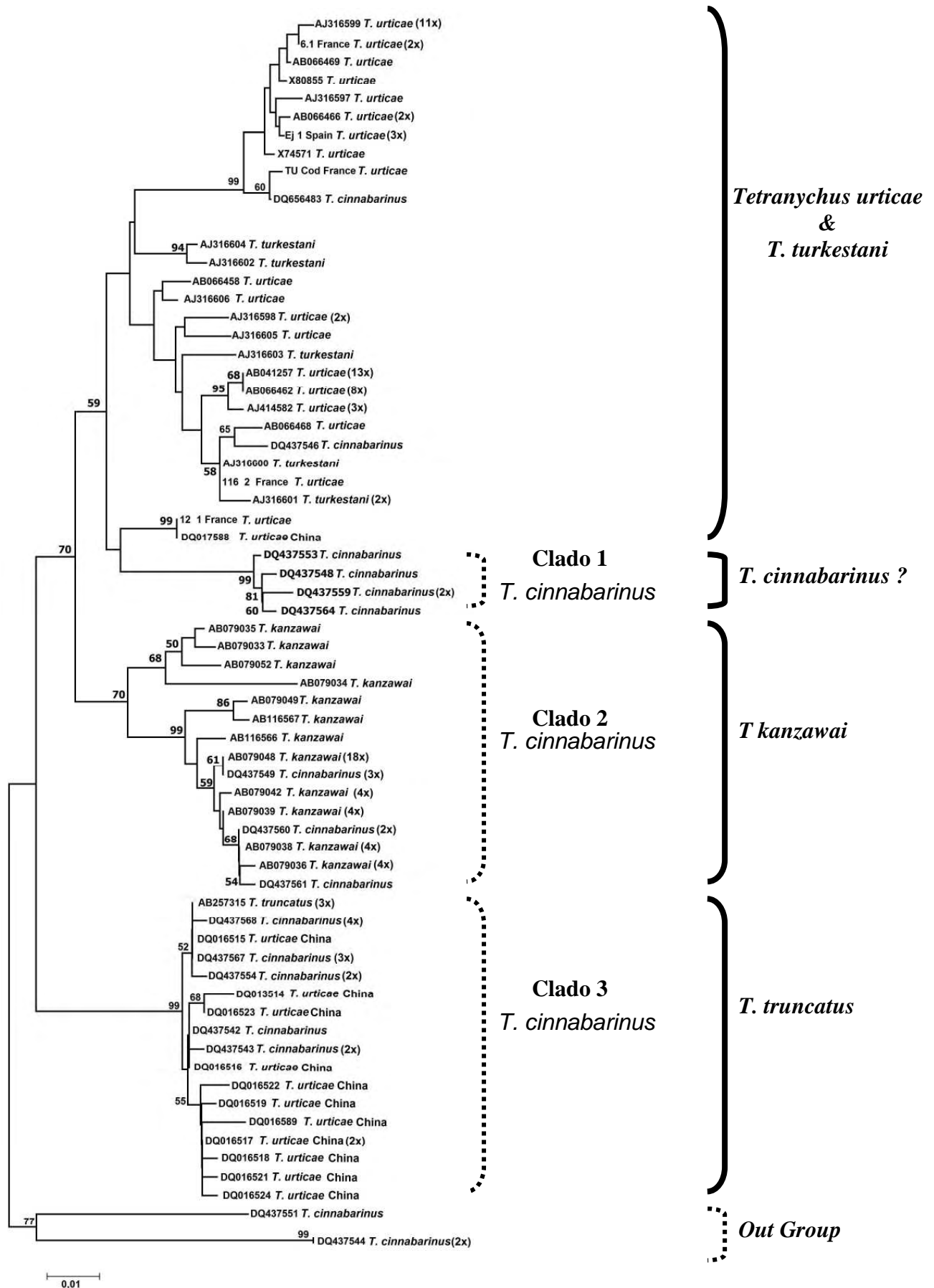


Figura 2.3. Relações filogenéticas baseadas nas sequências *COI*, de *Tetranychus cinnabarinus*, *T. urticae*, *T. kanzawai*, *T. truncatus*, *T. turkestani* (ANEXO 5). O método Neighbour-Joining foi usado baseado nas distâncias calculadas pelo algoritmo Kimura 2 parâmetros. Valores de *bootstraps* (10.000 replicações) em porcentagem são mostrados próximos às ramificações. A escala indica as distâncias evolutivas inferidas pelos números de substituições de bases por posição.

da China como *T. truncatus* baseando-se na identificação morfológica de novas amostras de ácaros coletados no Japão que apresentaram similaridade das sequências *COI*. Igualmente, as 12 sequências remanescentes de *T. cinnabarinus* do Clado 3 devem ser de *T. truncatus*. A árvore ilustra e suporta esta hipótese (Figura 2.3).

Cinco sequências depositadas como *T. cinnabarinus* formaram um grupo isolado no Clado 1 com alto valor de bootstrap (99%). É possível, que estas sequências possam ser de *T. cinnabarinus*, como já mencionado nos estudos da região ITS2.

O grupo externo (*out group*) das sequências de *T. cinnabarinus* foram altamente divergentes (8.7% e 12.6%) quando comparado com as outras sequências examinadas, sugerindo que elas pertencem a diferentes espécies de *Tetranychus* ou até mesmo a gêneros diferentes. Ros & Breeuwer (2007) consideraram, potencialmente, estas sequências como novas espécies. Na verdade, estas três sequências do grupo externo (DQ437551, DQ437544, DQ437566) e as outras cinco isoladas no Clado 1 (DQ437548, DQ437553, DQ437559, DQ437564, DQ437565), não podem ser identificadas porque detalhes dos espécimens são desconhecidos.

Todas as sequências de *T. urticae* formaram subclados, com maior ou menor suporte, e as de *T. turkestanii* agruparam neste grupo. Resultados similares foram encontrados anteriormente (Navajas & Boursot 2003; Ros & Breeuwer 2007). Os espécimens de *T. turkestanii* foram divididos em dois grupos, um deles contendo quatro sequências oriundas da França e Polônia (AJ316600, AJ31661, AJ316603, AJ414583) e o outro com duas provenientes da Holanda e dos Estados Unidos (AJ316602, AJ 316604). O último grupo de *T. turkestanii* foi isolado com alto valor de bootstrap (94%). As outras sequências de *T. turkestanii* ficaram na mesma ramificação das amostras de *T. urticae* da Ásia (Japão, Tailândia e China), Norte da África (Egito, Tunísia) Europa (Itália, Grécia, França, Holanda) e Brasil. Observou-se um grupo isolado de sequências de *T. urticae* (*bootstrap* 99%). Este grupo foi composto, predominantemente, por espécimens coletados em países banhados pelo mar Mediterrâneo, na Europa e na África, com uma sequência do Japão e outra do

Brasil. De acordo com Navajas & Boursot (2003) a especiação de *T. urticae* e *T. turkestanii* é recente, o suficiente para que as segregações das linhagens detectadas nas sequências de *COI* tenham ocorrido, assim estas espécies irmãs ainda não atingiram a monofilia para o *mtDNA* (Figura 2.3).

Foi calculada a divergência baseada nas sequências *COI* entre quatro espécies do grupo *telarius*, com e sem as sequências depositadas como *T. cinnabarinus* e *T. urticae* amostradas na China, que se dividiram nos Clados 2 e 3 (Tabela 2.4). As cinco sequências de *T. cinnabarinus* isoladas no Clado 1 mais aquelas do grupo externo foram incluídas nas análises de divergência como duas espécies diferentes.

Tabela 2.4. Matriz de distância entre quatro espécies de tetraniquídeos, usando a correção Kimura 2-Parâmetros baseada nas sequências *COI* do DNA mitocondrial. Foram incluídos como táxons separados as cinco sequências de *T. cinnabarinus* agrupadas no Clado 1 e aquelas do grupo externo (*out group*). Os resultados entre parênteses indicam os valores das distâncias incluindo as sequências de *T. cinnabarinus* e *T. urticae* agrupadas nos Clados 2 e 3 respectivamente (Figura 2.3).

	<i>T. urticae</i>	<i>T. kanzawai</i>	<i>T. truncatus</i>	<i>T. turkestanii</i>	<i>T. cinnabarinus</i> ?	<i>Out group</i>
<i>T. urticae</i>	3.2 (3.2)					
<i>T. kanzawai</i>	6.8 (6.8)	1.2 (1.1)				
<i>T. truncatus</i>	8.4 (8.5)	6.9 (7.0)	0.0 (0.08)			
<i>T. turkestanii</i>	3.4 (3.4)	6.6 (6.6)	8.1	2.5		
<i>T. cinnabarinus</i> ?	6.40	7.1	8.4	5.8	0.6	
<i>Out group</i>	11.9	10.5	10.0	11.5	11.6	7.3

Blocos sombreados = valores intra-populacionais; blocos brancos = valores entre populações.

Os valores de divergência calculados após a adição das sequências depositadas como *T. cinnabarinus* às sequências de *T. urticae*, *T. kanzawai* e *T. truncatus* foram similares e, provavelmente, estas sequências *COI* de *T. cinnabarinus* pertençam aos respectivos táxons nos quais foram agrupados.

A divergência interespecífica entre *T. urticae* e *T. kanzawai* foi 6.8% valor similar ao encontrado por Navajas *et al.* (1998). A diferença dentro de *T.*

urticae atingiu o valor máximo de 6.3% e em *T. kanzawai* 5.5 %. Para o cálculo da divergência interespecífica as sequências oriundas da China depositadas erroneamente como *T. urticae* não foram incluídas pois, provavelmente, são de *T. truncatus*. A diferença mínima entre *T. urticae* e *T. kanzawai* foi de 3.5 %. Entre as espécies do grupo *telarius*, *T. urticae* e *T. kanzawai* apresentaram elevado valor de variação intraespecífica.

2.3.3. Coletas de ácaros

Durante a identificação das lâminas das novas populações de *T. urticae*, foi encontrado mais de uma espécie de Tetranychidae na mesma planta hospedeira, ou até na mesma folha, com sobreposição de espécies de *Tetranychus* e de gêneros. Por exemplo, em uma amostra coletada em soja, foram encontrados espécimens de *T. urticae* juntos com *Mononychellus planki* (McGregor, 1950); *T. desertorum* Banks, 1900 e *T. gigas* Pritchard & Baker, 1955 e *T. desertorum* e *M. planki*. Da mesma maneira, *T. urticae* e *M. tanajoa* (Bondar, 1938) foram encontradas juntas em uma folha de mandioca e, ainda, *T. ludeni* Zacher, 1913 e *T. urticae* em plantas de feijão. A ocorrência simultânea de diferentes espécies de ácaros fitófagos numa planta hospedeira, não é novidade e já foi relatada por Foott (1962, 1963). A presença de infestações mistas evidencia a importância da identificação morfológica como um processo básico para subsidiar os estudos de biologia molecular.

Com respeito aos problemas de identificação errônea apontados aqui, observou-se que os fenótipos considerados pelos autores que depositaram as sequências como *T. cinnabarinus* foram confundidos com *T. urticae*, *T. kanzawai*, *T. truncatus* ou até mesmo com *T. pueraricola* e, provavelmente, as sequências de ITS2 e *COI* foram geradas de espécimens incorretamente identificados como *T. cinnabarinus*. Pode ser que as identificações tenham sido feitas por uma pessoa não especialista ou, talvez, tenha havido a ocorrência de populações mistas nas folhas, o que pode ter conduzido aos erros. É sempre recomendável que a identificação das espécies seja confirmada pelo critério

morfológico por um especialista em taxonomia antes do início dos estudos moleculares.

2.4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados da revisão de 117 sequências ITS2 e de 149 *COI* depositadas no Genbank incluindo 18 novas sequências de *T. urticae* mostraram a necessidade da confirmação específica, especialmente para as espécies do grupo *telarius*, previamente ao início de estudos de biologia molecular. Todos os resultados derivados das sequências ITS2 e *COI* foram equivalentes e complementares o que fornece maior sustentabilidade aos problemas de identificação errônea das espécies do grupo *telarius*. Também, foi observado que para cada sequência ITS2 de *T. cinnabarinus* há uma *COI* correspondente, cujas informações de coleta são equivalentes, o que corrobora a suspeita de identificação errônea. A investigação do fragmento ITS2 mostrou que seis sequências identificadas como de *T. cinnabarinus* (DQ517304, DQ523836, DQ523837, DQ523838, DQ523839, DQ512866) mais três de *T. urticae* (AB257736, AB257737, AB257738) pertencem a *T. kanzawai*. Também sugeriram que 13 sequências de *T. cinnabarinus* (DQ517300, DQ517301, DQ517302, DQ517303, DQ515786, DQ515787, DQ515789, DQ515790, DQ515791, DQ512867, DQ512869, DQ523843, DQ523844) pertencem a *T. truncatus*. De acordo com os resultados, duas sequências (DQ656483 e DQ437546) depositadas como *T. cinnabarinus*, provavelmente, são de *T. urticae*. O estudo da região *COI* indicou que seis acessos de *T. cinnabarinus* (DQ437560, DQ437561, DQ437562, DQ737563, DQ437549, DQ437558) devem ser de *T. kanzawai*, enquanto outros doze (DQ437542, DQ437543, DQ437545, DQ437547, DQ437550, DQ437552, DQ437554, DQ437555, DQ437556, DQ53757, DQ437567 e DQ437568) podem ser de *T. truncatus*.

As análises indicaram que as sequências ITS2 e *COI* podem ser marcadores moleculares muito úteis na identificação de espécies, em estudos de genética de populações e na distinção de espécies aparentadas de ácaros

tetraníquideos. Apesar dos caracteres morfológicos estarem disponíveis para a identificação, a distinção de espécies muitas vezes pode ser extremamente difícil e seria imprescindível que o taxonomista fosse envolvido com as pesquisas moleculares.

Uma possibilidade que emerge dessa análise é a dificuldade da identificação precisa das espécies do grupo *telarius* baseada nos caracteres morfológicos e, assim, muitos deles podem ter sido identificados erroneamente, conseqüentemente, as sequências ITS2 e/ou de *COI* correspondentes, depositadas no GenBank, podem pertencer a outras espécies. Infelizmente, a maioria das publicações que utilizaram as sequências ITS2 e *COI* oriundas de espécimens do grupo *telarius* não informaram se o depósito de material *voucher* para a confirmação morfológica foi efetuado. Assim, aquelas sequências questionáveis não podem ser reavaliadas, validadas ou sequer corrigidas. Sem dúvida, a pesquisa genética com ácaros Tetranychidae tem avançado e se beneficiado da utilização de ferramentas moleculares para o entendimento das relações de espécies próximas, de estudos filogenéticos, de estrutura genética, de processos históricos e origem das invasões biológicas. Os problemas levantados enfatizam que é necessário cuidado, pois os resultados de um estudo podem ser aplicados a outros. Para a continuidade da produção de resultados confiáveis e de alta qualidade que sirvam como um guia efetivo para outros estudos, especialmente no tocante as espécies grupo *telarius* estas considerações devem observadas.

Exemplares *vouchers* conservados nas coleções de referências

A identificação taxonômica acurada é a base para a pesquisa em biologia, independente se o foco é o estudo filogenético, evolutivo, genético, comportamental, ecológico, fisiológico e aqueles aplicados. O reconhecimento de espécies crípticas ou entidades intraespecíficas são essenciais para muitos projetos. É importante a boa preservação de alguns espécimens de cada amostra para futuras verificações. Sequências de DNA devem ser de alta

qualidade e sempre associadas aos espécimens *vouchers* cuja origem e o *status* (nome) devem ser registrados (Ruedas *et al.* 2000; Marrelli *et al.* 2006). Seria interessante usar um protocolo de extração do DNA não-destrutivo que pudesse prover a menor distorção possível do espécimen utilizado, permitindo a preservação dos *vouchers* para identificação morfológica (Rowley *et al.* 2007). No caso específico de ácaros tetraniquídeos, cuja identificação baseia-se, principalmente, no macho (*aedeagus*) e os estudos moleculares nas fêmeas, seria necessário a preservação de um número significativo dos espécimens da população estudada para certificar a identificação correta. O depósito de exemplares *vouchers* em coleções de referência serve como plataforma para garantir a preservação dos espécimens e permitir a o acesso a informação e a comunicação entre os pesquisadores (Hebert & Gregory, 2005; Caesar *et al.* 2006;).

Uso de vários marcadores moleculares

Técnicas moleculares estão prontamente disponíveis na maioria dos institutos e centros de pesquisa do mundo e o custo de sequenciamento de DNA tem se tornado economicamente viável. A utilização de um único gene mitocondrial para o código da barras e a taxonomia baseada unicamente no DNA parecem ainda inapropriados para atingir conclusões efetivas a respeito da identificação de organismos. Além disso, esse conhecimento mal construído pode levar a erros de interpretação dos processos evolutivos e da diversidade ecológica dos Tetranychidae. Com efeito, para os tetraniquídeos sugere-se a utilização de sequências mitocondriais e nucleares que são ferramentas bastante úteis na separação de espécies de ácaros aparentadas (Navajas 1998; Navajas *et al.* 1998; Navajas & Fenton 2000; Navajas & Boursot 2003;), assim como em outros grupos de artrópodes (Bull *et al.* 2006; Greenstone 2006). É preciso considerar, também, que uma vez extraído o DNA dos exemplares, varias análises podem ser efetuadas e uma série de *informações pode ser gerada, incluindo estudos com: Random Amplified Polymorphic DNA*

(RAPD), marcadores de *Restriction Fragment Length Polymorphic* (RFLP) e microssatélites que podem auxiliar nas pesquisas com ácaros tetraniquídeos.

Importância das variações intraespecíficas no uso de marcadores ITS2 e COI

A identificação de espécies se baseia na determinação de caracteres fixos ou naqueles que, embora variáveis, sejam conhecidos nas populações. Em estudos genéticos as amostras representativas são compostas de vários espécimens de cada localidade e de outras que representam a distribuição geográfica da espécie. Se houver, ainda, a ocorrência de polimorfismo intragenômico é necessário a clonagem dos produtos de PCR e o sequenciamento dos clones de cada espécimen, antes de indicar a ocorrência de espécies novas ou crípticas. (Van Bortel & Coosemans 2003). A variação intraespecífica e o complexo de espécies devem ser, suficientemente, investigados. Foi encontrada alta homogeneidade nas sequências *consensus* ITS2 para as espécies de *Tetranychus* estudadas, especialmente, entre os espécimens de *T. urticae*. No entanto, foram observadas divergências substanciais entre as sequências COI de *T. urticae*, com valor máximo de 6,3%. Este valor excede a diferença mínima de 3,5% encontrada entre as espécies *T. urticae* e *T. kanzawai*, por exemplo. A homogeneidade das sequências de ITS2 do ribossoma nuclear encontrada em *T. urticae* contrasta com o polimorfismo extensivo do COI mitocondrial. Esse tema foi bem discutido por Navajas *et al.* (1998).

O Valor dos trabalhos cooperativos entre os taxonomistas e os biólogos moleculares – o uso de características morfológicas é valioso para o código de barras de DNA

Um uso complementar das características morfológicas clássicas e das informações moleculares aumenta velocidade, a eficácia dos diagnósticos e

confere maior confiabilidade aos estudos de genética de populações e aqueles relativos a acarologia aplicada. Ferramentas moleculares são úteis e complementam a identificação, porém não substituem a taxonomia tradicional. A informação obtida dos marcadores moleculares é mais robusta na descoberta da diversidade, quando associada aos conhecimentos de um especialista em taxonomia. Novas técnicas e utilização de protocolos otimizados permitem a extração do DNA do exemplar *voucher*, que posteriormente pode ser conservado, começam a ser rotina nos procedimentos de código de barras de DNA (Rowley *et al.* 2007) e, contribuem para a geração de dados de alta qualidade. A formação de banco de dados associativos como o “Morph Bank e Genbank” é desejável e aumentará a confiabilidade, a utilidade do código de barras e tornará possível a interação e a disponibilidade de todas as informações pertinentes ao espécimen estudado (morfologia, taxonomia, sequências de DNA, exemplares testemunhos e dados das coletas) (Rowley *et al.* 2007). A aplicação da taxonomia integrativa irá contribuir sobremaneira para a descoberta e ou a delimitação das espécies naturais (Will *et al.* 2005) e possibilitará um melhor entendimento das espécies de *Tetranychus* do grupo *telarius* e de outros grupos de organismos e, assim, funcionar como uma estratégia efetiva para minimizar os problemas relativos a identificações errôneas no futuro.

CAPÍTULO 3

Filogenia, filogeografia e estrutura genética de populações de *Tetranychus urticae* Koch (Acari: Tetranychidae) inferidas das sequências de DNA da região ITS e COI

RESUMO

O ácaro rajado, *Tetranychus urticae* Koch, é uma espécie polífaga que ataca culturas agrícolas em todo o mundo. Estudos de diversidade genética de *T. urticae* foram conduzidos, principalmente na França, Espanha, Israel e Japão, embora essa espécie cause surtos em diversos países, como por exemplo, no Brasil, onde está entre os ácaros-pragas mais importantes do país. Esse estudo investigou a variabilidade genética, a filogenia, a estrutura genética e a associação a plantas hospedeiras em populações de *T. urticae*, coletadas ao redor do mundo. Para isso foram utilizados os marcadores ITS do DNA ribossômico e COI do DNA mitocondrial. Novas sequências dessas duas regiões do genoma foram obtidas de espécimes coletados no Brasil e na Região Paleártica (França, Espanha Peninsular, Ilhas Canárias, Grécia, Síria Tunísia, Polônia e Noruega) e foram analisadas conjuntamente com as sequências de *T. urticae* recolhidas do GenBank. Os exemplares coletados foram montados para as identificações morfológicas. Os resultados indicaram a ocorrência de estruturação genética das populações de *T. urticae* analisadas em função da localidade geográfica de coleta das mesmas. Entretanto, o efeito da planta hospedeira não foi observado. A diversidade haplotípica, inferida pelas duas regiões do genoma analisadas nesse estudo (ITS e COI) foi maior entre os países banhados pelo mar Mediterrâneo. Não se observou variabilidade genética entre as populações de *T. urticae* coletadas nas cinco regiões do Brasil quando se avaliou a região ITS. A presença de dois haplótipos COI foi constatada no Brasil, um compartilhado com a França, Espanha e Ilhas Canárias e outro com o Japão. Para validar os resultados obtidos nesse estudo foi discutida a necessidade de novas pesquisas explorando regiões geográficas do mundo ainda não amostradas, bem como de aumentar o número de populações coletadas por país estudado.

Palavras chaves: ácaro rajado, DNA mitocondrial, DNA ribossômico, marcadores moleculares, sequências de DNA, variabilidade genética.

Phylogeny, phylogeography and genetic structure in *Tetranychus urticae* Koch (Acari: Tetranychidae) populations inferred from ITS2 and COI DNA sequences

ABSTRACT

The two-spotted spider mite *Tetranychus urticae* Koch is a highly polyphagous species which produces damages in many crops worldwide. Studies on the genetic variability of *T. urticae* populations were conducted in France, Spain, Israel and Japan, although this spider mite produces outbreaks in many other countries, as the case of Brazil, where it is considered one of the most important pest among the phytophagous mites. This study deals with the genetic variability, phylogeny, genetic structure and host plant associations in *T. urticae* populations collected around the world. With this purpose were used molecular markers from the ITS of the ribosomal DNA and COI of mitochondrial DNA. New sequences of both regions were obtained from individuals collected from Brazil and the Palearctic Region (France, continental Spain, Canary Islands, Greece, Syria, Tunisia, Poland and Norway) and were jointly analyzed with the *T. urticae* sequences deposited in the GenBank. In addition, other individuals were collected and mounted for morphological studies. Results indicated the occurrence of genetic structure of the *T. urticae* analyzed populations according to its geographic collection locality. However, the effect of the host plant was not observed. The haplotypic diversity inferred since genomic regions (ITS and COI) was higher among the Mediterranean countries. Genetic variability was not observed among populations from different regions in Brazil from where the ITS region was assessed. Two COI haplotypes were found in the Brazilian populations, one of them also present in France, Spain and the Canary Islands and the other in Japan. Further studies are needed to fully validate the obtained results with biological material from unexplored geographical regions and increasing the number of populations collected for studied countries.

Palavras chaves: DNA sequences, genetic variability, mitochondrial DNA, ribosomal DNA, molecular markers, two-spotted spider mite.

3.1. INTRODUÇÃO

O ácaro rajado, *Tetranychus urticae* Koch 1936 (Acari: Tetranychidae) é uma espécie polífaga que infesta culturas agrícolas e plantas silvestres em todo o mundo. Esse ácaro já foi relatado para 1.054 espécies hospedeiras e ocorre em mais de 100 países sendo considerado um dos ácaros fitófagos de maior importância econômica (Jeppson *et al.* 1975; Helle & Sabelis 1985). No Brasil, *T. urticae* está entre os principais ácaros-praga do país, seja pelo número de espécies vegetais atacadas como pelos danos a elas ocasionados (Moraes & Flechtmann 2008). Os hábitos alimentares e a ampla distribuição da espécie estimulam investigações: - *T. urticae* é uma espécie altamente polífaga e cosmopolita ou é formada por grupos de populações geneticamente diferentes que estão associadas a hospedeiros ou regiões específicas?

Avaliar a distribuição da variação genética dentro de uma espécie, definir as causas dessa variação, reconhecer os efeitos das mudanças genéticas atuais e distingui-los dos efeitos históricos que promoveram a divergência ou o isolamento de certas populações é uma tarefa difícil. As técnicas moleculares vêm sendo utilizadas para esclarecer questões como essas. Diferentes regiões do genoma podem apresentar variados modos de evolução e/ou de transmissão e carregam informações complementares sobre os fatores evolutivos responsáveis pela variação genética numa determinada espécie. Adicionalmente, filogenias obtidas a partir de sequências de DNA podem ajudar a reconstruir cenários históricos e biogeográficos (Navajas *et al.* 1998; Navia *et al.* 2005). A importância dos estudos de filogenia e o uso da estrutura geográfica para auxiliar as inferências acerca do assunto têm sido abordados (ver Malhorta & Thorpe 2004; Roderick 1996).

Os marcadores moleculares mais utilizados em estudos de evolução molecular incluem a variação das sequências da região intergênica transcrita denominada em inglês *Internal Transcribed Spacer* (ITS) do DNA ribossômico e um fragmento do DNA mitocondrial, a região codante para a *Citocromo Oxidase I (COI)*. A molécula do DNA mitocondrial apresenta herança materna, o modo de transmissão ao longo das gerações é efetivamente haplóide, não há

recombinação e seus genes representam um loco genético único (Avisé *et al.* 1987; Hoy 1994; Roderick 1996). As filogenias inferidas a partir do DNA mitocondrial juntamente com as informações geográficas das populações amostradas provêm meios para a avaliação da estrutura geográfica dessas populações (Avisé 1994; Brower *et al.* 1996; Hillis *et al.* 1996). A utilização do fragmento *COI* do DNA mitocondrial como um marcador pode ser útil na análise intraespecífica e interespecífica das relações filogenéticas de/entre populações de espécies do gênero *Tetranychus* (Navajas *et al.* 1996, 1996a; 1998; Navajas 1998; Hinomoto *et al.* 2001; 2007; Nishimura *et al.* 2007). As análises filogenéticas podem ser utilizadas para determinar os padrões de distribuição filogeográfica das populações (Roderick 1996; Avisé 2000, Navia 2004) e a avaliação dessas informações é importantes, uma vez que permite investigar as rotas de colonização, a história da migração de populações e podem, ainda, ser utilizadas para sugerir o traçado e a origem das espécies, no caso de introduções acidentais de pragas exóticas em novas regiões (Navajas 1998; Baliraine *et al.* 2004; Navia *et al.* 2005; Lozier *et al.* 2008).

A região ITS do DNA ribossômico apresenta localização nuclear na célula, seu genoma é diplóide e ocorre recombinação. Sequências da segunda região intergênica ITS2 têm sido amplamente utilizadas nas análises das relações filogenéticas, nos estudos de variação intra e interespecífica e na diagnose de espécies. Em ácaros eriofiídeos as diferenças observadas entre as sequências da região ITS1 foram utilizadas na identificação de espécies do gênero *Cecidophyopsis* (Acari: Eriophyidae) (Kumar *et al.* 1999). Em insetos, o estudos da variabilidade intraespecífica e a definição de complexos em populações do mosquito *Anopheles* foram conduzidos a partir da análise de sequências da região ITS2 (Fairley *et al.* 2005; Marrelli *et al.* 2006). Navajas (2001) e Navajas *et al.* (2002) concluíram que o estudo da região do ITS2 (rDNA) acompanhado de estudos morfológicos e cruzamentos é muito útil na distinção de táxons intimamente relacionados em Acari, Tetranychidae, e utilizaram estas sequências ITS2 na distinção entre as espécies de *T. urticae* e *T. turkestanii* Ugarov & Nikolskii e, ainda, para estabelecer a sinonímia entre *T. kanzawai* Kishida e *T. hydrangea* Pritchard & Baker.

Alguns estudos têm sido conduzidos com o objetivo de avaliar a diversidade e a estrutura genética de *T. urticae*, bem como investigar os fatores relacionados com estas variações e inferir sobre a origem das populações (Tsagkarakou *et al.* 1997; 1998; Navajas 1998; Navajas *et al.* 1998; Navajas & Boursot 2003; Xie *et al.* 2006; Hinomoto *et al.* 2001; 2007; Ros & Breeuwer 2007). Os resultados que vêm sendo obtidos são discordantes em alguns aspectos e não conclusivos.

De um modo geral, foi descrito um padrão filogeográfico para as populações de *T. urticae* coletadas ao redor do mundo. Navajas *et al.* (1998) encontraram a presença de dois agrupamentos distintos, sendo um composto pelas populações do Mediterrâneo e outro por populações de origens mistas. O agrupamento do Mediterrâneo apresentou alta diversidade genética e foi considerado como centro de origem da espécie que, posteriormente, a partir de subgrupos, colonizou outras regiões do hemisfério Norte e do mundo. Resultados semelhantes foram obtidos por Hinomoto *et al.* (2001). Entretanto, nos estudos conduzidos por Ros & Breeuwer (2007) o padrão filogeográfico descrito por Navajas *et al.* (1998) não foi confirmado. Os autores também não encontraram correlação entre a divergência das sequências do DNA mitocondrial e a associação a plantas hospedeiras e, colocaram em dúvida a existência do padrão filogeográfico. Consideraram que *T. urticae* é uma espécie que infesta varias *commodities* e que provavelmente o comércio e o trânsito internacional de mercadorias podem influenciar a distribuição das suas populações ao redor no mundo. Esse fato afetaria qualquer relação entre a localização geográfica e a filogenia. A presença de parasitas reprodutivos como *Wolbachia* e *Cardinium* também poderiam afetar os padrões filogenéticos.

Outro fator que pode estar interferindo na obtenção dos resultados discordantes sobre a estrutura genética das populações de *T. urticae* é a utilização de sequências do GenBank que, muitas vezes, não correspondem ao táxon *T. urticae* e sim, a espécies próximas do grupo *telarius* cuja identificação pode ter sido errônea ou até mesmo a táxons cuja sinonímia com *T. urticae* ainda é bastante discutida, como *Tetranychus cinnabarinus* Boisduval, por exemplo (ver Capítulo 2). Hinomoto *et al.* (2007) identificaram 13

sequências da região *COI mt*(DNA) depositadas erroneamente como *T. urticae* no GenBank e obtidas, na verdade, de sequências de espécimes de *T. truncatus* Ehara.

O presente estudo, investigou a filogenia, os padrões filogeográficos e a associação a plantas hospedeiras em populações de *T. urticae* coletadas em várias regiões do mundo utilizando os marcadores *COI* e ITS2. Novas sequências da região *COI* (n=20) do DNA mitocondrial e da região ITS2 (n=55) de *T. urticae* coletadas no Brasil e na Região Paleártica foram obtidas e incluídas nas análises conjuntamente com as sequências de *T. urticae* disponíveis no GenBank. As sequências depositadas como *T. cinnabarinus* e outras sequências com suspeitas de erros de identificação não foram consideradas nas análises. Para tanto, foram conduzidas análises filogenéticas e estudos da variabilidade intraespecífica com a apresentação dos valores da distância e dos índices de diversidade genética. A distribuição da variação genética intraespecífica foi avaliada utilizando AMOVA.

OBJETIVOS

Esse capítulo foi elaborado com o objetivo geral de contribuir para o conhecimento da variabilidade genética, da filogenia e da estruturação em populações de *Tetranychus urticae* no mundo, incluindo populações do Brasil, utilizando as regiões ITS do DNA ribossômico e *COI* do DNA mitocondrial. Foram estabelecidos os seguintes objetivos específicos:

1. Caracterizar as populações de *T. urticae* quanto à variação genética através da análise das regiões ITS e *COI*;
2. Investigar o efeito das variações geográficas e de plantas hospedeiras na estrutura genética em populações de *T. urticae* coletadas ao redor do mundo, incluindo as novas populações obtidas nesse estudo;
3. Analisar a distribuição e a frequência da variação genética nas populações de *T. urticae* no mundo.

3.2. MATERIAL E MÉTODOS

As análises moleculares das amostras de *Tetranychus urticae* foram conduzidas no *Centre de Biologie et Gestion des Populations* (CBGP), laboratório avançado do *Institut National de la Recherche Agronomique* (INRA) localizado em Monferrier-sur-Lez, Languedoc Roussillon, França e no Laboratório de Acarologia, Quarentena Vegetal, da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília, DF. As atividades deste trabalho foram divididas em três etapas: 1) obtenção de amostras de ácaros *Tetranychus urticae* no Brasil e região Paleártica, 2) análises moleculares de DNA - extração, amplificação e sequenciamento; 3) análises das sequências de nucleotídeos.

3.2.1. Obtenção de amostras de ácaros *Tetranychus urticae*

Foram obtidas 59 amostras de *T. urticae* originárias de nove países em diferentes plantas hospedeiras. No Brasil foram coletadas 22 populações (Tabela 3.1; Figura 3.1). As demais populações foram da França (15) Espanha Insular (10), Ilhas Canárias (5), Grécia (1), Noruega (1), Polônia (1) Síria (2), Tunísia (1) e Canadá (1) (Tabela 3.2; Figura 3.2).

No Brasil, a maioria das amostras foi coletada pela equipe de Acarologia do Laboratório de Quarentena Vegetal, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia conforme está descrito no Capítulo I. Entre as amostras selecionadas para os estudos moleculares foram incluídas duas amostras coletadas por Mario Sato em mamão e morango em Presidente Prudente e Serra Negra, respectivamente, e uma coletada em mamão em Monte Alegre do Sul enviada por Adalton Raga, ambos pesquisadores do Instituto Biológico de São Paulo da Unidade de pesquisa localizada em Campinas, SP.

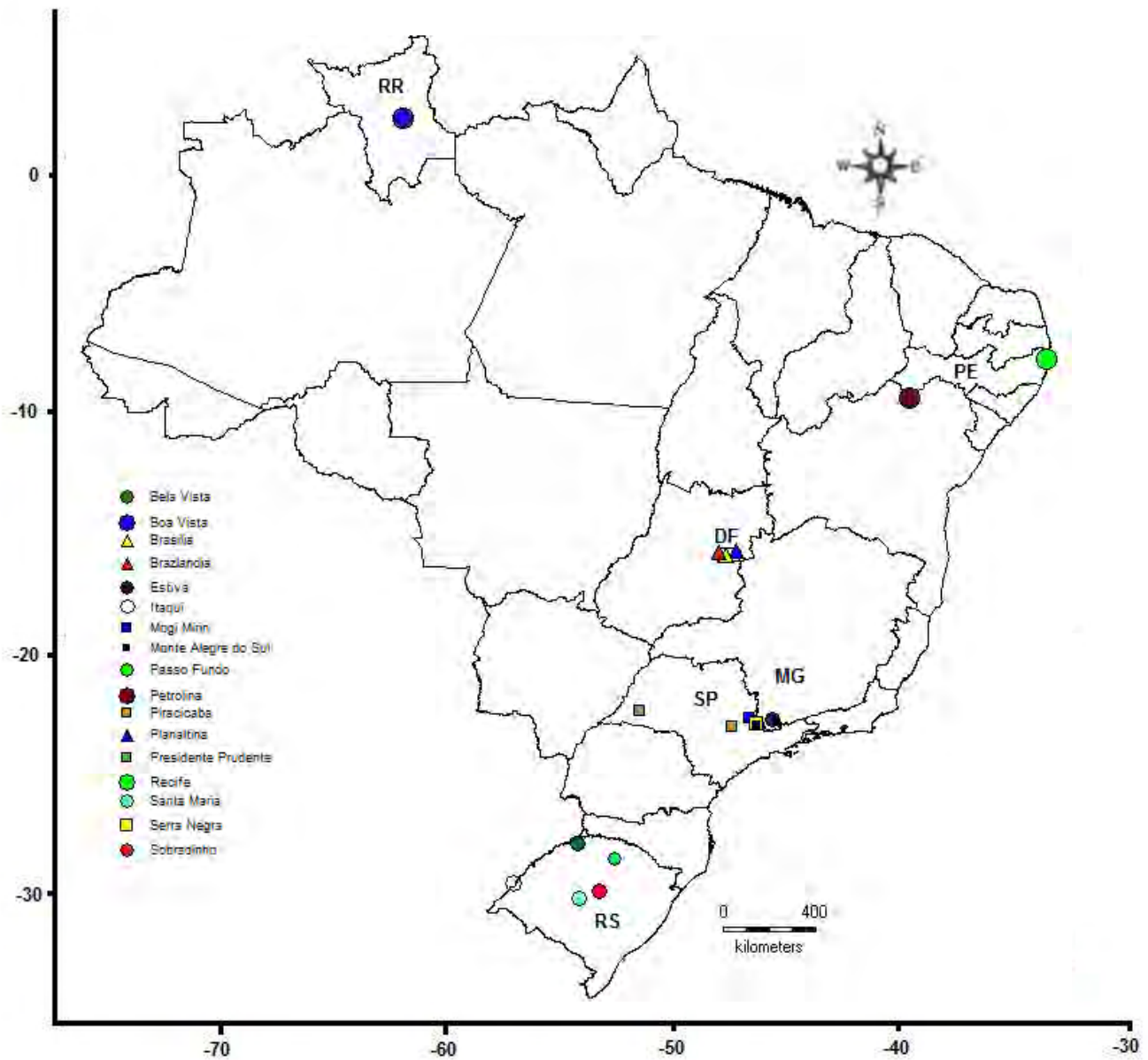
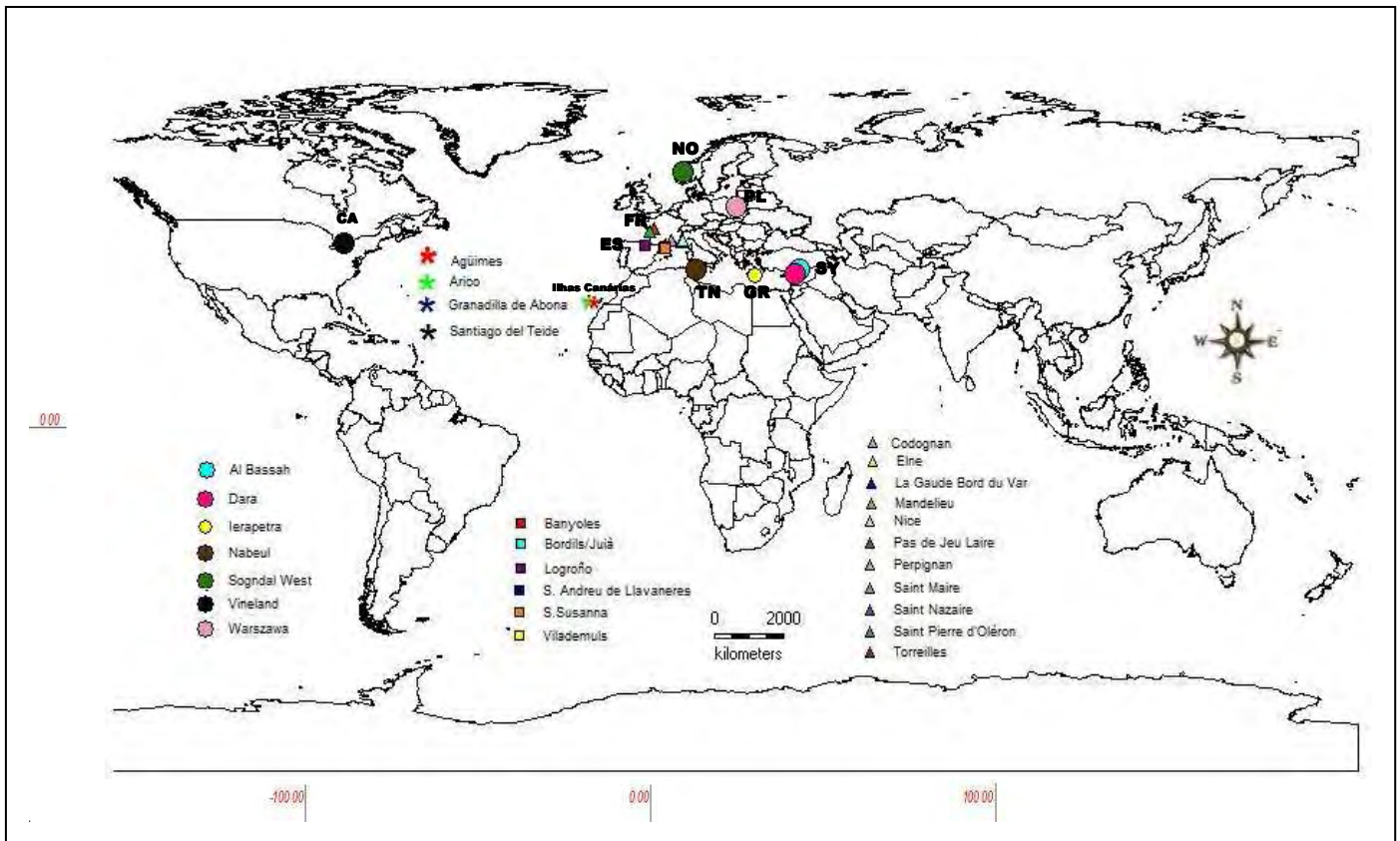


Figura 3.1. Mapa do Brasil. Indicação dos pontos de coleta das populações de *Tetranychus urticae*.

A



B

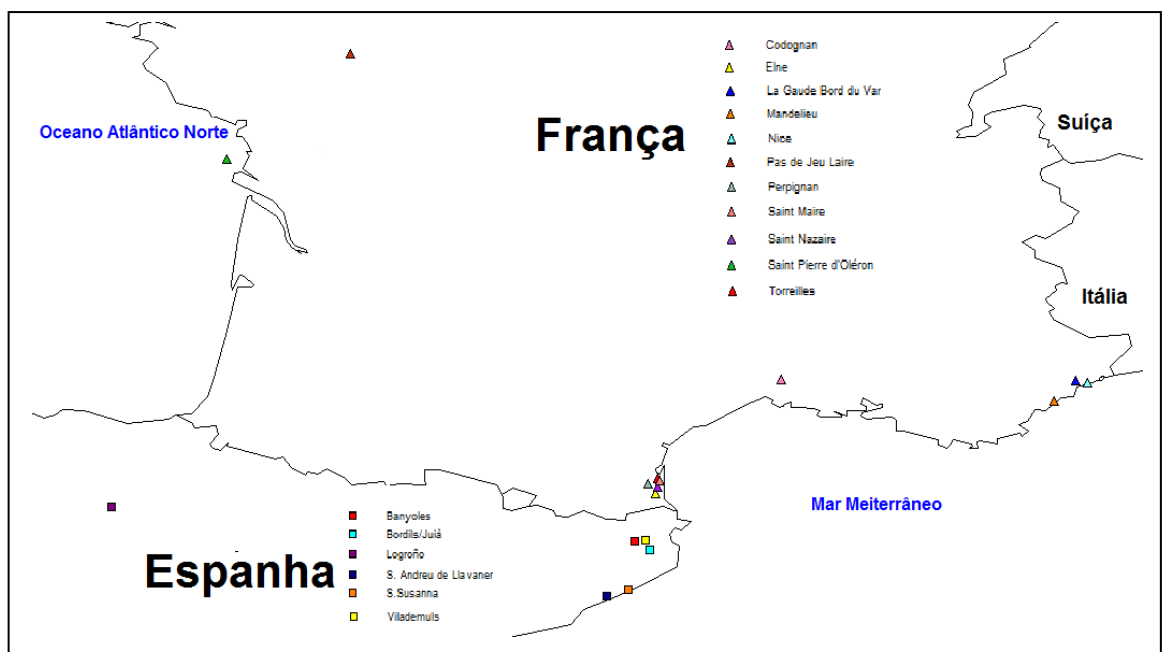


Figura 3.2. Mapa do mundo. **A.** Indicação dos pontos de coleta das populações de *Tetranychus urticae*. **B.** Detalhe com os pontos de coleta na França e Espanha.

Tabela 3.1. Procedência das amostras de *Tetranychus urticae* coletadas no Brasil, com o código da sequência, informações sobre a planta hospedeira, data de coleta e região do DNA ribossômico e/ou mitocondrial amplificada.

Código	Localidade				Planta hospedeira			Data de coleta	Região amplificada
	UF	Município	Longitude	Latitude	Nome científico	Nome vulgar	Família		
1	DF	Brasília - Embapa Cenargen	-47,9167	-15,7833	<i>Phaseolus vulgaris</i> L.	Feijão	Fabaceae	01/10/2004	ITS
2	DF	Brasília - Embapa Cenargen	-47,9167	-15,7833	<i>Fragaria x ananassa</i> Duch.	Morango	Rosaceae	01/10/2004	ITS
166	DF	Brasília - Embrapa Cenargen	-47,9167	-15,7833	<i>Solanum lycopersicum</i> L.	tomate - estufa	Solanaceae	21/05/2007	ITS
167	DF	Brasília - Embrapa Cenargen	-47,9167	-15,7834	<i>Fragaria x ananassa</i> Duch.	morango - estufa	Rosaceae	21/05/2007	ITS
169	DF	Brazlândia	-48,2000	-15,6833	<i>Solanum lycopersicum</i> L.	tomate	Solanaceae	22/06/2007	ITS
172	DF	Brazlândia	-48,2000	-15,6835	<i>Solanum lycopersicum</i> L.	tomate	Solanaceae	02/07/2007	ITS
171	DF	Brazlândia	-48,2000	-15,6834	<i>Fragaria x ananassa</i> Duch.	morango	Rosaceae	02/07/2007	ITS
8	DF	Planaltina - Taquara	-47,5120	-15,6399	<i>Solanum melongena</i> L.	Berinjela	Solanaceae	17/11/2005	ITS
69	MG	Estiva - Olaria	-46,0172	-22,4628	<i>Fragaria x ananassa</i> Duch.	Morango	Rosaceae	13/01/2006	ITS
175	PE	Recife - Faz. Mumbecas	-34,9166	-7,8237	<i>Carica papaya</i> L.	mamão	Caricaceae	13/06/2007	ITS -COI
188	PE	Recife - UFRPE	-34,9166	-7,8237	<i>Solanum americanum</i> Mill.	Maria-pretinha	Solanaceae	24/09/2007	ITS
179	RR	Boa Vista	-60,9833	1,9333	<i>Manihot esculenta</i> Crantz	mandioca	Euphorbiaceae	18/05/2007	ITS
186	RS	Bela Vista - Três Passos	-53,8978	-27,4800	<i>Fragaria x ananassa</i> Duch.	morango	Rosaceae	28/09/2007	ITS
184	RS	Bela Vista - Três Passos	-53,8978	-27,4800	<i>Cucumis sativus</i> L.	pepino	Cucurbitaceae	28/09/2007	ITS
161	RS	Passo Fundo - Embrapa Trigo	-52,4000	-28,2667	<i>Triticum vulgare</i> L.	Trigo	Poaceae	27/09/2006	ITS
185	RS	Santa Maria _UFSM	-53,8333	-29,6833	<i>Parthenium</i> sp.	partenium	Asteraceae	26/09/2007	ITS
183	RS	Sobradinho	-53,0286	-29,4214	<i>Fragaria x ananassa</i> Duch.	morango	Rosaceae	27/09/2007	ITS
174	SP	Mogi Mirim	-46,9422	-22,3722	<i>Gossypium hirsutum</i> L.	algodão	Malvaceae	2005	ITS
126	SP	Monte Alegre do Sul	-46,6833	-22,6819	<i>Fragaria x ananassa</i> Duch.	Morango	Rosaceae	24/04/2006	ITS
180	SP	Piracicaba - Beira Rio	-47,6492	-22,7253	<i>Carica papaya</i> L.	mamão	Caricaceae	05/07/2007	ITS
127	SP	Presidente Prudente	-51,3836	-22,1178	<i>Carica papaya</i> L.	Mamão	Caricaceae	24/04/2006	ITS
128	SP	Serra Negra	-46,7014	-22,6097	<i>Fragaria x ananassa</i> Duch.	Morango	Rosaceae	24/04/2006	ITS

Tabela 3.2. Procedência das amostras de *Tetranychus urticae* coletadas na Região Paleártica e no Canadá, com o código da sequência, informações sobre a planta hospedeira, data de coleta e região do DNA ribossômico e/ou mitocondrial amplificada.

Código	País	Localidade		Planta hospedeira			Data	Região amplificada		
		Região/Departamento/Província	Município	Longitude	Latitude	Nome científico			Nome vulgar	Família
REF.	FR	Languedoc Roussillon	Pyrénées-Orientales	Elne	2,9682	42,5992	<i>Nerium oleander</i> L.	espírradeira	Apocynaceae	ITS-COI
20_2	FR	Poitou-Charentes	Charente-Maritime	Pas-de-Jeu-Laire	-0,0668	46,9758	<i>Solanum dulcamara</i> L.	dulcamara	Solanaceae	ITS
26_2	FR	Languedoc Roussillon	Pyrénées-Orientales	Torreilles	2,9928	42,7557	<i>Prunus cerasus</i> L.	cereja	Rosaceae	ITS
6_1	FR	Languedoc Roussillon	Pyrénées-Orientales	Elne	2,9682	42,5992	<i>Nerium oleander</i> L.	espírradeira	Apocynaceae	ITS-COI
7_2	FR	Poitou-Charentes	Charente-Maritime	Saint Pierre d'Oléron	-1,2952	45,9332	<i>Datura stramonium</i> L.	estramônio	Solanaceae	ITS
8_1	FR	Poitou-Charentes	Charente-Maritime	Saint Pierre d'Oléron	-1,2952	45,9332	<i>Solanum nigrum</i> L.	erva-moura	Solanaceae	ITS
12_1	FR	Languedoc Roussillon	Pyrénées-Orientales	Perpignan	2,8941	42,7016	<i>Datura stramonium</i> L.	figueira-brava	Solanaceae	ITS-COI
24_3	FR	Languedoc Roussillon	Pyrénées-Orientales	Saint Nazaire	2,9909	42,6693	<i>Datura stramonium</i> L.	figueira-brava	Solanaceae	ITS-COI
116_2	FR	Prov-Alp-Côte d'Azur	Alpes Maritimes	La Gaude-Bord du Var	7,1509	43,7225	<i>Urtica dioica</i> L.	urtiga	Urticaceae	ITS-COI
117_1	FR	Prov-Alp-Côte d'Azur	Alpes Maritimes	Mandelieu-La Napoule	6,9416	43,5236	<i>Aristolochia sp.</i>	aristolóquia	Aristolochiaceae	ITS
119_1	FR	Prov-Alp-Côte d'Azur	Alpes Maritimes	Mandelieu-La Napoule	6,9416	43,5236	<i>Viola sp.</i>	amor perfeito	Violaceae	ITS
120_1	FR	Prov-Alp-Côte d'Azur	Alpes Maritimes	Nice-F. Bertaux	7,2662	43,7034	<i>Phaseolus vulgaris</i> L.	feijão	Fabaceae	ITS-COI
Ma_1	FR	Languedoc Roussillon	Pyrénées-Orientales	Saint Maire	3,0159	42,7268	<i>Datura stramonium</i> L.	estramônio	Solanaceae	ITS
TurtCod	FR	Languedoc Roussillon	Gard	Codognan	4,2197	43,7324	<i>Solanum melongena</i> L.	berinjela	Solanaceae	COI
Cod 2	FR	Languedoc Roussillon	Gard	Codognan	4,2197	43,7324	<i>Solanum melongena</i> L.	berinjela	Solanaceae	COI
40_3	ES	Catalunha - Girona	Girona	Banyoles	2,7647	42,1181	<i>Solanum lycopersicum</i> L.	tomate	Solanaceae	ITS
Ba_1	ES	Catalunha - Girona	Girona	Banyoles	2,7647	42,1181	<i>Solanum lycopersicum</i> L.	tomate	Solanaceae	ITS
41_2	ES	Catalunha - Girona	Girona	Vilademuls/Galliners	2,8740	42,1336	<i>Solanum lycopersicum</i> L.	tomate	Solanaceae	ITS-COI
42_1	ES	Catalunha - Girona	Girona	Bordils/Juià	2,9151	42,0369	<i>Solanum lycopersicum</i> L.	tomate	Solanaceae	ITS-COI
Ej_1	ES	Catalunha - Girona	Girona	Bordils/Juià	2,9151	42,0369	<i>Solanum lycopersicum</i> L.	tomate	Solanaceae	ITS-COI
43_1	ES	Catalunha - Barcelona	Barcelona	S. Andreu de Llavaneres	2,4815	41,5724	<i>Solanum nigrum</i> L.	erva-moura	Solanaceae	ITS-COI
44_2	ES	Catalunha - Barcelona	Barcelona	S. Andreu de Llavaneres	2,4815	41,5724	<i>Solanum lycopersicum</i> L.	tomate	Solanaceae	ITS
El_1	ES	Catalunha - Barcelona	Barcelona	S. Andreu de Llavaneres	2,4815	41,5724	<i>Solanum lycopersicum</i> L.	tomate	Solanaceae	ITS
097_1	ES	Ilhas Canárias	Ténérife	Santiago del Teide/Finca	-16,8145	28,2961	<i>Musa acuminata</i> Colla	banana	Musaceae	ITS-COI
116_2	ES	Ilhas Canárias	Ténérife	Granadilla de Abona	-16,5632	28,0709	<i>Solanum lycopersicum</i> L.	tomate	Solanaceae	ITS-COI
119_2	ES	Ilhas Canárias	Ténérife	Arico, Playa del Rio	-16,4794	28,1778	<i>Solanum lycopersicum</i> L.	tomate	Solanaceae	ITS-COI
119_3	ES	Ilhas Canárias	Ténérife	Arico, Playa del Rio	-16,4794	28,1778	<i>Solanum lycopersicum</i> L.	tomate	Solanaceae	COI
128_2	ES	Ilhas Canárias	Gran Canaria	Agüimes, Playa	-15,4456	27,9041	<i>Solanum lycopersicum</i> L.	tomate	Solanaceae	ITS-COI
8_2_07	ES	Catalunha - Barcelona	Barcelona	S.Susanna/C. de la Riera	2,7021	41,6431	<i>Solanum melongena</i> L.	berinjela	Solanaceae	ITS-COI
La Rioja	ES	La Rioja	Logroño		2,4723	42,4555	desconhecido			ITS
13_1	GR	Départ. du Lassithi	Ierapetra		25,7431	35,0230	<i>Solanum melongena</i> L.	berinjela/estufa	Solanaceae	ITS-COI
30_4	NO		Sogndal	Sogndal West	7,1012	61,2307	<i>Fragaria x ananassa</i> Duch.	morango	Rosaceae	ITS
38_2	PL		Varsovie	Warszawa	21.02	52.2599	<i>Fragaria vesca</i>		Rosaceae	ITS
Sy1_2	SY	Al Lathqiyah	Lathaqqiyah	Al Baqqah	37,0500	36,6167	<i>Solanum lycopersicum</i> L.	tomate	Solanaceae	ITS
Sy2_1	SY	Dar'a			35,8333	35,5000	<i>Solanum melongena</i> L.	berinjela	Solanaceae	ITS
141_7	TN	Grombalia		Nabeul	10,7351	36,4506	<i>Solanum nigrum</i> L.	erva-moura	Solanaceae	ITS
London/1	CA	Ontário		Vineland	-79,3931	43,1551	Criação referência/Projeto	GENOMA		ITS

De cada amostra de *T. urticae* foram separados de 50 a 100 exemplares destinados às análises moleculares. Para preservação do DNA, os ácaros foram acondicionados em álcool absoluto no microtubo, tipo *ependorf*, com capacidade de 1,5 ml. Os microtubos foram etiquetados com o número da amostra e foram colocados em caixas de polipropileno tampadas e armazenados em freezer (Brastemp) a temperatura constante de -20°C , até a extração de DNA. Espécimes de todas as amostras submetidas a análises moleculares foram montados em lâminas de microscopia e identificados com base em caracteres morfológicos (Capítulo 1).

3.2.2. Análises moleculares do DNA - extração, amplificação e sequenciamento

3.2.2.1. Extração do DNA

O DNA genômico de *T. urticae* foi extraído utilizando o kit de extração *DNeasy Tissue Kit* (Qiagen) – Protocolo para cultura de células animais adaptado à extração de DNA total de pequenos artrópodes. Diversos procedimentos foram realizados para ajustar a técnica de extração de DNA em *T. urticae* com o *DNeasy Tissue Kit* (Qiagen) em virtude do surgimento de dificuldades iniciais relacionadas com a conservação do material, provável degradação do DNA e ausência de amplificação do DNA mitocondrial nas populações de *T. urticae* coletadas no Brasil. Foram feitas alterações no protocolo de extração, testadas novas enzimas *Taq* polimerase (PROMEGA, Envitrogen e TaKaRa), novos *primers* foram desenhados e testados, as condições de PCR (*Polymerase Chain Reaction*) foram otimizadas e foram conduzidos ensaios de gradientes de temperatura, enfim uma série de procedimentos foram adotados visando o aperfeiçoamento das técnicas moleculares para obtenção e amplificação do DNA. Cerca de 50 % do montante das amostras de *T. urticae* obtidas inicialmente foram utilizadas nessa etapa de testes. O protocolo descrito abaixo foi considerado o mais adequado para a obtenção de DNA com pureza e quantidade necessárias aos procedimentos para de biologia molecular e

identificação de marcadores específicos para as populações em estudo. O protocolo foi definido objetivando a extração de DNA de um único indivíduo. Foram separados cinco indivíduos de cada amostra. Os microtubos contendo um ácaro cada um foram centrifugados com a tampa aberta durante três minutos a 13.000 rotações por minuto (rpm) para a retirada do excesso de etanol da amostra (Centrífuga marca Eppendorf modelo 5415C). Em seguida, para eliminar os resíduos de etanol, os microtubos foram transferidos para a centrífuga à vácuo, *speed-vac*, à temperatura ambiente por cinco minutos (Eppendorf Vacufuge Concentrator - Modelo 5301). Com os microtubos no gelo, uma solução tampão fosfato - PBS - (90µl) foi adicionada aos tubos, tomando-se o cuidado para que os ácaros, intactos, permanecessem imersos na solução. Adicionou-se, então, 10µL de proteinase K, seguida de 100 µL de tampão AL. A solução foi completamente homogeneizada com um vórtex mantendo-se o tubo na posição vertical. Para garantir a submersão dos ácaros na solução, os tubos foram centrifugados por 1 minuto a 13.000 rpm. Em seguida, foi efetuada a agitação manual delicada dos tubos para homogeneizar novamente a mistura. Os ácaros foram incubados por 1:00 a 3:00 horas a 70°C. Após a incubação, os microtubos foram centrifugados por 1 minuto a 8000 rpm. Então, 100µL de etanol absoluto foram adicionados ao tubo e misturados à solução, utilizando-se o vórtex. A mistura foi transferida para uma coluna *DNeasy* colocada sobre um tubo de coleta de 2 mL e centrifugada a 8.000 rpm por 1 min. A solução que passou pela coluna e o tubo de coleta foram descartados e a coluna transferida para um novo tubo coletor de 2 mL. Foi adicionado ao tubo 250 µL de tampão AW1 e o tubo foi centrifugado a 8.000 rpm durante 1 min. A coluna foi transferida para um novo tubo coletor de 2 mL, recebeu 250 µL de tampão AW2 e foi centrifugada a 13.000 rpm por 3, min, para eliminar todo o etanol antes da eluição. A coluna foi, então, acoplada a um microtubo de 1,5mL e 50 µL de água ultrapura foram colocados sobre a membrana da coluna. Os tubos permaneceram durante 10 minutos no gelo e em seguida foram centrifugados, a 8.000 rpm, por 2 min. Após a extração, os tubos foram armazenados a -20°C.

3.2.2.2. Amplificação através da Reação em Cadeia da Polimerase - PCR (*Polymerase Chain Reaction*)

Após a extração, dois fragmentos do DNA foram amplificados para cada indivíduo: a região intergênica ITS (18S-ITS1-5.8S-ITS2-28S), do inglês, *Internal non coding Transcribed Spacer*, do DNA ribossômico e a região *Citocromo Oxidase I (COI)* do DNA mitocondrial. A reação de amplificação, utilizando-se a técnica de PCR, foi realizada em um volume final de 25 μ L contendo 2.5 μ L de tampão 10x *Taq* DNA Polymerase (Qiagen), 0.13 un/ μ L (5 unidades) de *Taq* DNA Polymerase (Qiagen), 2 μ L de dNTP (2,5 mM de cada base), 0.5 μ M de cada oligonucleotídeo iniciador *primer* (10 μ M), 2 μ l of $MgCl_2$ (25 mM), 15.37 μ L ou 13.37 μ L de água e 2 ou 4 μ L do DNA a ser amplificado para ITS e *COI*, respectivamente.

O termociclador (Eppendorf – Mastercycler 5333) utilizado na amplificação do DNA foi programado com o seguinte perfil de amplificação: as amostras foram desnaturadas a 94 °C durante 3 min e submetidas a 35 ciclos de PCR, sendo 1 min de desnaturação a 94 °C, 1 min de anelamento a 51 °C e 1,5 min de extensão a 72 °C, finalizando com 72 °C por 10 min, baixando a 10 °C até a retirada da amostras.

Ao término da PCR adicionou-se o tampão de amostra a 5 μ l do produto de PCR e os respectivos fragmentos foram então separados por eletroforese em gel de agarose a 1%. Em seguida, foram corados em solução contendo 0,01% de brometo de etídio em 0,5x de tampão TBE (45mM tris base, 45 mM ácido bórico e 1mM EDTA, ph 8.0) e visualizados em um fotodocumentador sob transiluminação ultravioleta.

Os oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) direto e reverso usados foram o 18S e o 28SC para a região ITS (Navajas *et al.* 1998). Os *primers* utilizados para amplificar o fragmento *COI* foram o C1J1718 (Navajas & Boursot 2003) e o 773 (Navajas & Boursot 2003) (Tabela 3.3; Figura 3.3).

3.2.2.3. Sequenciamento das regiões ITS e COI

Os dois fragmentos ITS e COI foram sequenciados utilizando-se o método “BigDye Terminator” (Perkin Elmer, Foster City, CA) em um sequenciador de DNA automatizado ABI PRISM 3700 (Applied Biosystems Inc.).

Ambos os *primers* (extremidades 3´ e 5´) utilizados no PCR para a região ITS foram utilizados para o sequenciamento. Adicionalmente, foram utilizados dois outros *primers* internos (InternalS e o InternalSRev) que juntos possibilitaram o sequenciamento da região ITS completa (\approx 1200 pares de base). Esses *primers* foram definidos em regiões altamente conservadas da região ITS, flanqueando os genes 5,8S e 28S (Navajas *et al.* 1994). Da mesma forma, para o sequenciamento da região COI (\approx 890 pares de base) foram utilizados dois *primers* adicionais, o IntCOI e o IntCOI/Rev, além daqueles utilizados na amplificação do fragmento do DNA (Tabela 3.3; Figura 3.3).

Para a produção do sequenciamento das regiões ITS e COI foram conduzidas cinco reações de PCR por amostra de DNA e o produto obtido foi reunido, quantificado e enviado diretamente para o sequenciamento.

As distintas sequências distintas obtidas da região ITS e COI de *T. urticae* serão depositadas no GeneBank. Os alinhamentos de todas as sequências estão disponíveis com R. S. de Mendonça e D. Navia nos endereços renatasm@cenargen.embrapa.br e navia@cenargen.embrapa.br, respectivamente.

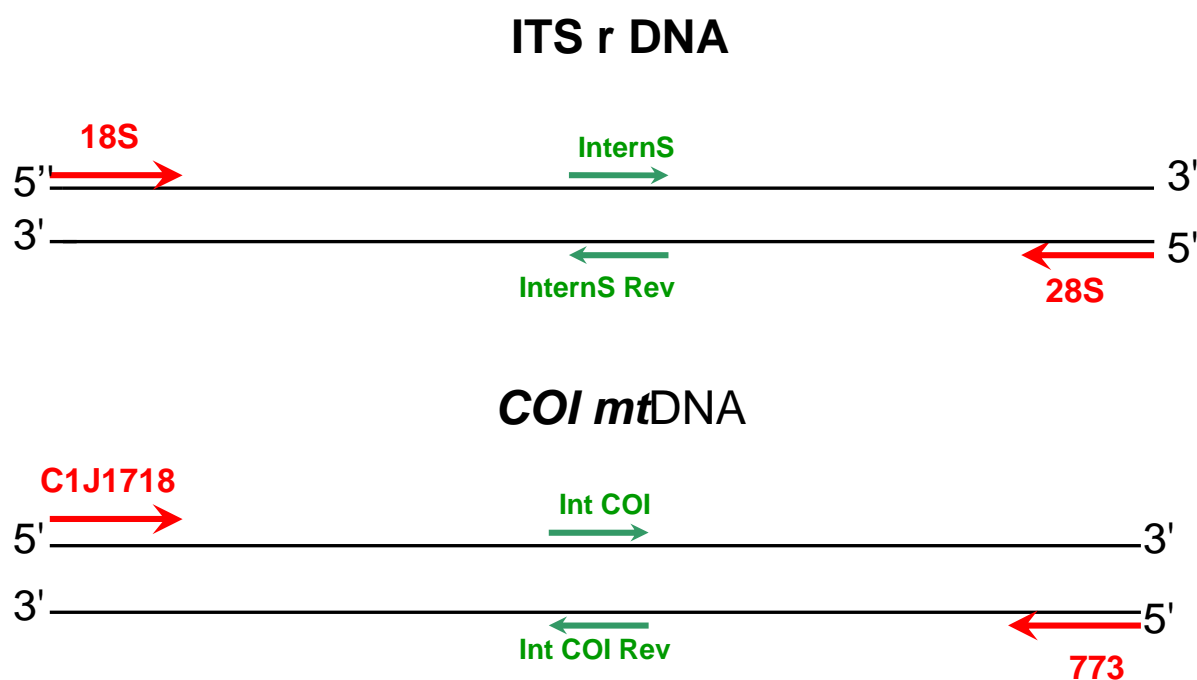


Figura 3.3. Fragmentos amplificados, direção e *primers* utilizados na amplificação e sequenciamento das regiões ITS e COI no estudo de *Tetranychus urticae*.

Tabela 3.3. Fragmentos amplificados e sequência dos *primers* utilizados na amplificação por PCR e no seqüenciamento, no estudo das populações de *Tetranychus urticae*.

<i>Fragmento amplificado</i>	<i>Primers</i>	<i>Sequência</i>	<i>Localização</i>	<i>Utilização</i>
	18S	5'-AGAGGAAGTAAAAGTCGTAACAAG-3'	3' of 18S	PCR/Sequenciamento
rDNA	28SC	5'-ATATGCTTAAATTCAGCGGG-3'	5' of 28SC	PCR/Sequenciamento
ITS	InternS	5'-GATCACTCGAATTACCAATCG-3'	5.8S-InternS	Sequenciamento
	InternSBis	5'-CTGTCTGAGAGTTGAGAAGTG-3'	5.8S InternSRev	Sequenciamento
mtDNA	C1J1718	5'-GGAGGATTTGGAAATTGATTAGTTCC-3'	C1J 1718	PCR/Sequenciamento
	IntCOI Rev	5'-TACAGCTCCTATAGATAAAAC-3'	773	PCR/Sequenciamento
	IntCOI	5'-GGNGANCCTATTTTATATCAAC-3'	IntCOI	Sequenciamento
	IntCOI Rev	5'-GTTGATATAAAATAGGNTCNCC-3'	IntCOI/Ver	Sequenciamento

3.2.3. Análises das sequências

O consenso e o alinhamento das novas sequências ITS e *COI* foram realizados utilizando-se o programa SeqScape versão 2.5 (Applied Biosystem Inc.). Para o alinhamento múltiplo das novas sequências e daquelas de *T. urticae* disponíveis no GenBank foi utilizado o programa *Clustal W Multiple Alignments* (Thompson *et al.* 1994) implementado no programa BIOEDIT (Hall 1999).

3.2.3.1. Estatística descritiva

O estudo da diversidade genética intra e inter-populações têm sido de grande interesse nos estudos de filogenia, filogeografia e evolução de espécies.

O programa DnaSP versão 4.50 (Rozas *et al.* 2003) foi utilizado para estimar os seguintes parâmetros nas sequências analisadas: nº total de sítios variáveis; sítios polimórficos e sítios informativos por parcimônia; diversidade nucleotídica (Pi) - número médio de diferenças de nucleotídeos por sítio entre as sequências escolhidas aleatoriamente; número médio de diferenças nucleotídicas (k) – média das diferenças nucleotídicas entre pares de sequências tomadas ao acaso na população amostrada; diversidade haplotípica, (Hd) – medida de variação genética que considera o número real de mudanças de bases entre as sequências (é a probabilidade de duas sequências aleatórias de uma população, serem diferentes dentro da população) e; número de haplótipos¹ na população (h).

A distribuição e a frequência dos haplótipos de *T. urticae* nas diferentes regiões geográficas foram inferidas para as regiões ITS e *COI* e estimadas pelo programa DnaSP versão 4.50 (Rozas *et al.* 2003).

¹ Haplótipo – combinação de polimorfismos do DNA (sequências de nucleotídeos) transmitidos em conjunto para os descendentes; constituição genética de um indivíduo com relação a um dos membros de um par de genes de alelos.

3.2.3.2. Distância genética

O programa MEGA foi utilizado para estimar a distribuição e a frequência da distância genética para os pares das sequências ITS e também para as sequências *COI* de *T. urticae* estudadas. As sequências foram analisadas para gerar uma matriz de distância molecular (matriz de distância dos pares) utilizando o modelo distância Kimura 2-Parâmetros (Kimura 1980; Tamura *et al.* 2007).

3.2.3.3. Análises filogenéticas

Para a determinação das relações filogenéticas entre as sequências ITS de *T. urticae*, assim como também para as sequências *COI* foi utilizado o programa MEGA4 (Tamura *et al.* 2007). As análises filogenéticas das sequências ITS e *COI* foram obtidas pelo método de Neighbor Joining (Saito & Nei 1987) utilizando o modelo de distância Kimura 2-Parâmetros (Kimura 1980; Tamura *et al.* 2007). Para a determinação dos limites de confiança nas ramificações, os dados foram submetidos ao teste de *bootstrap* (Felsenstein, 1985) para 1.000 replicações e os valores são apresentados em porcentagem próximo aos ramos. Outros modelos foram testados mas as diferenças não foram significativas.

3.2.3.4. Análise de variância molecular (AMOVA) e estrutura genética

A diferenciação genética das populações de *T. urticae* foi analisada usando a Análise de Variância Molecular (AMOVA) das diferenças do conteúdo e frequência dos alelos dos haplótipos (Excoffier *et al.* 1992) e por meio das estimativas do *Fst* (Weir & Cockerhan 1984) implementada no programa Arlequin versão 3.1 (Excoffier *et al.* 2005). A significância desses testes foi verificada pelo método de permutações aleatórias com 1.000 e 10.000 permutações respectivamente. A magnitude da diferenciação genética entre os

grupos foi determinada segundo a definição de Wright (1978) que a caracterizou como baixa ($F_{st} = 0$ a $0,05$), moderada ($F_{st} = 0,05$ a $0,15$), alta ($F_{st} = 0,15$ a $0,25$) e muito alta ($F_{st} > 0,25$). Para estimar a diferenciação entre as populações utilizou-se o Teste Exato de Diferenciação entre as Amostras com base na frequência dos haplótipos, um teste global de diferenciação entre as amostras que testa a hipótese de distribuição aleatória entre os pares de populações como descrito por Raymond & Rousset (1995) e Goudet *et al.* (1996), com 100.000 passos em Markov Chain, no programa Arlequin v. 3.1.

Para verificar se a estruturação ocorre em decorrência de variações geográficas ou em função das plantas hospedeiras colonizadas pelos ácaros foram analisadas conjuntamente as 20 novas sequências do *COI* do DNA mitocondrial obtidas mais aquelas de *T. urticae* depositadas no GenBank ($n=37$), totalizando 57 sequências de espécimes de localidades e hospedeiros diferentes coletadas em varias regiões mundo (Tabela 3.3).

A análise da variância molecular (AMOVA) foi realizada de quatro maneiras diferentes. Na primeira análise, utilizou-se a hierarquia da região para a separação das populações dentro de um grupo, e foram formados dois conjuntos de populações denominados: região Mediterrânea com 28 sequências e região Asiática com 25 sequências. Esses dois grupos foram escolhidos por possuírem o maior número de populações coletadas nas suas respectivas áreas geográficas. O conjunto denominado região Mediterrânea foi constituído por populações coletadas nos países banhados pelo mar Mediterrâneo e cinco populações coletadas nas Ilhas Canárias. Na segunda análise, foram avaliadas as populações por região e suas respectivas famílias de plantas hospedeiras, assim as populações da região Mediterrânea foram comparadas entre si separadas por conjuntos de plantas hospedeiras. Os grupos foram formados pela respectiva família botânica de cada planta hospedeira. A terceira análise comparou as populações da região Asiática agrupadas por plantas hospedeiras. Essas duas últimas análises foram realizadas para testar o efeito das plantas hospedeiras dentro de cada região. Na quarta análise foram comparadas as populações da Ásia, Mediterrâneo,

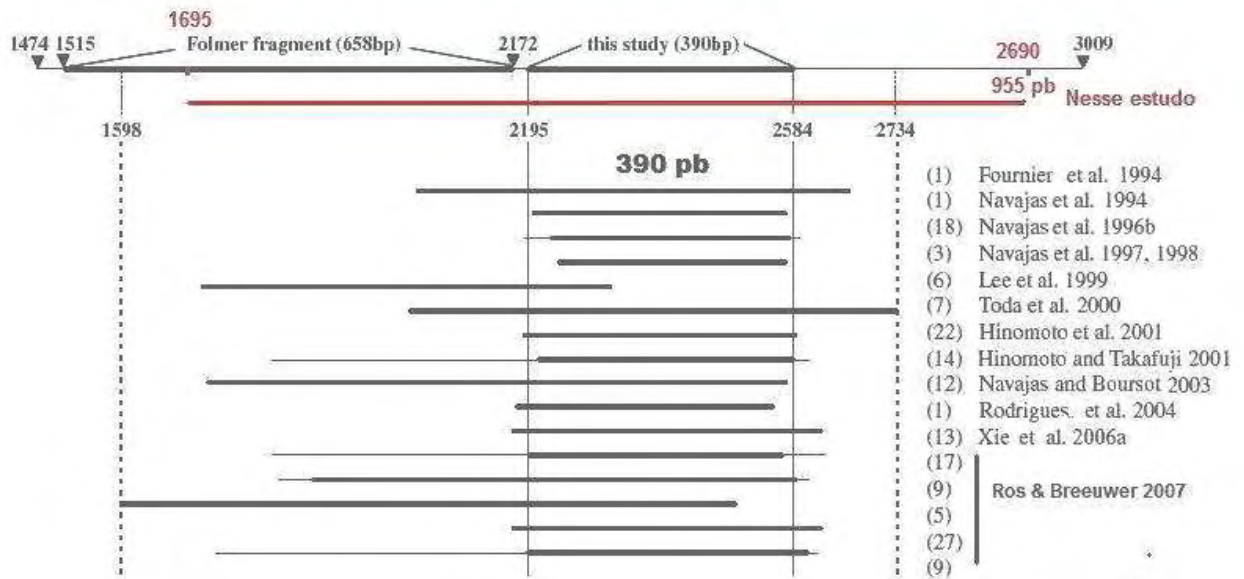
Brasil e Holanda, todas formando conjuntos separados dentro de um mesmo grupo.

3.2.3.5. Conjunto de dados formado pelas sequências ITS (rDNA) e COI (mtDNA)

As sequências da região ITS depositadas no GenBank (ANEXO 1) possuem tamanhos diferentes em função da combinação dos *primers* utilizados nos diferentes estudos. Para as análises inferidas das regiões ITS completa (18S-ITS1_5.8S-ITS2-28S) e ITS1 foram utilizadas 59 sequências (55 obtidas nesse estudo e quatro do GenBank). A região ITS2 possibilitou um arranjo final de dados de 82 sequências (55 desse estudo e 27 do GenBank).

Nas sequências COI recolhidas do GenBank (ANEXO 2), além da diferença no comprimento houve variação no posicionamento do fragmento amplificado na região COI (Figura 3.4). Para padronizar o comprimento das sequências foi utilizado um fragmento central de 390 pb e o conjunto de dados foi constituído por 57 sequências, sendo 20 desse estudo e 37 do GenBank.

Todas as sequências de *T. urticae* foram recolhidas do GenBank no dia 20 de março de 2008.



Fonte: Modificado de Ros & Breeuwer (2007)

Figura 3.4. Diferentes comprimentos do fragmento *COI* do DNA mitocondrial obtidos nos diversos estudos e sua relação relativa no alinhamento. O comprimento do fragmento analisado nesse estudo está destacado em vermelho. O comprimento total do gene *COI* (posições 1.474 – 3.009) está indicado acima. Para cada estudo as linhas horizontais mais grossas representam o fragmento sequenciado em todas as espécies e a linha fina indica o comprimento máximo da seqüência. O número de seqüências dos respectivos estudos e as referências estão listadas à direita.

3.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O sequenciamento completo das regiões ITS1, 5.8S rRNA e ITS2 do DNA ribossômico incluindo um fragmento parcial dos genes 18S e 28S do rRNA foi obtido para 55 sequências inéditas de *T. urticae* coletadas em diferentes espécies de plantas hospedeiras em oito países, incluindo 22 populações do Brasil (Tabela 3.1 e 3.2).

Para o gene mitocondrial foram obtidas sequências parciais da região *Citocromo Oxidase I* (COI), de 20 espécimes de *T. urticae* coletados em diferentes plantas hospedeiras em três países (Tabela 3.1 e 3.2). Entre as populações coletadas no Brasil, o DNA mitocondrial de um único indivíduo foi sequenciado, em virtude das dificuldades encontradas para amplificar a região COI nas populações brasileiras. De um modo geral, a eficiência do protocolo de extração e dos *primers* utilizados na amplificação da região COI foi de 40%. Nessa etapa do trabalho (extração, amplificação e sequenciamento) vários procedimentos foram testados com intuito de se maximizar o número de indivíduos sequenciados do Brasil, entretanto, as medidas foram ineficazes para as populações brasileiras. Os resultados obtidos demonstraram que é necessário o estabelecimento de novos protocolos e *primers* diferenciados para o estudo da região COI de populações de *T. urticae* originárias do Brasil.

Para a amplificação da região ITS, a eficiência do protocolo e dos respectivos *primers* utilizados foi de 80%.

Os resultados das atividades relacionadas às análises moleculares foram baseados em uma concentração de DNA, resultante da extração de um único indivíduo, que variou de 0,5 a 6 ng/ μ L.

3.3.1. Região ITS do DNA ribossômico

O comprimento da região ITS1 variou de 484 a 508 pares de bases (pb) e a região ITS2 de 464 a 488 pb. O comprimento do gene 5.8S foi fixado em 150 pb em todos os espécimes analisados. O gene 18S apresentou entre 32 a 40 pb e o 28S, 30 a 32 pb. O fragmento completo foi de 1010 a 1218 pb.

O comprimento das sequências ITS1 e ITS2 obtidas de *T. urticae* apresentaram a mesma extensão que a de outros tetraniquídeos já relatado na literatura (Navajas *et al.* 1999; Osakabe *et al.* 2002; Ben-David *et al.* 2007).

A obtenção do fragmento completo permitiu a realização de análises filogenéticas considerando as regiões ITS (18S-ITS1-5.8S-ITS2-28S), ITS1 e a ITS2 de forma a se avaliar se essas regiões separadamente seriam informativas para os estudos de variabilidade e estrutura genética das populações de *T. urticae*. Para as regiões ITS (18S-ITS1-5.8S-ITS2-28S) e ITS1 foram analisadas 59 sequências (55 desse estudo e quatro do GenBank), cujo o comprimento final utilizado no alinhamento foi de 1225 e 517 pares de bases, respectivamente. O maior agrupamento de sequências foi obtido para a região ITS2 (55 inéditas e 27 do GenBank), cujo comprimento final foi de 488 pb. A maioria das sequências da região ITS depositadas no GenBank (ANEXO 1) para *T. urticae* são da região ITS2. Durante o alinhamento das sequências foram observadas inserções e deleções, entretanto, todos os alinhamentos foram executados com êxito e as informações descritivas e os índices de diversidade molecular estão resumidos na Tabela 3.4.

A comparação intraespecífica foi estimada para as regiões ITS, ITS1 e ITS2 do DNA ribossômico separadamente (Tabela 3.4). O número de sítios polimórficos, o número médio de diferenças de nucleotídeos (K) e a diversidade de nucleotídeos (Pi) indicaram que a variabilidade da região ITS1 foi superior àquela encontrada para a região ITS2. Os valores da diversidade de nucleotídeos (Pi) foram baixos e variaram de 0,07% (ITS2) a 0,63% (ITS1). Navajas & Boursot (2003) analisando um conjunto de 15 sequências de *T. urticae* encontraram variação reduzida na região ITS2 (Pi < 0,5%).

Tabela 3.4. Análises descritivas e índices de diversidade molecular. Informações intraespecíficas baseadas nas regiões ITS (18S-ITS1-5.8S-ITS2-28S), ITS1 e ITS2 do DNA ribossômico para as sequências de espécimes de *Tetranychus urticae*.

Região	Nº Sequências	Sítios analisados (pb)	InserçõesD eleições (pb)	Tamanho analisado (pb)	Sítios invariáveis (pb)	Sítios variáveis (pb)	Sítios informativos parcimônia (pb)	Sítios polimórficos (pb)	K	Pi
ITS	59	1225	182	1043	1006	24	13	37	3,57	0,0034
ITS1	59	517	44	473	448	15	10	25	2,96	0,0063
ITS2	82	488	34	454	443	9	2	11	0,32	0,0007

ITS= fragmento 18S-ITS1_5.8S-ITS2-28S; **K** = número médio de diferenças de nucleotídeos; **PI**= diversidade de nucleotídeos.

A distância genética dos pares de base foi calculada para a região ITS, ITS1 e ITS2, utilizando-se o modelo Kimura 2-Parâmetros (Figura 3.5). A amplitude da variação entre as distâncias e a frequência relativa dos pares diferiu para os três fragmentos analisados nas sequências de *T. urticae*. Os valores observados variaram de 0 a 1,5% e de 0 a 1,7% para ITS e ITS1, respectivamente e foi menor para a região ITS2, de 0 a 0,9%.

Considerando a maior variação observada para as sequências ITS (18S-ITS1_5.8S-ITS2-28S) e ITS1 foram conduzidas análises filogenéticas utilizando o algoritmo de Neighbor-Joining (NJ) (Saitou & Nei 1987) modelo de distância Kimura 2-Parâmetros com as respectivas sequências dessas duas regiões, separadamente.

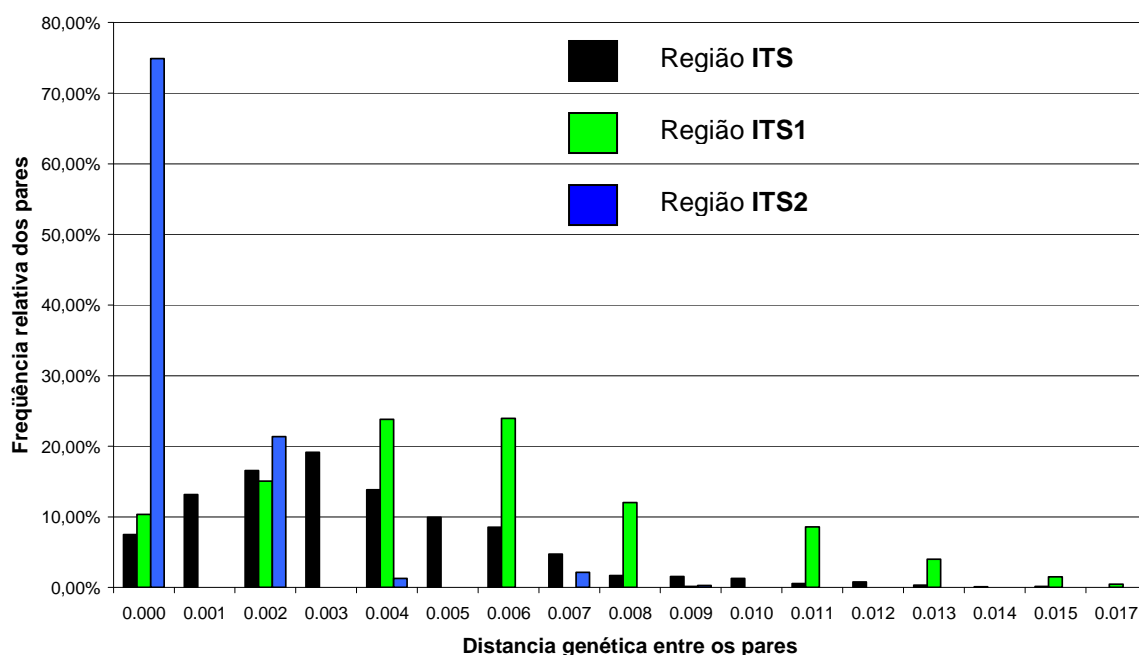


Figura 3.5. Distribuição da distância genética entre os pares baseada nas sequências das regiões ITS (18S-ITS1-5.8S-ITS2-28S), ITS1 e ITS2 do rDNA do ácaro rajado, *Tetranychus urticae*, utilizando-se o modelo de distância Kimura 2-Parâmetros.

Os resultados da filogenia mostraram ramificações pouco consistentes nas quais se agruparam sequências de espécimes de *T. urticae* de diferentes regiões e plantas hospedeiras indistintamente. Não foram detectadas evidências de associação a plantas hospedeiras ou a um padrão geográfico na estruturação das populações de *T. urticae* nas análises filogenéticas inferidas a partir de sequências da região ITS e ITS1, exceto um frágil agrupamento que indicou uma tendência de estrutura geográfica entre as populações coletadas nas Ilhas Canárias, quando foram analisadas as sequências dessas duas regiões. Uma única sequência do ácaro da Grécia coletado em berinjela permaneceu isolada. Todavia, os valores de *bootstrap* foram sempre muito baixos, inferiores a 50 %, o que não permitiu o avanço das discussões acerca da estruturação genética das populações de *T. urticae*. As 22 populações

coletadas no Brasil se dispersaram pelas várias ramificações, agrupando-se com sequências da Polônia, Noruega, França, Espanha e Taiwan.

As sequências da região ITS2 obtidas nesse estudo foram muito similares entre si, assim como com as sequências ITS2 disponíveis no GenBank. Foram analisadas 82 sequências ITS2 e destas 71 foram idênticas, inclusive as 22 sequências amplificadas de exemplares coletados do Brasil. Dois outros grupos de sequências foram observados: o primeiro formado por uma sequência do ácaro coletado na Holanda e outra de Taiwan (X99881 e AY750700); e o segundo por duas sequências novas obtidas, sendo uma oriunda de ácaros da Espanha e outra das Ilhas Canárias (40-3 e 97-1). A filogenia inferida a partir das sequências ITS2 exemplifica essa homogeneidade entre as sequências dessas regiões (Figura 3.6).

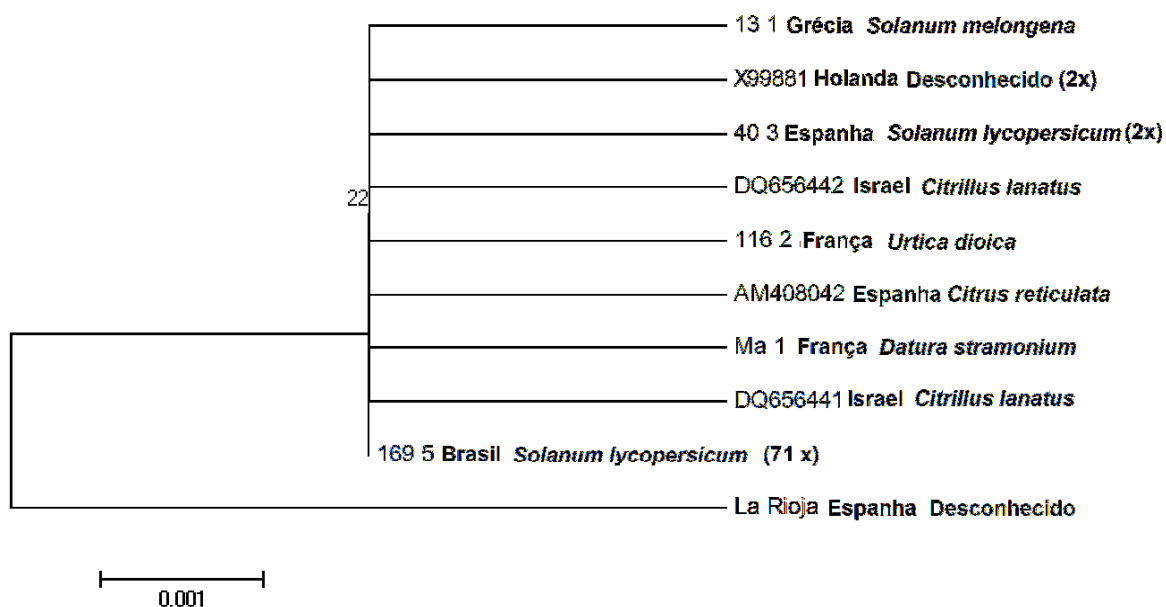


Figura 3.6. Relações filogenéticas inferidas a partir de sequências de nucleotídeos ITS2 do rDNA de *Tetranychus urticae*. Foi utilizado o algoritmo de Neighbor-Joining (NJ) (Saitou & Nei 1987), modelo de distância Kimura 2-Parâmetros. O valor de *bootstrap* em porcentagem (1.000 replicações) está próximo às ramificações. A escala indica a distância evolutiva inferida pelo número de substituições por base. Sequências idênticas são representadas apenas uma vez seguida do número de vezes, entre parênteses, que essa sequência se repetiu.

Navajas *et al.* (1998) e Navajas & Boursot (2003) mostraram que as sequências da região ITS2 de exemplares de *T. urticae* coletados na Europa e nos Estados Unidos são perfeitamente homogêneas. O mesmo foi observado por Ben-David *et al.* (2007) para ácaros do gênero *Tetranychus* em Israel e, Hurtado *et al.* (2008) com populações coletadas ao longo da costa Oriental do mar Mediterrâneo, na Espanha.

Os resultados obtidos confirmaram a ausência de variação na região ITS2 em 86% das sequências analisadas, incluído as 22 populações do Brasil. A baixa divergência observada nas sequências ITS2 possibilita a utilização de pequenas diferenças observadas como marcadores específicos de espécies (Hurtado *et al.* 2008) confirmando a sua utilidade para fins diagnósticos (Navajas *et al.* 1997; 2001; 2002; Navajas 2001).

3.3.2. Região COI do DNA mitocondrial

O tamanho das sequências do gene mitocondrial, região do *Citocromo Oxidase I* (COI variou de 800 a 955 bases, correspondendo, respectivamente, às posições 1.760 a 2.561 e 1.695 a 2.690 no gene mitocondrial COI total (posição 1.474 a 3.009). O número de pares de bases correspondeu ao da sequência do DNA mitocondrial de *Drosophila melanogaster* Meigen, disponível no GenBank sob o número de acesso U37541. O alinhamento dessas 20 sequências novas foi executado com êxito. Paralelamente efetuou-se um alinhamento múltiplo incluindo as sequências COI do GenBank e os resultados das análises descritivas estão resumidos na Tabela 3.5.

Tabela 3.5. Análises descritivas e índices de diversidade molecular. Informações intraespecíficas para as sequências da região *COI* de espécimes de *Tetranychus urticae*.

Nº de sequências	Tamanho (pb)	Inserções Deleções (pb)	Sítios invariáveis (pb)	Sítios variáveis (pb)	Sítios informativos parcimônia (pb)	Sítios polimórficos (pb)	K	Pi	h	Hd
20	955	196	742	42	15	57	9,9883	0,0125	8	0,7251
57	390	80	310	10	30	40	11,401	0,0325	21	0,893

K= número médio de diferenças de nucleotídeos; **PI**= diversidade de nucleotídeos; **h**= número de haplótipos, **HD**= diversidade haplotípica.

O tamanho da maioria das sequências *COI* obtidas foi superior ao tamanho normalmente relatado na literatura para as sequências *COI* de *T. urticae* e de outros tetraniquídeos, cuja extensão observada foi de 375 a 396 pb (Fournier *et al.* 1994; Navajas *et al.* 1996; Hinomoto *et al.* 2001; Hinomoto & Takafuji 2001), 710 pb (Hinomoto & Tanafuji 2004) e de 849 pb (Navajas & Boursot 2003). O uso de diferentes combinações de *primers* nos trabalhos de pesquisa resulta na obtenção de sequências de diferentes tamanhos, localizadas em posições distintas da região *COI* do *mtDNA* (Figura 3.4).

A região *COI* apresentou maior variabilidade em relação aquela de ITS. Os número de sítios polimórficos, o número médio de diferenças de nucleotídeos (K) e a diversidade de nucleotídeos (Pi) foram superiores mesmo quando se avaliou o grupo amostral menor constituído pelas 20 sequências inéditas desse estudo. O valor de Pi para o conjunto de todas as sequências foi de 3,25%. A extensa diversidade de nucleotídeos na região *COI* do DNA mitocondrial (3 a 4%) comparada com a reduzida variação encontrada na região ITS2 do DNA ribossômico (<0,5%) foi descrita anteriormente por Navajas & Boursot (2003).

No estudo da variabilidade genética da região *COI* nas populações de *T. urticae* foi selecionada uma porção central de 390 pb e o conjunto final de dados foi constituído por 57 sequências (20 inéditas e 37 retiradas do GenBank). Esse tamanho de fragmento permitiu a utilização de um maior número de sequências *COI* do GenBank. O alinhamento foi obtido sem ambiguidade e não foram observadas inserções e deleções.

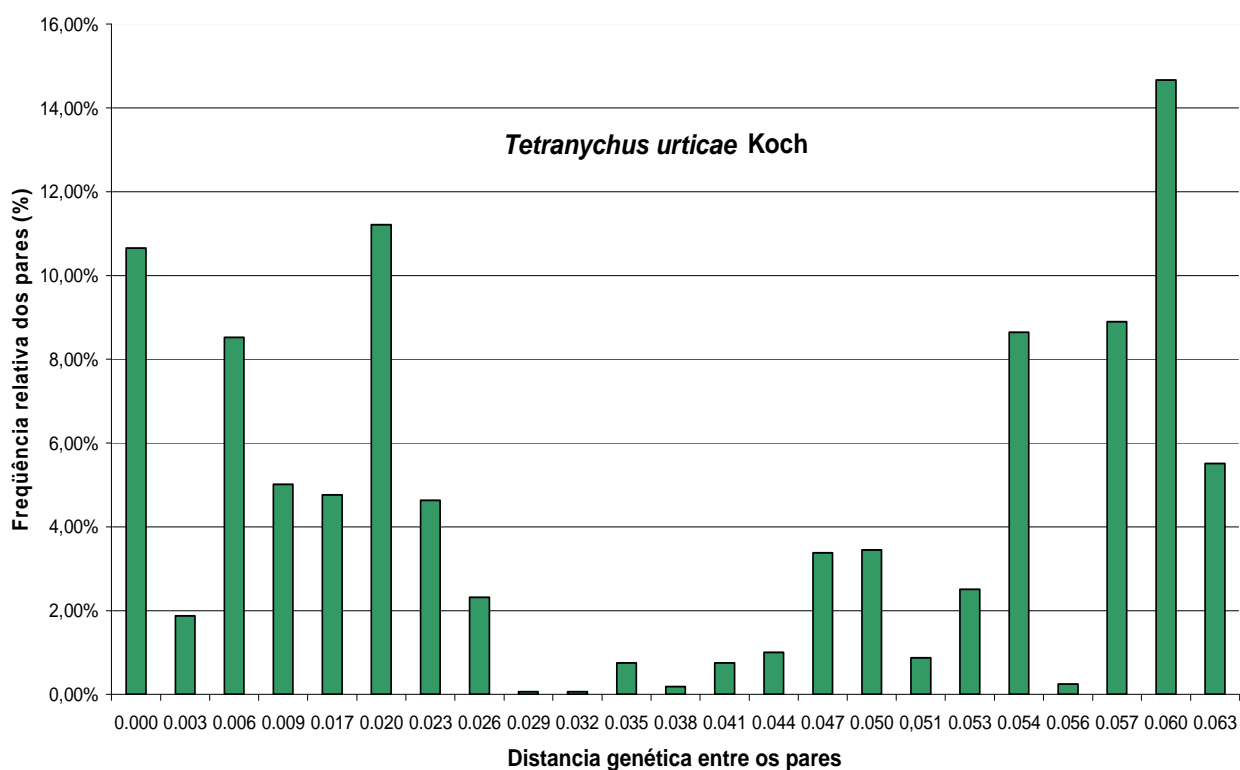


Figura 3.7. Distribuição da distância genética entre os pares baseada nas sequências da região *COI* do *mtDNA* de 57 espécimes do ácaro rajado, *Tetranychus urticae*, coletados em várias regiões do mundo, utilizando-se o modelo de distância Kimura 2-Parâmetros.

Os resultados da matriz de distância molecular baseada no modelo de distância Kimura 2-Parâmetros (Kimura 1980) indicaram variação considerável das distâncias genéticas entre as populações estudadas (Figura 3.7). A diversidade intraespecífica foi elevada e alcançou o valor máximo de 0,063 (6,3%). Entre os pares amostrados, aproximadamente 20% apresentaram essa distância elevada ($\geq 6\%$). Os valores que ultrapassaram a distância de 0,030 dividiram a amostra ao meio. Especificamente, 50,94% dos pares amostrados ultrapassaram esse valor e 49,06% foram inferiores. Navajas (1998) encontrou 0,060 (6%) como o valor máximo da distância em populações de *T. urticae* coletadas em diferentes plantas hospedeiras na Europa, Estados Unidos, Canadá e Japão. Valores mais elevados (7,2%) foram relatados por Ros &

Breeuwer (2007), provavelmente em função da inclusão sequências de táxons que não correspondem a *T. urticae* no conjunto final de dados definido pelos autores.

A análise filogenética indicou a existência de agrupamentos diferentes entre as populações investigadas, com a formação de dois clados muito bem suportados pelos valores de *bootstrap*. O Clado 1 constituído por populações do Japão (17), Tailândia (1), Taiwan (1), Holanda (1), Tunísia (1), Egito (1), Grécia (1), Brasil (1), França (1) e Itália (1). Entre as 32 sequências do Clado 1 observou-se que a maioria pertence à região asiática e 25% dessas são originárias de outras regiões. O Clado 2 foi constituído por sequências de espécimes coletados na França (8), Espanha Peninsular (6), Ilhas Canárias (5), Grécia (1), Itália (1), Israel (1), Brasil (1), Holanda (1) e Japão (1) (valor de *bootstrap* = 99%). Nesse clado, formado por 25 sequências, houve predominância de populações europeias de *T. urticae* originárias dos países banhados pelo mar Mediterrâneo, do Norte da África e da região Macaronésia (Ilhas Canárias), sendo apenas 12% das populações originárias de outros países como Brasil, Holanda e Japão (Figura 3.8).

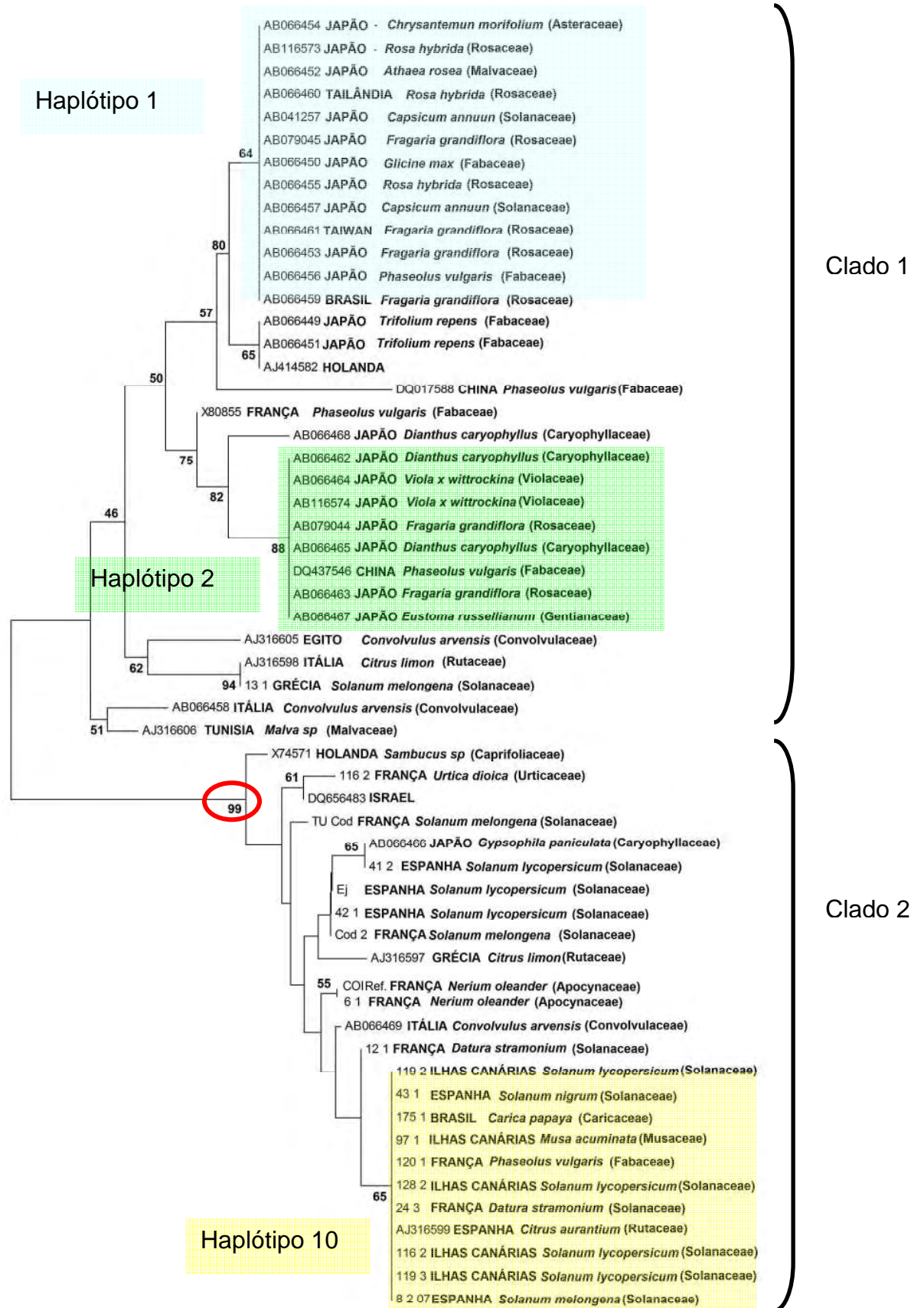


Figura 3.8. Relações filogenéticas inferidas a partir de sequências de nucleotídeos *COI* de *Tetranychus urticae*. Foi utilizado o algoritmo de Neighbor-Joining (NJ) (Saitou & Nei 1987), modelo de distância Kimura 2-Parâmetros. Os valores de *bootstrap* em porcentagem (1000 replicações) são mostrados próximo das ramificações. A escala indica a distância evolutiva inferida pelo número de substituições por base. As cores identificam os haplótipos 1, 2 e 10.

Tabela 3.6. Identificação dos haplótipos em populações do ácaro rajado, *Tetranychus urticae*, baseada na análise de 390pb do *mtDNA*, região *COI*, estimada no programa DnaSP v. 4.50.

Identificação do Haplótipo	Nº de sequências <i>COI</i> (<i>mtDNA</i>)	Identificação da sequência	País	Planta hospedeira
Haplótipo 1	13	AB041257	Japão	Desconhecido
		AB079045	Japão	<i>Fragaria grandiflora</i>
		AB066450	Japão	<i>Glicine max</i>
		AB066452	Japão	<i>Athaea rosea</i>
		AB066453	Japão	<i>Fragaria grandiflora</i>
		AB066454	Japão	<i>Chrysantemun morifolium</i>
		AB066455	Japão	<i>Rosa hybrida</i>
		AB066456	Japão	<i>Phaseolus vulgaris</i>
		AB066457	Japão	<i>Capsicum annuun</i>
		AB066460	Tailândia	<i>Rosa hybrida</i>
		AB066461	Taiwan	<i>Fragaria grandiflora</i>
		AB066459	Brasil	<i>Fragaria grandiflora</i>
		AB116573	Japão	<i>Rosa hybrida</i>
Haplótipo 2	8	AB079044	Japão	<i>Fragaria grandiflora</i>
		AB066462	Japão	<i>Dianthus caryophyllus</i>
		AB066463	Japão	<i>Fragaria grandiflora</i>
		AB066464	Japão	<i>Viola x wittrockina</i>
		AB066465	Japão	<i>Dianthus caryophyllus</i>
		AB066467	Japão	<i>Eustoma russellianum</i>
		AB116574	Japão	<i>Viola x wittrockina</i>
DQ437546	China	<i>Phaseolus vulgaris</i>		
Haplótipo 3	3	AB066451	Japão	<i>Trifolium repens</i>
		AB066449	Japão	<i>Trifolium repens</i>
		AJ414582	Holanda	<i>Sambucus sp</i>
Haplótipo 4	1	AB066469	Itália	<i>Convolvulus arvensis</i>
Haplótipo 5	2	B066466	Japão	<i>Gypsophila paniculata</i>
		41_2	Espanha	<i>Solanum lycopersicum</i>
Haplótipo 6	1	AB066458	Itália	<i>Convolvulus arvensis</i>
Haplótipo 7	1	AB066468	Japão	<i>Dianthus caryophyllus</i>
Haplótipo 8	1	AJ316597	Grécia	<i>Citrus limon</i>
Haplótipo 9	2	AJ316598	Itália	<i>Citrus limon</i>
		13_1	Grécia	<i>Solanum melongena</i>
Haplótipo 10	11	AJ316599	Espanha	<i>Citrus aurantium</i>
		116_2	Ilhas Canárias (ES)	<i>Solanum lycopersicum</i>
		119_2	Ilhas Canárias (ES)	<i>Solanum lycopersicum</i>
		119_3	Ilhas Canárias (ES)	<i>Solanum lycopersicum</i>
		128_2	Ilhas Canárias (ES)	<i>Solanum lycopersicum</i>
		43_1	Espanha	<i>Solanum nigrum</i>
		8_2_07	Espanha	<i>Solanum melongena</i>
		20_1	França	<i>Solanum dulcamara</i>
		175_1	Brasil	<i>Carica papaya</i>
		97_1	Ilhas Canárias (ES)	<i>Musa acuminata</i>
		24_3	França	<i>Datura stramonium</i>
Haplótipo 11	1	AJ316605	Egito	<i>Convolvulus arvensis</i>
Haplótipo 12	1	AJ31660	Tunisia	<i>Malva sp</i>
Haplótipo 13	1	TU_Cod	França	<i>Solanum melongena</i>
Haplótipo 14	1	X74571	Holanda	<i>Sambucus sp</i>
Haplótipo 15	2	COI_Ref.	França	<i>Nerium oleander</i>
		6_1	França	<i>Nerium oleander</i>
Haplótipo 16	1	12_1	França	<i>Datura stramonium</i>
Haplótipo 17	3	42_1	Espanha	<i>Solanum lycopersicum</i>
		Cod_2	França	<i>Solanum melongena</i>
		Ej	Espanha	<i>Solanum lycopersicum</i>
Haplótipo 18	1	116_2	França	<i>Urtica dioica</i>
Haplótipo 19	1	DQ017588	China	<i>Phaseolus vulgaris</i>
Haplótipo 20	1	X80855	França	<i>Phaseolus vulgaris</i>
Haplótipo 21	1	DQ656583	Israel	Desconhecido

O padrão filogeográfico obtido nesse estudo, em que foram incluídas todas as sequências *COI* de *T. urticae* disponíveis no GenBank mais as novas sequências coletadas confirmou os padrões filogeográficos descritos anteriormente por vários autores (Navajas 1998, Navajas *et al.* 1998 e Hinomoto *et al.* 2001) que sugeriram a existência de um modelo de diferenciação geográfica atuando na estruturação de populações de *T. urticae*. Conseqüentemente, não corroborou os resultados obtidos recentemente por Ros & Breeuwer (2007) que não encontraram evidências que comprovassem a presença desse padrão filogeográfico interferindo na estruturação das populações.

Outro fator que pode interferir na estruturação de populações de *T. urticae* é a associação com as plantas hospedeiras sobre as quais os espécimes são encontrados. Entretanto, os resultados da filogenia (Figura 3.8) mostraram que a estrutura das populações analisadas foi independente da espécie de planta hospedeira colonizada pelas populações de ácaros o que está de acordo com estudos anteriores (Navajas 1998, Navajas *et al.* 1998; Ros & Breeuwer 2007).

Nos agrupamentos formados no interior dos dois principais clados também não se observou a influência do efeito da planta hospedeira. A investigação dos haplótipos, ou seja, das sequências idênticas, contribuiu com essa assertiva. Foram identificados 21 haplótipos e alta diversidade haplotípica ($Hd = 0,8935$) entre as populações de *T. urticae* analisadas (Tabela 3.6). Observou-se que as sequências *COI* que constituíram os diferentes tipos de haplótipos correspondem aos espécimes de *T. urticae* coletados em diferentes espécies de plantas hospedeiras, sugerindo que não houve divergência entre as sequências *COI* em função da planta hospedeira. Alguns exemplos foram anotados na árvore filogenética. O haplótipo 1, destacado em azul claro, foi representado por 13 sequências, cujos os indivíduos foram coletados em oito espécies de plantas. Da mesma forma, em cores diferentes, foram representados os haplótipos 2 e 10 na árvore filogenética (Figura 3.8).

Um estudo recente realizado no Japão com o complexo *Tetranychus kanzawai* Kishida 1927, espécie próxima de *T. urticae*, mostrou, com base nos

resultados de análises das regiões *COI*, *ITS2* e microssatélites (*rDNA*) que os agrupamentos observados nas populações daquela espécie ocorreram preferencialmente em função do efeito da planta hospedeira, quando comparado com o efeito geográfico (Nishimura *et al.* 2007).

3.3.3. Estrutura genética em populações de *T. urticae* inferida através da Análise de Variância Molecular (AMOVA)

Considerando os resultados da filogenia inferida de sequências *COI* obtida e as divergências entre os resultados apontados por Navajas (1998), Navajas *et al.* (1998) e Hinomoto *et al.* (2001) e, ainda, aqueles descritos por Ros & Breeuwer (2007), reavaliou-se a interferência dos efeitos geográficos na estruturação das populações de *T. urticae* coletadas nas várias partes do mundo. Da mesma forma, foram testados os efeitos da planta hospedeira. A Análise de Variância Molecular (AMOVA) foi utilizada para investigar a existência de estruturação nas populações de *Tetranychus urticae* e os resultados podem ser observados na Tabela 3.7.

Tabela 3.7. Resultados da análise de variância molecular (AMOVA) de dois conjuntos formados por populações de *Tetranychus urticae* coletadas em varias espécies de plantas hospedeiras em duas regiões distintas, Mediterrânea e Asiática, baseados na região *COI* do *mtDNA*.

Origem da variação	d.f.	% de Variação	Fst	p value	Resumo
Região Mediterrânea X Região Asiática					
Entre populações	1	60,76	0,6075	0,0000	*
Dentro das populações	51	39,24			
Planta hospedeira na região					
Mediterrânea					
Entre populações	8	17,62	0,1762	0,1417	n.s.
Dentro das populações	19	82,38			
Plantas hospedeiras na região					
Asiática					
Entre populações	8	8,35	0,0834	0,2541	n.s.
Dentro das populações	16	91,65			

d.f.= grau de liberdade; **Fst**= medida de diferenciação entre as populações; **p**= probabilidade; * significativo ($\leq 0,05$).

A análise dos resultados da AMOVA entre regiões mostrou resultados significativos, com variação genética de 60,76 % entre as populações da região Mediterrânea e aquelas da região Asiática (valor de $F_{st} = 0,6975$; valor de $p = 0$). Neste caso, observou-se uma fragmentação das populações de *T. urticae* em função da região geográfica. O valor de F_{st} obtido indica diferenciação genética muito alta ($F_{st} > 0,25$) entre os grupos formados pelas regiões Mediterrânea e Asiática (Wright 1978). Quando se comparou as populações de *T. urticae* coletadas na região Mediterrânea agrupadas em conjuntos de plantas hospedeiras os resultados da AMOVA mostraram que não houve diferença significativa da variação genética para o fator planta hospedeira ($F_{st} = 0,1762$; valor de $p = 0,1417$). Da mesma forma, a comparação dos conjuntos de plantas na região Asiática também não mostrou resultado significativo, indicando que não existiu variação genética para o fator planta hospedeira naquela região ($F_{st} = 0,0834$; valor de $p = 0,2541$). Os resultados inferidos de sequências da região *COI* do *mtDNA* apontaram que as plantas hospedeiras

não interferiram na estruturação das populações de *T. urticae* nas regiões estudadas. Por sua vez, o fator região geográfica, indicou uma fragmentação das populações de *T. urticae* analisadas, confirmando a presença do padrão de estruturação por região, aqui revelado pelas análises filogenéticas e descrito anteriormente por Navajas, Hinomoto e colaboradores.

A suspeita de uma possível divergência entre as populações de *T. urticae* em função do complexo de plantas hospedeiras para o caso específico de *Citrus* (Rutaceae) foi descrita por Navajas (1998). O estudo da variação genética em populações de *T. urticae* da Grécia e França, baseado em aloenzimas, mostrou que a similaridade genética das populações estudadas foi independente da colonização em plantas hospedeiras em todos os casos, mas foi afetada tanto pela densidade como pela distância geográfica entre as populações. Entretanto, os ácaros coletados em campos de limão na Grécia foram mais similares entre eles do que entre todos os outros indivíduos investigados na inspeção de 11 espécies de plantas hospedeiras amostradas em diferentes distâncias em uma área que variou de poucos metros até 50 km de distância (Tsagkarakou *et al.* 1997; 1998)

A aparente diferença entre os resultados oriundos das sequências de nucleotídeos e os descritos nas pesquisas com aloenzimas pode ser explicada pelo fato de que os dois marcadores trabalham em escalas de tempo diferentes. A diferenciação detectada pelas aloenzimas nas populações locais de citros pode ter evoluído recentemente. Como as análises abrangeram somente as populações locais, a frequência dos alelos pode ter sido modificada em poucas gerações e detectar mudanças rápidas nas populações. Se alguma seleção por planta hospedeira existiu, ou seja, a seleção de diferentes alelos em determinadas plantas hospedeiras, isso poderia não ser antigo o suficiente para ser revelado em análises de sequências do DNA mitocondrial. Evidências do potencial adaptativo de *T. urticae* foram relatadas em experimentos de seleção de plantas, cujos resultados mostraram que a adaptação a novos hospedeiros de espécies diferentes foi superada em poucas gerações, mesmo nos hospedeiros que inicialmente mostraram-se desfavoráveis (Fry 1989).

Foram conduzidas novas investigações para testar o efeito da planta hospedeira na estruturação de populações de *T. urticae* com base nas 57 sequências *COI* do *mtDNA* que compõem o conjunto de dados aqui obtido. Para detectar a diferenciação entre as populações estudadas foram realizadas uma série de avaliações estatísticas utilizando AMOVA e o Teste Exato de Diferenciação das Amostras baseado na Frequência dos Haplótipos considerando-se as populações agrupadas por hospedeiros. As análises foram realizadas para os hospedeiros da região Mediterrânea e Asiática separadamente, reduzindo assim a interferência do efeito região.

Tabela 3.8. Resultados do Teste Exato de Diferenciação entre as amostras baseados na frequência dos haplótipos de sequências da região *COI* do *mtDNA* de espécimens de *Tetranychus urticae* agrupados por conjuntos de plantas hospedeiras na região Mediterrânea.

Origem da Variação	1	2	3	4	5	6	7	8
Solanaceae	1	-	+	-	-	-	-	-
Convolvulaceae	2	0,0564	-	-	-	-	-	-
Rutaceae	3	0,0476	1,0000	-	-	-	-	-
Fabaceae	4	0,1301	1,0000	1,0000	-	-	-	-
Apocynaceae	5	0,0635	0,4033	0,3965	0,3291	-	-	-
Urticaceae	6	0,3406	1,0000	1,0000	1,0000	0,3311	-	-
Malvaceae	7	0,3314	1,0000	1,0000	1,0000	0,3334	1,0000	-
Musaceae	8	0,3395	1,0000	1,0000	1,0000	0,3356	1,0000	1,0000

- = Não diferença no valor exato de p ; + = diferença significativa; Nível de significância $\leq 0,05$.

Apesar dos resultados da AMOVA não terem sido significativos para plantas hospedeiras (Tabela 3.7), quando se avaliou as plantas hospedeiras da região Mediterrânea agrupadas por família o Teste Exato de Diferenciação entre Populações, encontrou significância (0,05) entre os haplótipos das plantas das famílias Solanaceae e Rutaceae, indicando que no caso particular das plantas da família de Solanaceae existiu uma estruturação genética em função da planta hospedeira (Tabela 3.8). A observação mais atenta da Tabela 3.8 permite verificar uma tendência dos haplótipos coletados nas plantas da

família Solanaceae em se diferenciarem também daqueles coletados em plantas das famílias Convolvulaceae e Apocynaceae (valor de $p = 0,0564$ e $0,0635$, respectivamente). São resultados pontuais e não são evidentes o suficiente para proporcionar conclusões sedimentadas, porém sinalizam a necessidade de novas investigações. Considerando que esses resultados (Tabela 3.8) se contrapõem àqueles obtidos na AMOVA (Tabela 3.7) decidiu-se avaliar se a diferenciação genética apontada em função da planta hospedeira ocorreu exclusivamente pelo efeito planta hospedeira ou se os resultados foram influenciados pelo tamanho da área geográfica definida como região Mediterrânea e, nesse caso, seria o efeito geográfico responsável pelas diferenças significativas encontradas entre as populações coletadas em Solanaceae e Rutaceae.

Para reduzir a influência do efeito geográfico na diferenciação genética entre as populações de *T. urticae* foram realizadas novas análises para as plantas hospedeiras agrupadas em conjuntos em uma região geográfica menor. Foram selecionados os países em que o número de coletas de *T. urticae* possibilitou um agrupamento por plantas hospedeiras e onde foram encontrados haplótipos diferentes. Os novos agrupamentos foram os seguintes: região Sul da França (Solanaceae, Fabaceae, Apocynaceae e Urticaceae), Espanha (Rutaceae e Solanaceae) e Itália (Convolvulaceae e Rutaceae). Os resultados da AMOVA e do Teste Exato de Diferenciação entre Populações para todos os pares das amostras não foram significativos, indicando que para os agrupamentos populacionais geograficamente próximos o efeito da espécie de planta hospedeira na diferenciação genética e estrutura das populações de *T. urticae* foi nulo. A princípio estes resultados retornam a prevalência do efeito geográfico atuando na diferenciação genética do ácaro. Esta conclusão é plausível dada à abrangência da região Mediterrânea.

Os resultados da avaliação dos conjuntos de plantas hospedeiras na região Asiática (Tabela 3.9) foram significativos a 0,05 para os haplótipos das plantas de Rosaceae com relação aos das famílias Fabaceae, Caryophyllaceae e Violaceae, observando-se novamente, uma tendência para estruturação genética em função da planta hospedeira.

Tabela 3.9. Resultados do Teste Exato de Diferenciação entre as amostras baseados na frequência dos haplótipos de sequências da região *COI* do *mtDNA* de espécimes de *Tetranychus urticae* agrupados por conjuntos de plantas hospedeiras na região Asiática.

Origem da Variação	1	2	3	4	5	6	7	8
Rosaceae	1	+	+	-	-	-	+	-
Fabaceae	2	0,0020		-	-	-	-	-
Caryophyllaceae	3	0,0061	0,1083		-	-	-	-
Malvaceae	4	0,1087	0,4237	0,5935		-	-	-
Asteraceae	5	0,1102	0,4275	0,5928	1,0000		-	-
Solanaceae	6	0,1099	0,4307	0,6034	1,0000	1,0000		-
Violaceae	7	0,0425	0,1417	0,1999	0,3320	0,3326	0,3347	
Gentianaceae	8	0,1097	0,4272	0,6034	1,0000	1,0000	1,0000	0,3348

- = Não diferença no valor exato de p ; + = diferença significativa; Nível de significância $\leq 0,05$.

Entretanto, esses resultados também poderiam estar sujeitos ao efeito da área geográfica, uma vez que a região Asiática foi representada pelo Japão, China, Tailândia e Taiwan, formando uma região territorial muito extensa. Para reduzir as interferências do efeito geográfico na região Asiática e testar exclusivamente o efeito da planta hospedeira na estrutura das populações de *T. urticae* restringiu-se a área territorial ao Japão, considerando os seguintes conjuntos de plantas hospedeiras: Rosaceae, Fabaceae, Caryophyllaceae e Violaceae. As análises para as populações coletadas na China, Tailândia e Taiwan não foram efetuadas, pois esses países possuíam apenas uma coleta em uma única espécie de planta hospedeira.

O agrupamento Japão possibilitou uma análise diferenciada. De acordo com os resultados da AMOVA apresentados na Tabela 3.10 a variação entre as plantas hospedeiras foi de 27,31 % e esse valor foi significativo a 0,05 (valor de $p = 0,0117$) indicando uma fragmentação pela planta hospedeira para os agrupamentos populacionais no Japão. A maior parte da variação, ou seja, 72,69 %, ocorreu dentro de cada conjunto de planta hospedeira.

Tabela 3.10. Resultados da análise de variância molecular (AMOVA) dos conjuntos formados por populações de *Tetranychus urticae* coletadas em varias plantas hospedeiras no Japão, baseados na região *COI* do *mtDNA*.

Origem da variação	<i>d.f.</i>	% de Variação	<i>Fst</i>	valor de <i>p</i>	Resumo
Planta hospedeira no Japão					
Entre população	3	27,31	0,2731	0,0117	*
Dentro da população.	12	72,69			

d.f.= graus de liberdade; *Fst*= medida de diferenciação entre as populações; *p*= probabilidade;

* significativo ($\leq 0,05$).

Os resultados do Teste Exato de Diferenciação (Tabela 3.11) para todos os pares da amostra também foram significativos ($p= 0,05$) para os haplótipos da famílias Rosaceae, Fabaceae e Caryophyllaceae, confirmando a indicação de estruturação genética em função da planta hospedeira no Japão.

Tabela 3.11. Resultados do Teste Exato de Diferenciação entre as amostras baseados na frequência dos haplótipos de sequências da região *COI* do *mtDNA* de espécimes de *Tetranychus urticae* agrupados por conjuntos de plantas hospedeiras no Japão.

Origem da variação	1	2	3	4
Rosaceae	1	+	+	-
Fabaceae	2	0,0192	-	-
Caryophyllaceae	3	0,0210	0,0887	-
Violaceae	4	0,0683	0,2079	0,2016

- = Não diferença no valor exato de *p*; + = diferença significativa; Nível de significância $\leq 0,05$.

Considerando que, algumas coletas de *T. urticae* em Rosaceae e Caryophyllaceae foram realizadas na mesma cidade ou em cidades próximas como Tsukuba e Tomobe (Honshu, Ibaraki) e Inzai (Honshu, Chiba), isolou-se o efeito geográfico, dando ainda mais credibilidade aos resultados da análise. Observou-se na Tabela 3.11 uma tendência dos haplótipos coletados nas plantas da família Violaceae se diferenciarem também daqueles coletados em

Rosaceae (valor de $p = 0,0683$). As coletas em Violaceae foram realizadas em Tsuchuira (Honshu, Ibaraki) cidade muito próxima de Tsukuba. Os resultados encontrados para o Japão resgatam a hipótese de diferenciação genética em função do hospedeiro. Recentemente, Nishimura *et al.* (2007) constataram a influencia da planta hospedeira na estrutura genética de sete populações japonesas de *Tetranychus kanzawai*, espécie próxima de *T. urticae*. Os autores não encontraram correlação positiva entre a distância geográfica e a diferenciação entre as populações de *T. kanzawai*. Com relação ao trabalho de Nishimura *et al.* (2007) é importante considerar que em função da proximidade entre os pontos de coleta o efeito geográfico pode ter sido isolado, de modo que a distância passou a não exercer efeito na estrutura populacional. Para uma avaliação do efeito geográfico é necessário considerar a dimensão geográfica em estudo de tal forma que as distâncias constituam fator importante para o desenvolvimento de diferenciação genética entre as populações.

Foi realizada a AMOVA incluindo as populações coletadas no Brasil e na Holanda e foi avaliado o efeito da região geográfica considerando quatro agrupamentos distintos, região Mediterrânea, região Asiática, Brasil e Holanda. Os resultados da AMOVA foram significativos, com variação genética de 53,57 % entre as populações dessas quatro áreas geográficas ($F_{st}=0,5357$; valor de $p=0$). O Teste Exato de Diferenciação entre as Amostras indicou que região Asiática diferiu significativamente da região Mediterrânea, do Brasil e da Holanda, com populações isoladamente distintas das demais populações (Tabela 3.12). Esses resultados são mais exploratórios do que conclusivos para o Brasil e Holanda, uma vez que foram coletadas somente duas populações para cada um desses países. De qualquer forma, confirmou-se que o fator região é determinante na diferenciação genética das populações de *T. urticae*.

Tabela 3.12. Resultados do Teste Exato de Diferenciação entre as amostras baseados na frequência dos haplótipos de sequências da região *COI* do *mtDNA* de espécimes de *Tetranychus urticae* coletados nas regiões Mediterrânea e Asiática, no Brasil e na Holanda.

Origem da variação		1	2	3	4
Região Asiática	1		+	+	+
Região Mediterrânea	2	0,0000		-	-
Holanda	3	0,0295	0,1732		-
Brasil	4	0,0306	0,1881	1,0000	

- = Não diferença no valor exato de p ; + = diferença significativa; Nível de significância $\leq 0,05$.

Como resultado desta série de análises, comprovou-se à influência do efeito geográfico na estruturação genética das populações de *T. urticae*. Destaca-se que nem todos os países analisados foram amplamente amostrados, como o Brasil, Holanda, alguns países da Europa, (Itália e Grécia) e outros (Israel, Tunísia e Egito). Mesmo com a limitação do número de amostras, observou-se a interferência do efeito geográfico na estruturação das populações.

O efeito da planta hospedeira, apesar de não ser frequente, foi detectado no Japão, país onde o maior número de amostras foi analisado, revelando que novas investigações sobre esse efeito precisam ser conduzidas.

3.3.4. Distribuição e frequência dos haplótipos ITS2 do DNA ribossômico

Foram encontrados 10 haplótipos ITS2 do rDNA entre as 82 populações analisadas (Figura 3.9). O haplótipo 1 apresentou a maior distribuição geográfica e foi o mais frequente com 71 ocorrências, representando 86,58% do total de haplótipos observados na América do Sul, Europa, região Macaronésia, Ásia e África. Foi o único haplótipo encontrado no Brasil entre as 22 populações amostradas nas cinco regiões do país. Na China, no Japão e na Síria onde foram analisadas 12, 20 e duas sequências, respectivamente e, Tunísia, Noruega e Polônia onde apenas uma sequência foi analisada, o

haplótipo 1 foi o único observado. Nos países da região Mediterrânea – França e Espanha - esse haplótipo foi o mais frequente, representando cerca de 85% das sequências obtidas. Nas Ilhas Canárias, região Macaronésia, foram encontrados os haplótipos 1 e 3, também presentes na Espanha peninsular, sendo o haplótipo 3 encontrado apenas nessas duas localidades. O haplótipo 7 foi compartilhado entre a Holanda e Taiwan.

Os demais haplótipos foram únicos – haplótipos 6 e 8 na Espanha, haplótipos 4 e 5 na França, Haplótipo 2 na Grécia e Haplótipos 9 e 10 em Israel.

A maior diversidade de haplótipos foi encontrada entre as populações coletadas nos países banhados pelo mar Mediterrâneo França (3 haplótipos), Espanha (4 haplótipos), Grécia (1) e Israel (9 e 10).

3.3.5. Distribuição e frequência dos haplótipos *COI* do DNA mitocondrial

Entre as populações estudadas foram encontrados 21 haplótipos (Figura 3.10). O haplótipo 1 foi o mais frequente, representando 22,81% dos observados, seguido do 10 (19,29%), 8 (14,04%), 3 (5,26%) e 17 (5,26%). No Brasil, foi constatada a presença de dois desses haplótipos, 1 e 10, os quais também foram observados na Ásia (Japão, Taiwan, Tailândia) e na região Mediterrânea (Espanha, França) e Ilhas Canárias, respectivamente. Ressalta-se que apenas duas sequências de *T. urticae* foram analisadas no Brasil. Apesar do pequeno tamanho amostral, os dois haplótipos mais frequentes no mundo (haplótipo 1 e 10) foram justamente os observados no Brasil.

A presença dos haplótipos 1 e 10 no país não constitui uma surpresa se avaliada sob uma perspectiva histórica. O período das grandes navegações, o descobrimento das Américas e a chegada às Índias pelos espanhóis e portugueses expandiu o comércio para regiões então consideradas longínquas. Nas rotas oceânicas, o Mar Mediterrâneo tinha um papel primordial de apoio à navegação no Atlântico. As ilhas Canárias participavam como entreposto para o comércio africano, americano, asiático e europeu apoiando a navegação e o

comércio na maioria das rotas da época. O Leste Asiático era uma região importante de expedições européias na busca por especiarias. O comércio estimulou uma redistribuição global de recursos, inclusive a difusão de plantas cultivadas pelo homem em várias partes do globo. O trigo oriundo do Oriente espalhou-se pelo planeta, seguido pelo arroz, banana, inhame, cana-de-açúcar, frutas cítricas, muitas mudas de frutíferas provenientes da Leste Asiático e Índia, cereais da Europa, entre outros. O intercâmbio de plantas ampliou a oferta de alimentos e, ainda hoje, é uma atividade importante na disseminação de pragas. A entrada dos haplótipos 1 e 10 no Brasil pode ser resultante do comércio oriundo das rotas históricas das grandes navegações.

A maior diversidade de haplótipos foi encontrada entre as populações coletadas nos países banhados pelo mar Mediterrâneo (15 haplótipos) seguido da Ásia (seis haplótipos). Entre os haplótipos asiáticos, quatro não foram encontrados entre as populações amostradas na região Paleártica (1, 2, 7 e 13). Apenas dois haplótipos foram compartilhados entre a Ásia e a região Paleártica, o 3 (Holanda e Japão) e o 5 (Espanha e Japão). O compartilhamento de haplótipos foi observado também entre Itália e Grécia (haplótipo 9) e entre a França e Espanha (haplótipo 17).

Os resultados indicaram maior diversidade de haplótipos entre os países banhados pelo mar Mediterrâneo e foram congruentes para as duas regiões do genoma estudadas, ITS2 e *COI*, o que suporta a hipótese de que essa região é o centro de origem da espécie *T. urticae*, que a partir de subgrupos colonizou outras regiões do mundo (Navajas 1998).

Ainda não é possível representar o cenário completo da diversidade genética do ácaro rajado, *T. urticae*, em escala mundial devido a carência e/ou ausência de informações em regiões como América do Norte, América Central, Oceania, região Centro Sul da África e nos países compreendidos entre a região Paleártica e o Leste Asiático e, ainda, devido a heterogeneidade do número de populações coletadas em alguns países onde ácaro rajado já foi amostrado.

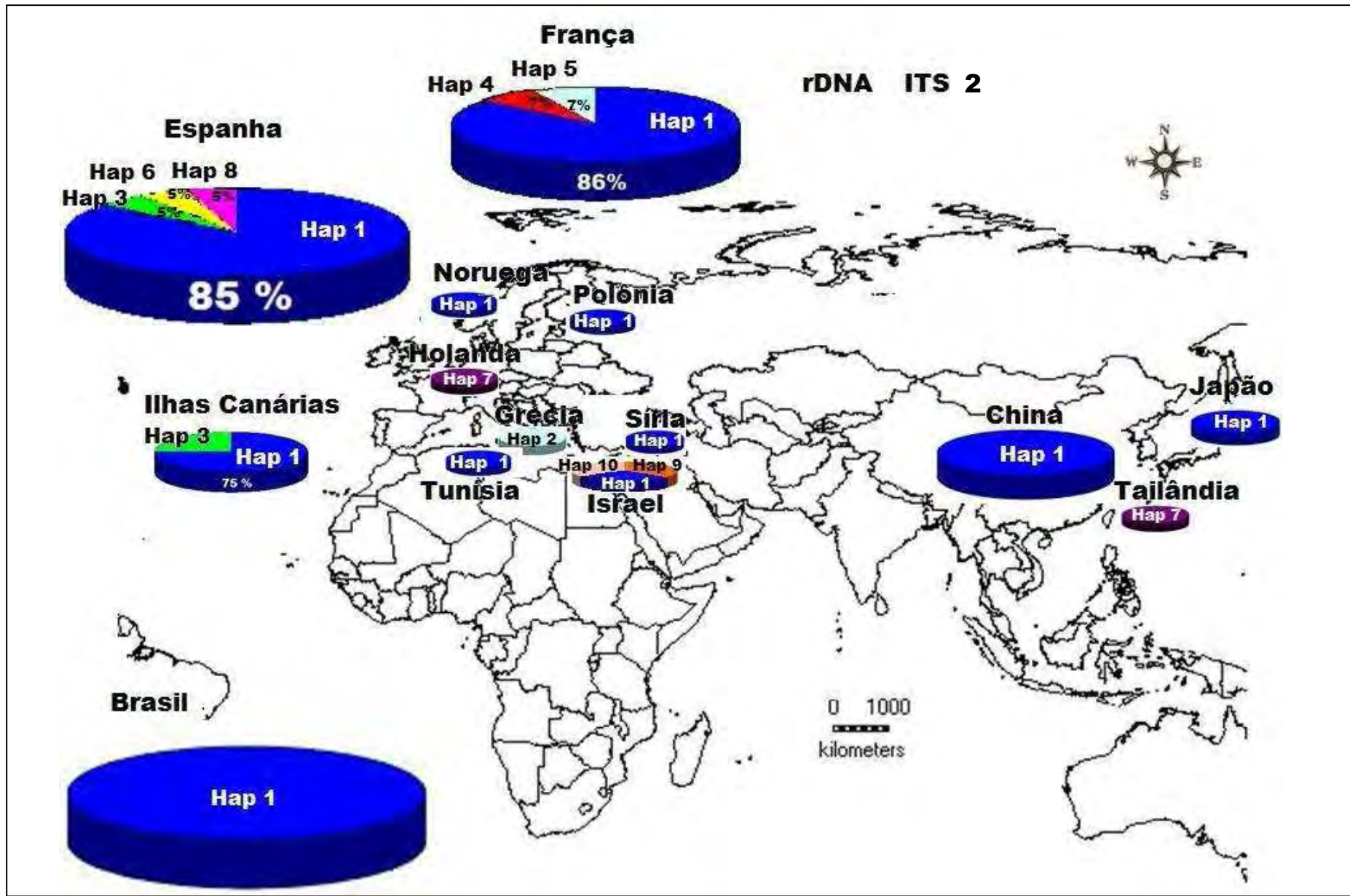


Figura 3.9. Distribuição e freqüência de populações de *Tetranychus urticae* Koch, no mundo, inferidas a partir de seqüências da região ITS2 do DNA ribossômico

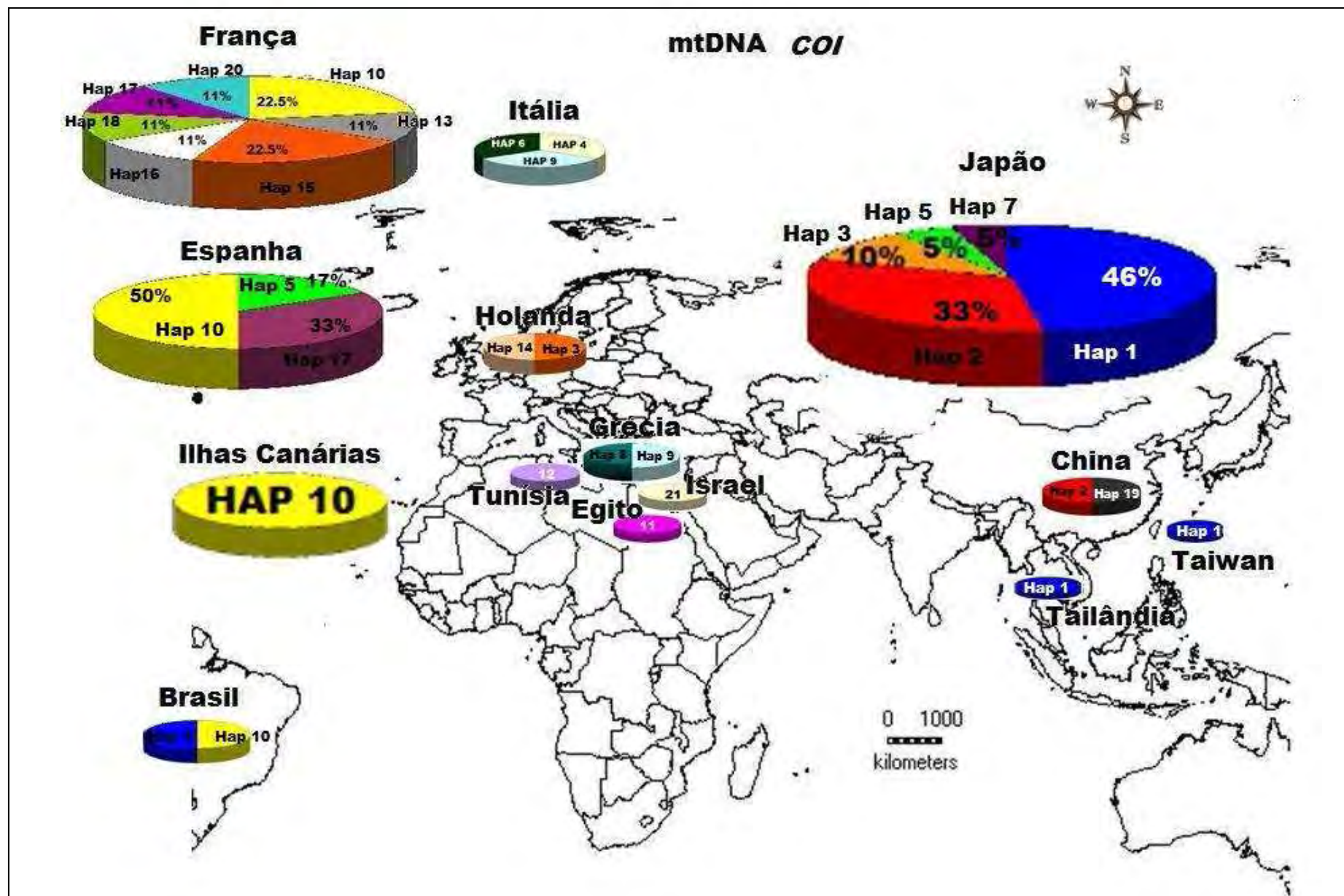

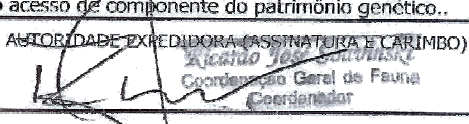


Figura 3.10. Distribuição e freqüência de populações de *Tetranychus urticae* Koch, no mundo, inferidas a partir de seqüências da região COI do DNA mitocondrial .

3.4. CONCLUSÕES

1. É necessário o estabelecimento de um novo protocolo de extração e/ou de novos *primers* para o estudo da variabilidade da região *COI* em populações de *Tetranychus urticae* do Brasil;
2. O padrão filogeográfico obtido indicou um efeito geográfico positivo atuando na estruturação genética das populações de *T. urticae* analisadas;
3. O efeito da planta hospedeira não interferiu na estrutura genética das populações analisadas
4. As populações de *T. urticae* do Brasil foram homogêneas quanto a variação genética da região ITS do DNA ribossômico;
5. A presença de dois haplótipos *COI* foi constatada no Brasil, sendo um compartilhado com a França, Espanha e Ilhas Canárias e o outro com o Japão.
6. A maior diversidade genética entre as populações analisadas está presente nos países banhados pelo mar Mediterrâneo

ANEXO 1. Autorização para captura, coleta e transporte de material zoológico no âmbito do projeto concedida pelo Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Renováveis (IBAMA)

 INSTITUTO BRASILEIRO DO MEIO AMBIENTE E DOS RECURSOS NATURAIS RENOVÁVEIS DIRETORIA DE FAUNA E RECURSOS PESQUEIROS (DIFAP) COORDENAÇÃO GERAL DE FAUNA (CGFAU) AUTORIZAÇÃO PARA CAPTURA / COLETA / TRANSPORTE / FILMAGEM			
NÚMERO DA AUTORIZAÇÃO 231/2006 – CGFAU	Nº DE REGISTRO NO IBAMA *****	PERÍODO DE VALIDADE 10/11/2006 a 10/11/2007	PROCESSO IBAMA 02001.006637/2006
OBJETO: <input checked="" type="checkbox"/> CAPTURA E/OU COLETA DE ANIMAIS SILVESTRES/MATERIAL ZOOLOGICO <input checked="" type="checkbox"/> TRANSPORTE DE ANIMAIS SILVESTRES/MATERIAL ZOOLOGICO <input type="checkbox"/> COLETA E TRANSPORTE DE MATERIAL BOTÂNICO (PESQUISA CIENTÍFICA) <input type="checkbox"/> TRANSPORTE DE PRODUTOS E SUBPRODUTOS DA FAUNA <input type="checkbox"/> EXPOSIÇÃO E/OU CONCURSO DE ANIMAIS SILVESTRES <input type="checkbox"/> MANUTENÇÃO DE ANIMAIS EM CATIVEIRO <input type="checkbox"/> OUTROS:		FAVORECIDO: <input type="checkbox"/> ZOOLOGICO <input checked="" type="checkbox"/> INSTITUIÇÃO CIENTÍFICA <input checked="" type="checkbox"/> PESQUISADOR(A) <input type="checkbox"/> EXPOSITOR/CONCURSO <input type="checkbox"/> CRIADOURO COMERCIAL <input type="checkbox"/> CRIADOURO CIENTÍFICO <input type="checkbox"/> OUTROS:	
FAVORECIDO(S): NOME(S): Denise Navia Magalhães Ferreira, Renata Santos de Mendonça e Leticia Calvosu Miranda. INSTITUIÇÃO: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. ENDEREÇO: Parque Estação Biológica Final W-5 Norte, Brasília, DF, C.P.02372, 70770-900. RESPONSÁVEL PELA EXPEDIÇÃO: Denise Navia Magalhães Ferreira.			
TRANSPORTADOR: Os pesquisadores favorecidos. MEIO DE TRANSPORTE: Aéreo / Terrestre / Fluvial. PROCEDÊNCIA/LOCAL DA CAPTURA/LOCAL DA PESQUISA: Estados do Acre, Bahia, Espírito Santo, Goiás, Minas Gerais, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Pernambuco, Paraná, Rio Grande do Norte, Rio Grande do Sul, Santa Catarina, São Paulo e Distrito Federal. DESTINO DO MATERIAL: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia e a Universidade de Brasília.			
LISTA DAS ESPÉCIES QUANTIDADE / TIPO	NOME CIENTÍFICO		NOME COMUM
Captura, coleta e transporte / Nº Indeterminado	Família Tetranychidae, Gênero <i>Tetranychus</i>		Ácaros
OBSERVAÇÕES E CONDICIONANTES: 1. O responsável pela expedição deverá apresentar relatório de atividades ao término da validade desta autorização. 2. O responsável pela expedição deverá encaminhar ao Ibama cópia dos frontispícios das publicações resultantes dos trabalhos decorrentes do uso dos espécimes objeto desta autorização. 3. Esta autorização não exime o pesquisador de cumprir o disposto na Medida Provisória Nº 2186-16/01, Decreto nº 3.945/2001 e Decreto nº 4.946/2003 que dispõem sobre o acesso de componente do patrimônio genético..			
LOCAL E DATA DE EMISSÃO	AUTORIDADE EXPEDIDORA (ASSINATURA E CARIMBO)  Ricardo José Gonçalves Coordenação Geral de Fauna Coordenador		
Brasília (DF), 10 de novembro de 2006.			
ESTA AUTORIZAÇÃO NÃO PERMITE:			
1. CAPTURA DE ESPÉCIES QUE CONSTEM NAS LISTAS OFICIAIS (FEDERAIS, ESTADUAIS E MUNICIPAIS) DA FAUNA E FLORA BRASILEIRA AMEAÇADAS DE EXTINÇÃO, ESPÉCIES ENDÊMICAS OU RARAS, OU QUE CONSTEM NO ANEXO I E II DA CONVENÇÃO SOBRE O COMÉRCIO INTERNACIONAL DE ESPÉCIES DA FAUNA E DA FLORA AMEAÇADAS DE EXTINÇÃO (CITES), SALVO QUANDO ESPECIFICADO; 2. CAPTURA, COLETA E OU TRANSPORTE DE ESPÉCIMES DA FAUNA NAS ÁREAS DE INFLUÊNCIA DE EMPREENDIMENTOS SUJEITOS AO LICENCIAMENTO AMBIENTAL, CONFORME RESOLUÇÃO DO CONAMA DE Nº 237 DE 19/12/97, SALVO QUANDO ESPECIFICADO. 3. CAPTURA DOS ESPÉCIMES DA FAUNA EM ÁREAS DE DOMÍNIO PRIVADO, SEM O CONSENTIMENTO DO PROPRIETÁRIO, ARRENDATÁRIO, POSSEIRO OU MORADOR DA ÁREA; 4. CAPTURA, COLETA E OU TRANSPORTE DE ESPÉCIMES FAUNA EM UNIDADES DE CONSERVAÇÃO FEDERAIS, ESTADUAIS, DISTRITAIS OU MUNICIPAIS, SALVO QUANDO ACOMPANHADAS DO CONSENTIMENTO DO ÓRGÃO ADMINISTRADOR COMPETENTE;			
• SÃO ISENTAS DE COBRANÇA DE TAXA (RECOLHIMENTO DE DR) INSTITUIÇÕES CIENTÍFICAS, PESQUISADORES E ZOOLOGICOS PUBLICOS. • VÁLIDA SOMENTE SEM EMENDAS OU RASURAS.			
MOD. 09.008 1º VIA - INTERESSADO 2º VIA - IBAMA / PROCESSO			

ANEXO 2. Resultados dos levantamentos de ácaros Tetranychidae realizados no Brasil, no período de 10/2004 à 07/2008, com informações sobre a localidade, planta hospedeira, data, identificação das espécies e coletor.

UF	Localidade			Nº	Hospedeiro			Data	Identificação	Coletor	
	LONG.	LAT.	Município		Descrição do local	Nome comum	Nome científico				Família
AC	-67,8187	-9,9719	Rio Branco		201	Mamão	<i>Carica papaya</i> L.	Caricaceae	25.V.2008	<i>Tetranychus mexicanus</i>	D. Navia
AC	-67,8183	-9,9718	Rio Branco		202	Rosa	<i>Rosa</i> sp.	Rosaceae	26.V.2008	<i>Eotetranychus smithi</i> #	D. Navia, P. Drumond
AC	-67,8185	-9,97,14	Rio Branco		203	Laranja	<i>Citrus sinensis</i> Osbeck	Rutaceae	26.V.2008	<i>T. mexicanus</i>	D. Navia
BA	-39,1019	-12,6700	Cruz das Almas	Caliman	139	Siratiro	<i>Macroptilium atropurpureum</i> L. (Urb)		09.VI.2006	<i>T. urticae</i> +	A. Noronha
BA	-39,5311	-17,0392	Itamaraju	Caliman	138	Mamão	<i>Carica papaya</i> L.	Caricaceae	19.VI.2006	<i>T. urticae</i>	A. Noronha
BA	-39,0647	-16,4497	Porto Seguro	Faz. Palmares	130	Mamão	<i>Carica papaya</i> L.	Caricaceae	20.VI.2006	<i>T. urticae</i>	N. F. Sanches
BA	-39,0647	-16,4497	Porto Seguro	Faz. Palmares	131	Mamão	<i>Carica papaya</i> L.	Caricaceae	20.VI.2006	<i>T. urticae</i>	N. F. Sanches
BA	-39,0647	-16,4497	Porto Seguro	Faz. Palmares	132	Mamão	<i>Carica papaya</i> L.	Caricaceae	20.VI.2006	<i>T. urticae</i>	N. F. Sanches
CE	-40,1200	-2,8856	Acarau		134	Mandioca	<i>Manihot esculenta</i> Crantz	Euphorbiaceae	12.IX.2006	<i>Mononychellus tanajoa</i>	M. C. M. Chagas
CE	-39,4094	-7,2342	Crato		190	Mamão	<i>Carica papaya</i> L.	Caricaceae	20.IX.2007	<i>T. urticae</i>	D. Navia
DF	-47,9167	-15,7833	Brasília	Embrapa Cenargen	166	Tomate - estufa	<i>Solanum lycopersicum</i> L.	Solanaceae	21.V.2007	<i>T. urticae</i>	D. Navia
DF	-47,9167	-15,7833	Brasília	Embrapa Cenargen	167	morango - estufa	<i>Fragaria x ananassa</i> Duch.	Rosaceae	21.V.2007	<i>T. urticae</i>	D. Navia
DF	-47,9167	-15,7833	Brasília	Embrapa Cenargen	168	Tomate	<i>Solanum lycopersicum</i> L.	Solanaceae	01.VI.2007	<i>T. urticae</i>	D. Navia
DF	-47,9167	-15,7833	Brasília	Cenargen	103	Morango	<i>Fragaria x ananassa</i> Duch.	Rosaceae	26.IV.2006	<i>T. mexicanus</i>	D. Navia, L. C. Miranda, R. S. Mendonça
DF	-47,9167	-15,7833	Brasília	Cenargen	198	Tecoma	<i>Tecoma stans</i> (L.)	Bignoniaceae	09.VI.2006	<i>T. ludeni</i>	R. S. Mendonça
DF	-47,9167	-15,7833	Brasília	Cenargen	1	Feijão	<i>Phaseolus vulgaris</i> L.	Fabaceae	01.X.2004	<i>T. urticae</i>	R. S. Mendonça
DF	-47,9167	-15,7833	Brasília	Cenargen	196	Tomate	<i>Solanum lycopersicum</i> L.	Solanaceae	04.V.2008	<i>T. urticae</i>	R. S. Mendonça
DF	-47,8856	-15,8106	Brasília	SQS 403	197	Mamão	<i>Carica papaya</i> L.	Caricaceae	12.VI.2008	<i>T. mexicanus</i>	R. S. Mendonça

* - novos taxons; + - novo hospedeiro; # - nova localidade

ANEXO 2. Resultados dos levantamentos de ácaros Tetranychidae realizados no Brasil, no período de 10/2004 à 07/2008, com informações sobre a localidade, planta hospedeira, data, identificação das espécies e coletor.

UF	Localidade			Descrição do local	Nº	Hospedeiro			Data	Identificação	Coletor
	LONG.	LAT.	Município			Nome comum	Nome científico	Família			
DF	-47,8865	-15,8070	Brasília	SQS 202	199	Rosa	<i>Rosa</i> sp.	Rosaceae	16.VI.2008	<i>T. urticae</i>	R. S. Mendonça
DF	-47,9167	-15,7833	Brasília	Cenargen	2	Morango	<i>Fragaria x ananassa</i> Duch.	Rosaceae	01.X.2004	<i>T. urticae</i>	R. S. Mendonça
DF	-47,8864	-15,8063	Brasília	SQS 202	200	Amora	<i>Morus rubra</i> L.	Moraceae	23.VI.2008	<i>T. bastosi</i> , <i>T. neocaledonicus</i> +	R. S. Mendonça
DF	-47,9167	-15,7833	Brasília	Cenargen	3	Centroceima	<i>Centrosema</i> sp	Fabaceae	01.X.2004	<i>T. urticae</i>	R. S. Mendonça
DF	-47,9167	-15,7833	Brasília	Cenargen	31	Amendoin forrageiro	<i>Arachis pintoii</i> Krap. & Greg.	Fabaceae	07.XII.2005	<i>T. ogmophallos</i>	R. S. Mendonça
DF	-47,9167	-15,7833	Brasília	Cenargen	75	Algodão	<i>Gossypium hirsutum</i> L.	Malvaceae	24.II.2006	<i>T. desertorum</i>	R. S. Mendonça
DF	-47,9167	-15,7833	Brasília	Cenargen	85	Manjerição	<i>Ocimum basilicum</i> L.	Lamiaceae	23.VII.2006	<i>T. neocaledonicus</i> +	R.S. Mendonça
DF	-47,9167	-15,7833	Brasília	Cenargen	86	Feijão	<i>Phaseolus vulgaris</i> L.	Fabaceae	23.VII.2006	<i>T. ludeni</i>	R.S. Mendonça
DF	-48,2000	-15,6833	Brazlândia		169	Tomate	<i>Solanum lycopersicum</i> L.	Solanaceae	22.VI.2007	<i>T. urticae</i>	D. Navia
DF	-48,2001	-15,6834	Brazlândia		170	Mamona	<i>Ricinus communis</i> L.	Euphorbiaceae	22.VI.2007	<i>T. ludeni</i>	D. Navia
DF	-48,2000	-15,6833	Brazlândia		171	Morango	<i>Fragaria x ananassa</i> Duch.	Rosaceae	02.VII.2007	<i>T. urticae</i>	D. Navia
DF	-48,2000	-15,6833	Brazlândia		172	Tomate	<i>Solanum lycopersicum</i> L.	Solanaceae	02.VII.2007	<i>T. urticae</i>	D. Navia
DF	-48,1405	-15,9423	Gama	Embrapa, CNPh	30	Feijão fava	<i>Phaseolus lunatus</i> L.	Fabaceae	07.XII.2005	<i>T. urticae</i> +, <i>E. banksi</i> +	R. S. Mendonça
DF	-47,9443	-15,9285	Núcleo Bandeirantes	Vargem Bonita	16	Mandioca	<i>Manihot esculenta</i> Crantz	Euphorbiaceae	23..XI.2005	<i>M. tanajoa</i>	R. S. Mendonça
DF	-47,9443	-15,9285	Núcleo Bandeirantes	Vargem Bonita	17	Feijão	<i>Phaseolus vulgaris</i> L.	Fabaceae	23..XI.2005	<i>T. desertorum</i> , <i>M. tanajoa</i> +	R. S. Mendonça
DF	-47,5120	-15,6399	Planaltina	Taquara	10	Berinjela	<i>Solanum melongena</i> L.	Solanaceae	17.XI.2005	<i>T. urticae</i>	R. S. Mendonça
DF	-47,4888	-15,5224	Planaltina	Pipiripau	11	Jiló	<i>Solanum gilo</i> Raddi	Solanaceae	22..XI.2005	<i>T. desertorum</i> +, <i>E. banksi</i> +	R. S. Mendonça
DF	-47,4888	-15,5224	Planaltina	Pipiripau	12	Berinjela	<i>Solanum melongena</i> L.	Solanaceae	22..XI.2005	<i>T. urticae</i> , <i>M. planki</i>	R. S. Mendonça

* - novos taxons; + - novo hospedeiro; # - nova localidade

ANEXO 2. Resultados dos levantamentos de ácaros Tetranychidae realizados no Brasil, no período de 10/2004 à 07/2008, com informações sobre a localidade, planta hospedeira, data, identificação das espécies e coletor.

UF	Localidade			Descrição do local	Nº	Hospedeiro			Data	Identificação	Coletor
	LONG.	LAT.	Município			Nome comum	Nome científico	Família			
DF	-47,4888	-15,5224	Planaltina	Pipiripau	13	Algodão	<i>Gossypium hirsutum</i> L.	Malvaceae	22..XI.2005	<i>T. urticae</i> , <i>M. planki</i>	R. S. Mendonça
DF	-47,4888	-15,5224	Planaltina	Pipiripau	14	Feijão	<i>Phaseolus vulgaris</i> L.	Fabaceae	22..XI.2005	<i>T. urticae</i> , <i>M. planki</i>	R. S. Mendonça
DF	-47,7222	-15,5299	Planaltina	Upis	26	Mandioca	<i>Manihot esculenta</i> Crantz	Euphorbiaceae	06.XII.2005	<i>M. tanajoa</i>	R. S. Mendonça
DF	-47,7222	-15,5299	Planaltina	Upis	27	Maracujá	<i>Passiflora edulis</i> Sims	Passifloraceae	06.XII.2005	<i>M. tanajoa</i> +	R. S. Mendonça
DF	-47,7222	-15,5299	Planaltina	Upis	28	Algodão	<i>Gossypium hirsutum</i> L.	Malvaceae	06.XII.2005	<i>M. planki</i>	R. S. Mendonça
DF	-47,7222	-15,5299	Planaltina	Upis	29	Mandioca	<i>Manihot esculenta</i> Crantz	Euphorbiaceae	06.XII.2005	<i>M. tanajoa</i>	R. S. Mendonça
DF	-47,5120	-15,6399	Planaltina	Taquara	4	Feijão	<i>Phaseolus vulgaris</i> L.	Fabaceae	17.XI.2005	<i>T. ludeni</i> , <i>T. urticae</i> , <i>T. desertorum</i>	R. S. Mendonça
DF	-47,5120	-15,6399	Planaltina	Taquara	5	Maracujá	<i>Passiflora edulis</i> Sims	Passifloraceae	17.XI.2005	<i>T. mexicanus</i>	R. S. Mendonça
DF	-47,5120	-15,6399	Planaltina	Taquara	6	Quiabo	<i>Abelmoschus esculentus</i> (L.) Moench	Malvaceae	17.XI.2005	<i>T. neocaledonicus</i> , <i>M. planki</i>	R. S. Mendonça
DF	-47,5120	-15,6399	Planaltina	Taquara	7	Mandioca	<i>Manihot esculenta</i> Crantz	Euphorbiaceae	17.XI.2005	<i>M. tanajoa</i>	R. S. Mendonça
DF	-47,5120	-15,6399	Planaltina	Taquara	8	Berinjela	<i>Solanum melongena</i> L.	Solanaceae	17.XI.2005	<i>T. urticae</i> , <i>M. tanajoa</i>	R. S. Mendonça
DF	-48,1180	-15,9087	Recanto das Emas	FTB	18	Morango	<i>Fragaria x ananassa</i> Duch.	Rosaceae	28.XI.2005	<i>T. urticae</i>	R. S. Mendonça
DF	-48,1180	-15,9087	Recanto das Emas	FTB	19	Feijão	<i>Phaseolus vulgaris</i> L.	Fabaceae	28.XI.2005	<i>T. urticae</i>	R. S. Mendonça
DF	-48,1180	-15,9087	Recanto das Emas	FTB	20	Berinjela	<i>Solanum melongena</i> L.	Solanaceae	28.XI.2005	<i>T. desertorum</i> +, <i>E. banksi</i> +	R. S. Mendonça
DF	-48,1180	-15,9087	Recanto das Emas	FTB	21	Magnólia amarela	<i>Michelia champaca</i> L.	Magnoliaceae	28.XI.2005	<i>T. desertorum</i> +, <i>E. banksi</i> +	R. S. Mendonça
DF	-48,1180	-15,9087	Recanto das Emas	FTB	22	Feijão vagem	<i>Phaseolus vulgaris</i> L.	Fabaceae	28.XI.2005	<i>T. desertorum</i> , <i>M. planki</i>	R. S. Mendonça
DF	-48,1180	-15,9087	Recanto das Emas	FTB	23	Maracujá	<i>Passiflora edulis</i> Sims	Passifloraceae	28.XI.2005	<i>T. mexicanus</i>	R. S. Mendonça
DF	-48,1180	-15,9087	Recanto das Emas	FTB	24	Alpínia	<i>Alpinia purpurata</i> K. Schum	Zingiberaceae	28.XI.2005	<i>T. urticae</i> +	R. S. Mendonça

* - novos taxons; + - novo hospedeiro; # - nova localidade

ANEXO 2. Resultados dos levantamentos de ácaros Tetranychidae realizados no Brasil, no período de 10/2004 à 07/2008, com informações sobre a localidade, planta hospedeira, data, identificação das espécies e coletor.

Localidade					Hospedeiro				Data	Identificação	Coletor
UF	LONG.	LAT.	Município	Descrição do local	Nº	Nome comum	Nome científico	Família			
DF	-48,1180	-15,9087	Recanto das Emas	FTB	25	Batata doce	<i>Ipomoeae batatas</i> L.	Convolvulaceae	28.XI.2005	<i>T. ludeni</i> , <i>T. bastosi</i>	R. S. Mendonça
DF	-47,5583	-15,7578	Tabatinga	Rio Preto	129	Algodão	<i>Gossypium hirsutum</i> L.	Malvaceae	17.V.2006	<i>T. urticae</i> , <i>M. planki</i>	R.S. Mendonça
ES	-40,0722	-19,3911	Linhares	Faz. S. Terezinha	133	Mamão	<i>Carica papaya</i> L.	Caricaceae	03.XI.2006	<i>T. urticae</i>	M. Suzuki
ES	-40,0722	-19,3911	Linhares	Faz. Romana	140	Mamão	<i>Carica papaya</i> L.	Caricaceae	03.XI.2006	<i>T. urticae</i>	M. Suzuki
ES	-40,0722	-19,3911	Linhares	Faz. S. Terezinha	157	Mamão	<i>Carica papaya</i> L.	Caricaceae	03.XI.2006	<i>T. urticae</i>	M. Suzuki
ES	-40,0722	-19,3911	Linhares	Faz. S. Terezinha	158	Mamão	<i>Carica papaya</i> L.	Caricaceae	03.XI.2006	<i>T. urticae</i>	M. Suzuki
ES	-40,0978	-19,1969	Sooretama		141	Mamão	<i>Carica papaya</i> L.	Caricaceae	03.XI.2006	<i>T. urticae</i>	M. Suzuki
GO	-48,6333	-17,7500	Caldas Novas		102	Soja	<i>Glycine max</i> Merrill	Fabaceae	23.IV.2006	<i>M. planki</i>	D. Navia, L. C. Miranda, R. S. Mendonça
GO	-47,7500	-16,6217	Cristalina		36	Soja	<i>Glycine max</i> Merrill	Fabaceae	19.XII.2005	<i>M. planki</i>	R. S. Mendonça
GO	-47,7499	-16,6217	Cristalina	BR040 Km 181	76	Soja	<i>Glycine max</i> Merrill	Fabaceae	07.IV.2006	<i>M. planki</i>	D. Navia, L. C. Miranda, R. S. Mendonça
GO	-47,4199	-16,8609	Cristalina	BR040Km124	78	Soja	<i>Glycine max</i> Merrill	Fabaceae	07.IV.2006	<i>M. planki</i>	D. Navia, L. C. Miranda, R. S. Mendonça
GO	-47,8367	-16,3443	Luiziânia	Posto Corujão	32	Feijão	<i>Phaseolus vulgaris</i> L.	Fabaceae	19.XII.2005	<i>T. urticae</i>	R. S. Mendonça
GO	-47,8367	-16,3443	Luiziânia	Posto Corujão	33	Mamona	<i>Ricinus communis</i> L.	Euphorbiaceae.	19.XII.2005	<i>T. ludeni</i> , <i>O. mangiferus</i> +	R. S. Mendonça
GO	-47,8367	-16,3443	Luiziânia	Posto Corujão	34	Mamão	<i>Carica papaya</i> L.	Caricaceae	19.XII.2005	<i>T. urticae</i>	R. S. Mendonça
GO	-47,8367	-16,3443	Luiziânia	Posto Corujão	35	Mandioca	<i>Manihot esculenta</i> Crantz	Euphorbiaceae	19.XII.2005	<i>M. tanajoa</i>	R. S. Mendonça
MG	-45,9011	-21,6564	Alfenas	UNIFENAS	60	Feijão	<i>Phaseolus vulgaris</i> L.	Fabaceae	22.I.2006	<i>T. ludeni</i> , <i>M. planki</i>	R. S. Mendonça
MG	-45,9011	-21,6564	Alfenas	UNIFENAS	61	Jiló	<i>Solanum gilo</i> Raddi	Solanaceae	22.I.2006	<i>T. urticae</i>	R. S. Mendonça
MG	-45,9011	-21,6564	Alfenas	UNIFENAS	62	Laranja	<i>Citrus sinensis</i> Osbeck	Rutaceae	22.I.2006	<i>T. mexicanus</i>	R. S. Mendonça

* - novos taxons; + - novo hospedeiro; # - nova localidade

ANEXO 2. Resultados dos levantamentos de ácaros Tetranychidae realizados no Brasil, no período de 10/2004 à 07/2008, com informações sobre a localidade, planta hospedeira, data, identificação das espécies e coletor.

UF	Localidade			Descrição do local	Nº	Hospedeiro			Data	Identificação	Coletor
	LONG.	LAT.	Município			Nome comum	Nome científico	Família			
MG	-45,4470	-21,7900	Campanha		43	Mandioca	<i>Manihot esculenta</i> Crantz	Euphorbiaceae	20.XII.2005	<i>M. tanajoa</i>	R. S. Mendonça
MG	-46,3715	-18,9139	Carmo do Paranaíba		41	Mandioca	<i>Manihot esculenta</i> Crantz	Euphorbiaceae	19.XII.2005	<i>M. tanajoa</i>	R. S. Mendonça
MG	-46,0172	-22,4628	Estiva	Olaria	69	Morango	<i>Fragaria x ananassa</i> Duch.	Rosaceae	13.I.2006	<i>T. urticae</i>	V. F. Silva
MG	-46,0172	-22,4628	Estiva	Olaria	69	Morango	<i>Fragaria x ananassa</i> Duch.	Rosaceae	13.I.2006	<i>T. urticae</i>	V. F. Silva
MG	-46,0172	-22,4628	Estiva	Corrego Mulatos	70	Morango	<i>Fragaria x ananassa</i> Duch.	Rosaceae	18.I.2006	<i>T. urticae</i>	V. F. Silva
MG	-46,0172	-22,4628	Estiva	Corrego Mulatos	71	Morango	<i>Fragaria x ananassa</i> Duch.	Rosaceae	18.I.2006	<i>T. urticae</i>	E. J. Rezende
MG	-46,0172	-22,4628	Estiva	Corrego Mulatos	72	Morango	<i>Fragaria x ananassa</i> Duch.	Rosaceae	13.I.2006	<i>T. urticae</i>	E. J. Rezende
MG	-45,4470	-21,7900	Extrema		44	Maracujá	<i>Passiflora edulis</i> Sims	Passifloraceae	21.XII.2005	<i>T. desertorum</i>	R. S. Mendonça
MG	-43,6744	-15,3383	Jaíba	Mocambinho	84	Pinha	<i>Anona squamosa</i> L.	Anonaceae	08.IV.2006	<i>O. anonae</i> +	D. Navia, L. C. Miranda, R. S. Mendonça
MG	-43,6744	-15,3383	Jaíba	Mocambinho	87	Mamão	<i>Carica papaya</i> L.	Caricaceae	08.IV.2006	<i>E. banksi</i>	D. Navia, L. C. Miranda, R. S. Mendonça
MG	-43,6744	-15,3383	Jaíba	Mocambinho	88	Mandioca	<i>Manihot esculenta</i> Crantz	Euphorbiaceae	08.IV.2006	<i>M. tanajoa</i>	D. Navia, L. C. Miranda, R. S. Mendonça
MG	-43,3110	-15,8025	Janaúba	UNIMONTES	100	Mandioca	<i>Manihot esculenta</i> Crantz	Euphorbiaceae	10.IV.2006	<i>M. tanajoa</i>	D. Navia, L. C. Miranda, R. S. Mendonça
MG	-47,7499	-16,6218	Lagoa Grande		37	Uva	<i>Vitis vinifera</i> L.	Viataceae	19.XII.2005	<i>T. urticae</i>	R. S. Mendonça
MG	-47,7499	-16,6218	Lagoa Grande		38	Mandioca	<i>Manihot esculenta</i> Crantz	Euphorbiaceae	19.XII.2005	<i>M. tanajoa</i>	R. S. Mendonça
MG	-46,4644	-17,6197	Lagoa Grande	Parada Doce	79	Algodão	<i>Gossypium hirsutum</i> L.	Malvaceae	07.IV.2006	<i>T. ludeni</i> , <i>T. mexicanus</i>	D. Navia, L. C. Miranda, R. S. Mendonça
MG	-46,4644	-17,6197	Lagoa Grande	Parada Doce	80	Mamão	<i>Carica papaya</i> L.	Caricaceae	07.IV.2006	<i>T. mexicanus</i>	D. Navia, L. C. Miranda, R. S. Mendonça
MG	-46,4644	-17,6197	Lagoa Grande	Parada Doce	81	Mandioca	<i>Manihot esculenta</i> Crantz	Euphorbiaceae	07.IV.2006	<i>M. tanajoa</i>	D. Navia, L. C. Miranda, R. S. Mendonça
MG	-46,3775	-17,6602	Lagoa Grande	Parada Pamonha	82	Maracujá	<i>Passiflora edulis</i> Sims	Passifloraceae	07.IV.2006	<i>T. mexicanus</i> , <i>E. banksi</i> +	D. Navia, L. C. Miranda, R. S. Mendonça

* - novos taxons; + - novo hospedeiro; # - nova localidade

ANEXO 2. Resultados dos levantamentos de ácaros Tetranychidae realizados no Brasil, no período de 10/2004 à 07/2008, com informações sobre a localidade, planta hospedeira, data, identificação das espécies e coletor.

Localidade				Hospedeiro			Data	Identificação	Coletor		
UF	LONG.	LAT.	Município	Descrição do local	Nº	Nome comum				Nome científico	Família
MG	-45,4611	-17,8465	Lassance	BR365 Km 255	83	Soja	<i>Glycine max</i> Merrill	Fabaceae	07.IV.2006	<i>T. urticae</i> , <i>M. planki</i>	D. Navia, L. C. Miranda, R. S. Mendonça
MG	-45,0028	-21,2417	Lavras	UFLA	107	Tomate	<i>Solanum lycopersicum</i> L.	Solanaceae	09.V.2006	<i>T. urticae</i>	D. Navia, L. C. Miranda, R. S. Mendonça
MG	-45,0028	-21,2417	Lavras	UFLA	108	Limão Taiti	<i>Citrus latifolia</i> Tanaka	Rutaceae	09.V.2006	<i>T. mexicanus</i>	D. Navia, L. C. Miranda, R. S. Mendonça
MG	-45,0028	-21,2417	Lavras	UFLA	109	Ameixa	<i>Prunus domestica</i> L.	Rosaceae	09.V.2006	<i>T. ludeni</i> +	D. Navia, L. C. Miranda, R. S. Mendonça
MG	-45,0028	-21,2417	Lavras	UFLA	110	Limão Cravo	<i>Citrus limonia</i> L. Osbeck	Rutaceae	09.V.2006	<i>T. ludeni</i> +, <i>E. banksi</i>	D. Navia, L. C. Miranda, R. S. Mendonça
MG	-45,0028	-21,2417	Lavras	UFLA	111	Maracujá	<i>Passiflora edulis</i> Sims	Passifloraceae	09.V.2006	<i>T. mexicanus</i>	D. Navia, L. C. Miranda, R. S. Mendonça
MG	-45,0028	-21,2417	Lavras	UFLA	112	Ameixa	<i>Prunus domestica</i> L.	Rosaceae	09.V.2006	<i>T. urticae</i>	D. Navia, L. C. Miranda, R. S. Mendonça
MG	-45,0028	-21,2417	Lavras	UFLA	113	Mamão	<i>Carica papaya</i> L.	Caricaceae	09.V.2006	<i>T. urticae</i>	D. Navia, L. C. Miranda, R. S. Mendonça
MG	-45,0028	-21,2417	Lavras	UFLA	114	Acerola	<i>Malpighia glabra</i> L.	Malpighiaceae	09.V.2006	<i>T. mexicanus</i>	D. Navia, L. C. Miranda, R. S. Mendonça
MG	-45,0028	-21,2417	Lavras	UFLA	115	Cipó-de-São-João	<i>Pyrostegia venusta</i> Miers	Bignoniaceae	09.V.2006	<i>T. urticae</i> +	D. Navia, L. C. Miranda, R. S. Mendonça
MG	-45,0028	-21,2417	Lavras	UFLA	116	Pinhão manso	<i>Jatropha curcas</i> L.	Euphorbiaceae	09.V.2006	<i>T. urticae</i>	D. Navia, L. C. Miranda, R. S. Mendonça
MG	-45,0028	-21,2417	Lavras	UFLA	117	Rosa	<i>Rosa</i> sp.	Rosaceae	09.V.2006	<i>T. mexicanus</i>	D. Navia, L. C. Miranda, R. S. Mendonça
MG	-45,0028	-21,2417	Lavras	UFLA	118	Magnólia amarela	<i>Michelia champana</i> L.	Magnoliaceae	09.V.2006	<i>T. desertorum</i> +, <i>E. banksi</i> +	D. Navia, L. C. Miranda, R. S. Mendonça
MG	-45,9834	-21,6566	Machado		63	Mandioca	<i>Manihot esculenta</i> Crantz	Euphorbiaceae	23.I.2006	<i>M. tanajoa</i>	R. S. Mendonça
MG	-46,9791	-21,1700	Monte S. de Minas		64	Feijão	<i>Phaseolus vulgaris</i> L.	Fabaceae	24.I.2006	<i>M. planki</i>	R. S. Mendonça
MG	-43,3006	-15,8025	Nova Porteirinha	Viveiro Suculentas	94	Jatropha	<i>Jatropha</i> sp.	Euphorbiaceae	09.IV.2006	<i>T. bastosi</i>	D. Navia, L. C. Miranda, R. S. Mendonça
MG	-43,3006	-15,8025	Nova Porteirinha	Viveiro Suculentas	96	Baobá	<i>Adansonia digitata</i> L.	Bombacaceae	09.IV.2006	<i>T. urticae</i>	D. Navia, L. C. Miranda, R. S. Mendonça
MG	-43,3006	-15,8025	Nova Porteirinha	EPAMIG	97	Mamão	<i>Carica papaya</i> L.	Caricaceae	10.IV.2006	<i>E. banksi</i>	D. Navia, L. C. Miranda, R. S. Mendonça

* - novos taxons; + - novo hospedeiro; # - nova localidade

ANEXO 2. Resultados dos levantamentos de ácaros Tetranychidae realizados no Brasil, no período de 10/2004 à 07/2008, com informações sobre a localidade, planta hospedeira, data, identificação das espécies e coletor.

Localidade				Hospedeiro			Data	Identificação	Coletor		
UF	LONG.	LAT.	Município	Descrição do local	Nº	Nome comum				Nome científico	Família
MG	-43,3006	-15,8025	Nova Porteirinha	EPAMIG	98	Algodão silvestre	<i>Gossypium barbadense</i> L.	Malvaceae	10.IV.2006	<i>T. bastosi</i> +	D. Navia, L. C. Miranda, R. S. Mendonça
MG	-43,3006	-15,8025	Nova Porteirinha	EPAMIG	99	Banana	<i>Musa</i> sp.	Musaceae	10.IV.2006	<i>T. abacae</i>	D. Navia, L. C. Miranda, R. S. Mendonça
MG	-47,0096	-17,3122	Paracatu		105	Mandioca	<i>Manihot esculenta</i> Crantz	Euphorbiaceae	09.IV.2007	<i>M. tanajoa</i>	D. Navia, L. C. Miranda, R. S. Mendonça
MG	-47,0096	-17,3122	Paracatu		104	Algodão	<i>Gossypium hirsutum</i> L.	Malvaceae	09.IV.2006	<i>M. planki</i> , <i>T. ludeni</i>	D. Navia, L. C. Miranda, R. S. Mendonça
MG	-47,0096	-17,3122	Paracatu		106	Mamão	<i>Carica papaya</i> L.	Caricaceae	09.IV.2007	<i>T. bastosi</i>	D. Navia, L. C. Miranda, R. S. Mendonça
MG	-46,6126	-17,4855	Paracatu		77	mamão	<i>Carica papaya</i> L.	Caricaceae	07.IV.2006	<i>T. mexicanus</i>	D. Navia, L. C. Miranda, R. S. Mendonça
MG	-46,4608	-18,5823	Patos de Minas		39	Algodão	<i>Gossypium hirsutum</i> L.	Malvaceae	19.XII.2005	<i>M. planki</i>	R. S. Mendonça
MG	-46,4608	-18,5823	Patos de Minas		40	Gerânio	<i>Pelargonium hortorum</i> L.H.Bailey	Geraniaceae	19.XII.2005	<i>T. ludeni</i> +	R. S. Mendonça
MG	-44,9419	-17,3450	Pirapora	Parada Uva	101	Uva	<i>Vitis vinifera</i> L.	Vitaceae	12.IV.2006	<i>T. mexicanus</i> +, <i>P. ulmi</i> #, <i>O. aff. mangiferus</i> , <i>Oligonychus</i> n. sp.1*	D. Navia, L. C. Miranda, R. S. Mendonça
MG	-43,6851	-20,3294	Recanto Novo		135	Dama-da-Noite	<i>Cestrum intermedium</i> Sendtn.	Solanaceae	13.V.2006	<i>T. neocaledonicus</i> +	D. Navia, L. C. Miranda, R. S. Mendonça
MG	-43,6851	-20,3294	Recanto Novo		136	Romã	<i>Punica granatum</i> L.	Punicaceae	13.V.2006	<i>Oligonychus mangiferus</i> +	D. Navia, L. C. Miranda, R. S. Mendonça
MG	-43,6851	-20,3294	Recanto Novo		137	Mussaenda rosa	<i>Mussaenda</i> sp.	Rubiaceae	13.V.2006	<i>O. mangiferus</i> +	D. Navia, L. C. Miranda, R. S. Mendonça
MG	-46,2500	-19,2000	Rio Paranaíba		42	Soja	<i>Glycine max</i> Merrill	Fabaceae	19.XII.2005	<i>T. desertorum</i> , <i>M. planki</i>	R. S. Mendonça
MG	-44,9731	-21,2272	S. Sebastião Vitória		124	Feijão	<i>Phaseolus vulgaris</i> L.	Fabaceae	10.V.2006	<i>T. ludeni</i> , <i>M. planki</i>	D. Navia, L. C. Miranda, R. S. Mendonça
MG	-44,9731	-21,2272	S. Sebastião Vitória		125	Mandioca	<i>Manihot esculenta</i> Crantz	Euphorbiaceae	10.V.2006	<i>T. urticae</i> , <i>M. tanajoa</i>	D. Navia, L. C. Miranda, R. S. Mendonça
MG	-46,1000	-22,3660	Tocos do Mogi		73	Morango	<i>Fragaria x ananassa</i> Duch.	Rosaceae	20.I.2006	<i>T. urticae</i>	B. P. Silva
MG	-46,1000	-22,3660	Tocos do Mogi		74	Morango	<i>Fragaria x ananassa</i> Duch.	Rosaceae	20.I.2006	<i>T. desertorum</i>	A. C. Silva
MG	-45,2071	-18,2400	Três Marias		121	Eritrina, brasileiro	<i>Erythrina indica</i> Lam.	Fabaceae	09.IV.2006	<i>T. mexicanus</i> +	D. Navia, L. C. Miranda, R. S. Mendonça

* - novos taxons; + - novo hospedeiro; # - nova localidade

ANEXO 2. Resultados dos levantamentos de ácaros Tetranychidae realizados no Brasil, no período de 10/2004 à 07/2008, com informações sobre a localidade, planta hospedeira, data, identificação das espécies e coletor.

UF	Localidade			Nº	Hospedeiro			Data	Identificação	Coletor	
	LONG.	LAT.	Município		Descrição do local	Nome comum	Nome científico				Família
MG	-45,2071	-18,2400	Três Marias		122	Rosa	<i>Rosa</i> sp.	Rosaceae	09.IV.2006	<i>T. neocaledonicus</i>	D. Navia, L. C. Miranda, R. S. Mendonça
MG	-45,2071	-18,2400	Três Marias		123	Rosa virose	<i>Rosa</i> sp.	Rosaceae	09.IV.2006	<i>Oligonychus</i> n. sp. 2 *	D. Navia, L. C. Miranda, R. S. Mendonça
MG	-47,9743	-19,7037	Uberaba		65	Mandioca	<i>Manihot esculenta</i> Crantz	Euphorbiaceae	24.I.2006	<i>M. tanajoa</i>	R. S. Mendonça
MG	-47,9743	-19,7037	Uberaba		66	Feijão	<i>Phaseolus vulgaris</i> L.	Fabaceae	24.I.2006	<i>M. planki</i>	R. S. Mendonça
MG	-47,9743	-19,7037	Uberaba		67	Algodão	<i>Gossypium hirsutum</i> L.	Malvaceae	24.I.2006	<i>T. ludeni</i> , <i>M. planki</i>	R. S. Mendonça
MG	-47,9743	-19,7037	Uberaba		68	Soja	<i>Glycine max</i> Merrill	Fabaceae	24.I.2006	<i>M. planki</i>	R. S. Mendonça
MG	-48,2772	-18,9186	Uberlândia		181	Mamão	<i>Carica papaya</i> L.	Caricaceae	05.VII.2007	<i>T. urticae</i>	D. Navia
MG	-42,8819	-20,7539	Viçosa	UFV	119	Acalifa	<i>Acalypha wilkesiana</i> Mull.Arg.	Euphorbiaceae	13.V.2006	<i>E. tremae</i>	D. Navia, L. C. Miranda, R. S. Mendonça
MS	-52,6228	-18,7942	Chapadão do Sul		152	Algodão	<i>Gossypium hirsutum</i> L.	Malvaceae	11.XII.2006	<i>T. urticae</i>	M. R. Vieira
MS	-54,8056	-22,2210	Dourados	UFGD	120	Algodão	<i>Gossypium hirsutum</i> L.	Malvaceae	04.IX.2006	<i>T. urticae</i>	R. Suakane
MS	-54,8056	-22,2211	Dourados	UFGD	145	Soja	<i>Glycine max</i> Merrill	Fabaceae	14.XII.2006	<i>T. urticae</i>	M. Suzuki
PE	-40,5008	-9,3986	Petrolina		189	Mamão	<i>Carica papaya</i> L.	Caricaceae	18.IX.2007	<i>T. urticae</i>	D. Navia, M. G. C. Gondim
PE	-34,9166	-7,8237	Recife		175	Mamão	<i>Carica papaya</i> L.	Caricaceae	13.VI.2007	<i>T. urticae</i>	M. G. C. Gondim
PE	-34,9166	-7,8237	Recife		188	Maria-pretinha	<i>Solanum americanum</i> Mill.	Solanaceae	24.IX.2007	<i>T. urticae</i>	A. Migeon
PE	-34,9165	-7,8239	Recife	UFRPE	15	Mamão	<i>Carica papaya</i> L.	Caricaceae	16.XII.2005	<i>T. urticae</i>	M.G. C. Gondim
PE	-34,9165	-7,8239	Recife	UFRPE	89	Maria-pretinha	<i>Solanum americanum</i> Mill.	Solanaceae	11.VIII.2006	<i>T. evansi</i>	D. Navia, L. C. Miranda, R. S. Mendonça
PE	-34,9165	-7,8239	Recife	UFRPE	90	Mamão	<i>Carica papaya</i> L.	Caricaceae	11.VIII.2006	<i>T. mexicanus</i>	D. Navia, L. C. Miranda, R. S. Mendonça
PE	-34,9165	-7,8239	Recife	UFRPE	91	Algodão	<i>Gossypium hirsutum</i> L.	Malvaceae	11.VIII.2006	<i>T. urticae</i>	D. Navia, L. C. Miranda, R. S. Mendonça

* - novos taxons; + - novo hospedeiro; # - nova localidade

ANEXO 2. Resultados dos levantamentos de ácaros Tetranychidae realizados no Brasil, no período de 10/2004 à 07/2008, com informações sobre a localidade, planta hospedeira, data, identificação das espécies e coletor.

Localidade					Hospedeiro				Data	Identificação	Coletor
UF	LONG.	LAT.	Município	Descrição do local	Nº	Nome comum	Nome científico	Família			
PE	-34,9117	-7,9458	Recife	Faz. Mumbecas	92	Mamão	<i>Carica papaya</i> L.	Caricaceae	11.VIII.2006	<i>T. evansi</i> +, <i>T. mexicanus</i> , <i>E. banksi</i>	D. Navia, L. C. Miranda, R. S. Mendonça
PE	-34,9165	-7,8239	Recife	UFRPE	93	Mamona	<i>Ricinus communis</i> L.	Euphorbiaceae	11.VIII.2006	<i>T. ludeni</i>	D. Navia, L. C. Miranda, R. S. Mendonça
PE	-34,9165	-7,8239	Recife	UFRPE	95	Acacia	<i>Acacia</i> sp.	Fabaceae	11.VIII.2006	<i>E. banksi</i> +	D. Navia, L. C. Miranda, R. S. Mendonça
PR	-49,2780	-25,4109	Curitiba	UFPR - estufa	191	Feijão	<i>Phaseolus vulgaris</i> L.	Fabaceae	15.VI.2007	<i>T. urticae</i>	L. Monteiro
PR	-52,4272	-31,7786	Curitiba	Chác. Morango Natural	192	morango	<i>Fragaria x ananassa</i> Duch.	Rosaceae	09.IX.2007	<i>T. urticae</i>	L. Monteiro
PR	-49,2780	-25,4109	Curitiba	UFPR (Dep Fitot)	194	Feijão	<i>Phaseolus vulgaris</i> L.	Fabaceae	09.XI.2007	<i>T. urticae</i>	L. Monteiro
PR	-51,0364	-23,0586	Sertanópolis	CNPso	9	Soja	<i>Glycine max</i> Merrill	Fabaceae	10.II.2005	<i>M. planki</i>	D. S. Gomes
RN	-35,3539	-5,8583	Macaíba		163	Mandioca	<i>Manihot esculenta</i> Crantz	Euphorbiaceae	10.IX.2006	<i>M. tanajoa</i>	M. C. M. Chagas
RN	-37,3442	-5,1875	Mossoró		144	Mamão	<i>Carica papaya</i> L.	Caricaceae	05.VII.2006	<i>T. urticae</i>	Eltom
RN	-37,3442	-5,1875	Mossoró		148	Mamão	<i>Carica papaya</i> L.	Caricaceae	05.VII.2006	<i>T. gloveri</i>	Eltom
RR	-60,9833	1,9333	Boa Vista	Embrapa Roraima	176	Milho	<i>Zea mays</i> L.	Poaceae	17.V.2007	<i>T. urticae</i>	D. Navia
RR	-60,9833	1,9333	Boa Vista	Embrapa Roraima	177	Maracuja	<i>Passiflora edulis</i> Sims	Passifloraceae	17.V.2007	<i>T. urticae</i> +	D. Navia
RR	-60,9833	1,9333	Boa Vista	Embrapa Roraima	178	Banana	<i>Musa</i> sp.	Musaceae	17.V.2007	<i>T. urticae</i>	D. Navia
RR	-60,9833	1,9333	Boa Vista	Embrapa Roraima	179	Mandioca	<i>Manihot esculenta</i> Crantz	Euphorbiaceae	17.V.2007	<i>T. urticae</i>	D. Navia
RR	-60,6733	1,9333	Boa Vista	Embrapa Roraima	154	Melancia	<i>Citrullus lanatus</i> (Thunb.)	Cucurbitaceae	29.III.2005	<i>T. ludeni</i> +	D. Navia
RR	-60,6733	1,9333	Boa Vista	Embrapa Roraima	155	Soja	<i>Glycine max</i> Merrill	Fabaceae	18.VIII.2006	<i>T. ludeni</i> , <i>M. planki</i>	D. Navia
RR	-60,6733	1,9333	Boa Vista	Embrapa Roraima	156	Melancia	<i>Citrullus lanatus</i> (Thunb.)	Cucurbitaceae	12.III.2005	<i>T. ludeni</i> +	D. Navia
RR	-60,6733	1,9333	Boa Vista	Embrapa Roraima	159	Mandioca	<i>Manihot esculenta</i> Crantz	Euphorbiaceae	15.III.2005	<i>M. tanajoa</i>	D. Navia

* - novos taxons; + - novo hospedeiro; # - nova localidade

ANEXO 2. Resultados dos levantamentos de ácaros Tetranychidae realizados no Brasil, no período de 10/2004 à 07/2008, com informações sobre a localidade, planta hospedeira, data, identificação das espécies e coletor.

UF	Localidade			Descrição do local	Nº	Hospedeiro			Data	Identificação	Coletor
	LONG.	LAT.	Município			Nome comum	Nome científico	Família			
RR	-60,6733	1,9333	Boa Vista	Embrapa Roraima	160	Soja	<i>Glycine max</i> Merrill	Fabaceae	18.VIII.2006	<i>T. desertorum</i> , <i>M. planki</i>	D. Navia
RR	-60,6733	1,9333	Boa Vista	Embrapa Roraima	162	Melancia	<i>Citrullus lanatus</i> (Thunb.)	Cucurbitaceae	30.III.2005	<i>T. ludeni</i> +	D. Navia
RS	-53,8978	-27,4800	Bela Vista	Três Passos	182	Gerbera	<i>Gerbera hybrida</i> Hort.	Asteraceae	28.IX.2007	<i>T. urticae</i>	D. Navia
RS	-53,8978	-27,4800	Bela Vista	Três Passos	184	Pepino	<i>Cucumis sativus</i> L.	Cucurbitaceae	28.IX.2007	<i>T. urticae</i>	D. Navia
RS	-53,8978	-27,4800	Bela Vista	Três Passos	186	Morango	<i>Fragaria x ananassa</i> Duch.	Rosaceae	28.IX.2007	<i>T. urticae</i>	D. Navia
RS	-52,9986	-28,8861	Campos Borges		149	Soja	<i>Glycine max</i> Merrill	Fabaceae	16.III.2006	<i>T. urticae</i> , <i>T. desertorum</i>	S. Roggia
RS	-53,7647	-29,6097	Itaara		206	Capim coqueirinho	<i>Eustachys disticophylla</i> (Lag.) Nees	Poaceae	08.II.2007	<i>Monoceronychus</i> n. sp.1 *	D. Navia, P. R. V. S. Pereira
RS	-56,5531	-29,1253	Itaqui		187	cravorana	<i>Ambrosia polystachya</i> DC.	Asteraceae	29.IX.2007	<i>T. urticae</i> +	D. Navia
RS	-52,8208	-28,4592	Não-me-Toque		117	Soja	<i>Glycine max</i> Merrill	Fabaceae	11.III.2005	<i>T. mexicanus</i>	S. Roggia
RS	-52,4000	-28,2667	Passo Fundo	Embrapa Trigo	161	Trigo	<i>Triticum vulgare</i> L.	Poaceae	27.IX.2006	<i>T. urticae</i> +	E. Sbrisca
RS	-52,4272	-31,7786	Pelotas	Embrapa Pelotas	193	morango	<i>Fragaria x ananassa</i> Duch.	Rosaceae	10.X.2007	<i>T. urticae</i>	Emerson
RS	-53,8333	-29,6833	Santa Maria	UFSM	185	Partenium	<i>Parthenium</i> sp	Asteraceae	26.IX.2007	<i>T. urticae</i> +	D. Navia
RS	-53,8333	-29,6833	Santa Maria	UFSM	147	Feijão	<i>Phaseolus vulgaris</i> L.	Fabaceae	05.I.2006	<i>T. urticae</i> , <i>T. ludeni</i> , <i>T. desertorum</i>	S. Roggia
RS	-54,9613	-28,4085	São Luiz Gonzaga		207	Capim coqueirinho	<i>Eustachys disticophylla</i> (Lag.) Nees	Poaceae	13.II.2007	<i>Schizotetranychus</i> n. sp. 1 * near <i>fillifolius</i>	D. Navia, P. R. V. S. Pereira
RS	-52,9525	-28,6286	Selbach		143	Soja	<i>Glycine max</i> Merrill	Fabaceae	10.III.2005	<i>T. urticae</i>	S. Roggia
RS	-53,0286	-29,4214	Sobradinho		183	Morango	<i>Fragaria x ananassa</i> Duch.	Rosaceae	27.IX.2007	<i>T. urticae</i>	D. Navia
RS	-54,8250	-29,8836	Victor Greff		150	Soja	<i>Glycine max</i> Merrill	Fabaceae	09.III.2005	<i>T. urticae</i> , <i>T. desertorum</i> , <i>M. planki</i>	S. Roggia
SC	-50,7000	-26,9333	Lebon Regis		58	Feijão	<i>Phaseolus vulgaris</i> L.	Fabaceae	22.II.2006	<i>T. urticae</i>	J. M. Milanez

* - novos taxons; + - novo hospedeiro; # - nova localidade

ANEXO 2. Resultados dos levantamentos de ácaros Tetranychidae realizados no Brasil, no período de 10/2004 à 07/2008, com informações sobre a localidade, planta hospedeira, data, identificação das espécies e coletor.

Localidade					Hospedeiro				Data	Identificação	Coletor
UF	LONG.	LAT.	Município	Descrição do local	Nº	Nome comum	Nome científico	Família			
SP	-47,0760	-22,8665	Campinas	IAC	45	Mandioca	<i>Manihot esculenta</i> Crantz	Euphorbiaceae	10.I.2006	<i>T. urticae</i> , <i>M. tanajoa</i>	R. S. Mendonça
SP	-47,0760	-22,8665	Campinas	IAC	46	Mamão	<i>Carica papaya</i> L.	Caricaceae	10.I.2006	<i>T. mexicanus</i>	R. S. Mendonça
SP	-47,0760	-22,8665	Campinas	IAC	47	Café	<i>Coffea arabica</i> L.	Rubiaceae	10.I.2006	<i>O. ilicis</i>	R. S. Mendonça
SP	-47,0760	-22,8665	Campinas	IAC	48	Mucuna	<i>Mucuna aterrima</i> Holland	Fabaceae	10.I.2006	<i>T. desertorum</i> +, <i>E. banksi</i> +	R. S. Mendonça
SP	-47,0760	-22,8665	Campinas	IAC	49	Limão Taiti	<i>Citrus latifolia</i> Tanaka	Rutaceae	10.I.2006	<i>T. mexicanus</i>	R. S. Mendonça
SP	-47,0985	-22,6567	Holambra		50	Gerbera	<i>Gerbera hybrida</i> Hort.	Asteraceae	11.I.2006	<i>T. urticae</i>	R. S. Mendonça
SP	-47,0985	-22,6567	Holambra		53	Rosa branca	<i>Rosa</i> sp	Rosaceae	11.I.2006	<i>T. urticae</i>	R. S. Mendonça
SP	-50,5560	-20,2636	Jales		205	Uva	<i>Vitis vinifera</i> L.	Vitaceae	18.VIII.2008	<i>T. urticae</i>	M. R. Vieira
SP	-47,3659	-24,2649	Miracatu	Sítio Caturra	55	Limão cravo	<i>Citrus limonia</i> Osbeck	Rutaceae	16.I.2006	<i>T. desertorum</i>	R. S. Mendonça
SP	-47,3659	-24,2649	Miracatu	Sítio Caturra	56	Jiló	<i>Solanum gilo</i> Raddi	Solanaceae	16.I.2006	<i>T. desertorum</i> +, <i>E. banksi</i> +	R. S. Mendonça
SP	-46,9422	-22,3722	Mogi Guaçu		174	Algodão	<i>Gossypium hirsutum</i> L.	Malvaceae	02.VII.2007	<i>T. urticae</i>	M. G. C. Gondim
SP	-46,6833	-22,6819	Monte Alegre do Sul		126	Morango	<i>Fragaria x ananassa</i> Duch.	Rosaceae	24.IV.2006	<i>T. urticae</i>	A. Raga
SP	-47,8843	-24,6096	Pariquera-Açu	IAC	59	Mandioca	<i>Manihot esculenta</i> Crantz	Euphorbiaceae	16.I.2006	<i>M. tanajoa</i>	R. S. Mendonça
SP	-50,7833	-22,8167	Pedrinhas		146	Soja	<i>Glycine max</i> Merrill	Fabaceae	21.II.2005	<i>T. urticae</i> , <i>M. planki</i>	D. S. Gomes
SP	-47,6492	-22,7253	Piracicaba		173	Feijão	<i>Phaseolus vulgaris</i> L.	Fabaceae	02.VII.2007	<i>T. urticae</i>	M. Poletti
SP	-47,6492	-22,7253	Piracicaba	Beira Rio	180	Mamão	<i>Carica papaya</i> L.	Caricaceae	05.VII.2007	<i>T. urticae</i>	D. Navia
SP	-51,3836	-22,1178	Presidente Prudente		127	Mamão	<i>Carica papaya</i> L.	Caricaceae	24.IV.2006	<i>T. urticae</i>	M. Sato
SP	-47,8436	-24,4875	Registro		57	Mamão	<i>Carica papaya</i> L.	Caricaceae	16.I.2006	<i>T. desertorum</i>	R. S. Mendonça

* - novos taxons; + - novo hospedeiro; # - nova localidade

ANEXO 2. Resultados dos levantamentos de ácaros Tetranychidae realizados no Brasil, no período de 10/2004 à 07/2008, com informações sobre a localidade, planta hospedeira, data, identificação das espécies e coletor.

UF	Localidade			Nº	Hospedeiro			Data	Identificação	Coletor	
	LONG.	LAT.	Município		Descrição do local	Nome comum	Nome científico				Família
SP	-46,9977	-22,6165	S. Antônio da Posse		51	Crisântemo	<i>Dendranthema grandiflora</i> (Ramat.) Kitam.	Asteraceae	11.I.2006	<i>T. urticae</i>	R. S. Mendonça
SP	-46,9977	-22,6165	S. Antônio da Posse		52	Crisântemo	<i>D. grandiflora</i> (Ramat.) Kitam.	Asteraceae	11.I.2006	<i>T. urticae</i>	R. S. Mendonça
SP	-49,3794	-20,8197	São J. do R. Preto		165	Dalia	<i>Dahlia</i> sp.	Asteraceae	18.I.2006	<i>T. urticae</i>	R. J. F. Feres
SP	-47,1353	-23,5292	São Roque		54	Algodão	<i>Gossypium barbadense</i> L.	Malvaceae	11.I.2006	<i>T. mexicanus</i>	R. S. Mendonça
SP	-46,7014	-22,6097	Serra Negra		128	Morango	<i>Fragaria x ananassa</i> Duch.	Rosaceae	24.IV.2006	<i>T. urticae</i>	M. Sato
SP	-46,5353	-22,6000	Socorro	Distrito Chaves	142	Morango	<i>Fragaria x ananassa</i> Duch.	Rosaceae	02.X.2006	<i>T. urticae</i>	P.G. Jefferson
SP	-46,7196	-23,5281	SP City Lapa	Pomar doméstico	204	Tomate	<i>Solanum lycopersicum</i> L.	Solanaceae	10.III.2008	<i>T. urticae</i>	R. S. Mendonça
SP	-49,9798	-20,4228	Votuporanga		151	Algodão	<i>Gossypium hirsutum</i> L.	Malvaceae	11.XII.2006	<i>T. urticae</i>	M. R. Vieira
UR	-58,1312	-32,6368	San Javier	Rio negro	195	Cambarade-cheiro	<i>Lantana camara</i> L.	Verbenaceae	06.VI.2007	<i>T. urticae</i> +	D. Navia, E. Castiglione

* - novos taxons; + - novo hospedeiro; # - nova localidade

ANEXO 3. Two new spider mites (Acari: Tetranychidae) from Brazil - a *Monoceronychus* McGregor (Bryobiinae) from fingergrass and an *Oligonychus* Berlese (Tetranychinae) from grape - and a new record for South America *

Renata S. Mendonça¹, Denise Navia², Carlos H. W. Flechtmann³

1. Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Brasília, Dep. Zoologia, UNB, Campus Universitário Darcy Ribeiro, ICC Sul Sala AT-159, Asa Norte, 70910-900, Brasília-DF, Brazil; Université Montpellier II (renatasm@cenargen.embrapa.br)

2. Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Parque Estação Biológica, Norte Final W3, Caixa Postal 02372, 70.770-900 Brasília, DF, Brazil (navia@cenargen.embrapa.br)

3. CNPq researcher, Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” (ESALQ), Universidade de São Paulo, Cx. Postal 09, 13.418-900, Piracicaba, SP, Brazil (chwflech@esalq.usp.br)

* This paper corresponds to part of the thesis of the senior author, submitted to the Animal Biology graduate program of the Institute of Biological Sciences, Department of Zoology within the scope of double doctoral degree program of University of Brasília and University of Montpellier II – program SIBAGHE, Specialty: Evolution, ecology, genetic resources and palaeontology.

Abstract

Two new Tetranychidae (Prostigmata) mites are described from Brazil - *Monoceronychus* n. sp., a bryobiine collected from weeping fingergrass, *Eustachys distichophylla* (Lag.) Nees (Poaceae), in the State of Rio Grande do Sul; and *Oligonychus* n. sp., a tetranychine collected from grape, *Vitis vinifera* L. (Vitaceae), in the State of Minas Gerais. *Monoceronychus* n. sp. is the second species in this genus described from South America. In addition to the description of these new species, the Tetranychinae *Eotetranychus smithi* Pritchard & Baker, 1955 was recorded for the first time for South America.

Key words: phytophagous mites, taxonomy, Tetranychini, Hystrichonychini, *Eustachys distichophylla*, *Vitis vinifera*

Introduction

The Tetranychidae or spider mites comprise a large group of phytophagous mites, including important pests of agricultural crops worldwide. So far, this family includes about 1250 species, distributed in 74 genera; 182 tetranychid species have been recorded in South America and 104 species in Brazil (Migeon and Dorkeld, 2008; Bolland *et al.*, 1998).

The genus *Monoceronychus* McGregor, 1945 (Tetranychidae, Bryobiinae, Hystrichonychini) is represented by 19 species (Migeon and Dorkeld, 2008; Bolland *et al.*, 1998) collected from monocotyledonous plants, mainly on grasses (Poaceae). Most of the species were described from North America, 15 from the United States (Pritchard & Baker, 1955; Krantz, 1962; Tuttle & Baker, 1964; Tuttle & Baker, 1968; Baker & Tuttle, 1972) and two from Mexico (Tuttle *et al.*, 1976); the other species are from Africa (South Africa) (Meyer, 1974) and South America (Brazil). *Monoceronychus bambusicola* Feres & Flechtmann, 1995 was described from *Bambusa* from Brazil and was recently recorded from Japan (Gotho & Shida, 2007). *Monoceronychus linki* Pritchard & Baker, 1955 is the other species found in Brazil (Flechtmann & Baker, 1975) and also found in Paraguay (Aranda & Flechtmann, 1971) and Cuba (Almaguel & Machado, 1984).

The genus *Oligonychus* Berlese, 1886 (Tetranychidae, Tetranychidae, Tetranychini) contains 203 valid species, 52 of which have been recorded from South America and 25 from Brazil. Twelve species of *Oligonychus* were collected from grape worldwide, six from Brazil: *O. anonae* Paschoal, 1970, *O.*

biharensis (Hirst, 1924)., *O. coffeae* (Nietner, 1861), *O. mangiferus* (Rahman & Sapra, 1940), *O. punicae* (Hirst, 1926), *O. yothersi*, (McGregor, 1914) (Migeon and Dorkeld, 2008; Bolland *et al.*, 1998).

The genus *Eotetranychus* Oudemans, 1931, has 185 valid species, 18 of which were recorded from South America and eight from Brazil. Two *Eotetranychus* species were reported from rose in South America, *E. deflexus* (McGregor, 1950) and *E. lewisi* (McGregor, 1943).

In this paper two new spider mites from Brazil are described - a bryobiine in *Monoceronychus* McGregor collected from the weeping fingergrass, *Eustachys distichophylla* (Lagasca y Segura) Nees (Poaceae), in the State of Rio Grande do Sul; and a tetranychine in *Oligonychus* Berlese, collected from grapes, *Vitis vinifera* L. (Vitaceae), in the State of Minas Gerais. The first record of *Eotetranychus smithi* Pritchard & Baker, 1955 to the South America fauna was registered.

Material and Methods

A legal permit for collecting zoological material for scientific purposes was required by the Brazilian Institute for the Environment and Renewable Natural Resources (IBAMA); we were issued permit number 231/2006 CGFAU/IBAMA.

Mites were collected from weeping fingergrass and grape leaves by the washing/sieving extraction method. Specimens were preserved in 70% ethanol and then mounted on microscope slides in Hoyers' medium.

The collection site for the *Monoceronychus* specimens, Itaara, State of Rio Grande do Sul, has a subtropical humid climate, with uniformly distributed precipitation with an annual average of 1,714.2 mm. The annual average temperature is 18°C, the hottest month averages 32.6°C and the coldest month 9.8°C (Malufi, 2000). The host plant, *E. distichophylla*, is a perennial grass described from Argentina and its present distribution is South and North America (Soreng *et al.*, 2000).

The local climate of the collection site of the *Oligonychus* specimens – Pirapora municipality in Northern Minas Gerais State - was classified as tropical humid with a wet season during November to March. The winter season has low precipitation; at least one month has a lowest average total precipitation of 60mm (Tonietto & Carbonneau, 2004; Tonietto *et al.* 2006). The annual average temperature was 23.8°C, the hottest month is 31.7°C and the coldest month 12.2°C. *Oligonychus* mites were collected from grape leaves during the dry season in April 2006 and in August 2008.

Microscopic preparations of specimens were examined under a phase contrast and interference microscope (Leitz Wetzlar and Nikon Eclipse 80i). Micrographs were obtained using a digital system composed by a phase contrast and interference microscope (Nikon Eclipse 80i) connected to a digital camera (Nikon DS-Fil with DS-L2) and to a computer. Images of some taxonomic characters were composed using Helicon Focus Software 4.10 (2007) and Helicon Filter 4.5 (2007). ArcSoft Panorama Maker software v. 4.2.0.59 was used to compose the final images.

Measurements are given in micrometers (μm). Female holotype measurements are followed by the range of paratypes in parentheses.

Setae were measured from the center of the setal base to the tip of the seta; the distances between setae were measured from center to center of their bases.

The holotype and paratypes were deposited on the Mite Reference Collection at the Laboratório de Quarentena Vegetal, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília, DF, Brazil. Paratypes were also deposited in the Mite Collection at Departamento de Entomologia, Fitopatologia e Zoologia Agrícola of the Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, ESALQ, University of São Paulo, Piracicaba, São Paulo, Brazil.

Family **TETRANYCHIDAE** Donnadieu, 1875

Subfamily **BRYOBIINAE** Berlese, 1913

Tribe **HYSTRICHONYCHINI** Pritchard & Baker, 1955

Monoceronychus, McGregor, 1945

***Monoceronychus* n. sp. Mendonça, Navia & Flechtmann**

(Figs 1-22 and 46-55)

Diagnosis. A typical *Monoceronychus* with prodorsal anterior projections covering the gnathosoma entirely; anterior median projection subtriangular and apically rounded with a small median anterior cone-like projection; leg I longer than body; peritreme ending in two – three large chambers; *h1* (fifth pair of dorsocentral) heavily barbed, two and half times longer than *f1*; *sc2* and *c3* marginal about twice as long as other dorsal setae except *h1*.

FEMALE. Measurements (n=6). Body length 510 (463- 541) including rostrum; width 273 (234-273). Color in life yellowish. **Dorsum.** Integument of the propodosomal and opisthosomal shields granulated forming a circular pattern visible only under oil magnification: between these regions, integument transversely striated. **Propodosoma** with three anterior well developed projections, covering the rostrum, palpi and entire gnathosoma; anterior median projection enlarged, subtriangular and apically rounded and with a small cone shaped structure, 73 (68-73) long; lateral anterior projections 52 (49-55) long, each bearing the spatulate and serrate vertical seta (*v2*). The anterior median projection extends beyond the tip of *v2*. **Peritreme** bent, arched inwards, distally ending in two-three chambers. **Gnathosoma.** Rostrum reaching the base of femur I. Stylophore anteriorly rounded, about as long as broad. **Palp tarsus.** Palptarsal thumb bears 6 setiform structures, two simple, 3 subequal eupathidia and one "solenidion" longer than eupathidia.

Setae. Dorsal setae variable in size and shape. Prodorsal setae *v2* and *sc1* lanceolate to spatulate and serrate; *sc2*, *c3*, *h1* marginal and serrate; *sc1*, *c1-2*, *d1-2*, *e1-2*, *f1-2* (dorsocentral and dorsolateral) lanceolate to spatulate and serrate. Prodorsal setae length: *v2* 17 (13-17), *sc1* 21 (21-23), *sc2* 51 (49-52). Distances between prodorsal setal insertions *v2-v2* 47-57, *sc1-sc1* 130-138, *sc2-sc2* 208-234. Hysterosomal setae length: *c1* 18 (17-26), *c2* 21 (21-29), *c3* 34 (31-39), *d1* 16 (16-18), *d2* 16 (16-17), *e1* 10 (10-13), *e2* 17 (16-17), *f1* 34 (34), *f2* 21 (18-21), *h1* 70 (65-73). Distances between hysterosomal setal

insertions: *c1-c1* 57-65, *c2-c2* 161-179, *c3-c3* 213-255, *d1-d1* 57-60, *d2-d2* 151-161, *e1-e1* 31-39, *e2-e2* 117-138, *f1-f1* 68-78, *f2-f2* 91-96, *h1-h1* 29-37.

Legs. Leg I longer than body. Trochanter III with a serrate dorsal seta; femur, genu and tibia II, III, IV of all legs with two types of setae: slender serrate dorsal and filiform. Coxa with only filiform setae. Tibia and tarsus with tactile and sensory setae.

Leg chaetotaxy, from coxa to tarsus (solenidia in parentheses). No alternative setal count was observed.

- I. 2-1-9-2-9(1)-9(1) + 2 duplex (6 proximal and 4 distal to duplex)
- II. 2-0-5-4-4-7(1) + 1 duplex (2 proximal and 6 distal)
- III. 1-1-3-4-4-7
- IV. 1-0-2-2-4-7(1)

MALE. Measurements (n=2): body length 349-374; width 167-195. Smaller than female and less robust. Anterior median projection not covering the gnathosoma, thumblike, apically flat and slightly emarginate, not extending beyond seta *v2* of the lateral projections. The dorsal integument on the median portion of the body granulated in between the slender transverse striae. Caudal three pairs of hysterosomal setae (*f1*, *f2* and *h1*) more lanceolate-serrate than in the female and with smaller variation in length. The two males studied exhibited differences between the length of the opisthosomal setae, however the length ratios between *f1*, *f2* and *h1* remained constant.

Leg chaetotaxy, from coxa to tarsus (solenidia in parentheses). No alternative setal count was observed.

- I. 2-1-9-2-14-11(3) + 2 duplex (10 proximal and 4 distal to duplex)
- II. 2-1-5-4-4-9(1) + 1 duplex (6 proximal and 4 distal)
- V. 1-1-3-4-4-7
- VI. 1-0-2-2-4-7(1)

PROTONYMPH. Measurements (n=10). Smaller than female; dorsal integument on the median portion of the body with stronger striae than in female and completely smooth. The integument around seta pair *e1* showing a particular arched pattern of granulation. Setae *h1* longer than in female, more than five times longer than *f1*.

Leg chaetotaxy, from coxa to tarsus (solenidia in parentheses). There were two observations of alternative setal count.

- I. 2-1-6-2-6-9(1) + 2 duplex
- II. 2-0-3-2-4-7 + 1 duplex
- III. 1-1-2-1-4-7 or 6
- IV. 1-0-2-1-4-7 or 6

TYPE MATERIAL

Holotype female. Brasil, Rio Grande do Sul: Itaara, latitude 29°36'35" South, longitude 53°45'53" West, altitude 425 m; ex *Eustachys distichophylla* (Lagasca y Segura) Nees (Poaceae), weeping fingergrass; 08-ii-2007; D. Navia and P. R. V. S. Pereira.

Paratypes. Five females, two males and 10 protonymphs with same host and data as holotype.

Remarks: The new species is close *M. linki* Pritchard & Baker, 1955 and *M. bambusicola*, Feres & Flechtmann, 1995, in having the prodorsal anterior projections covering the entire gnathosoma. However it differs from these species in the length of leg I that is longer than the body (about as long as the body in *M. linki* and shorter in *M. bambusicola*); peritreme ending in two-three chambers (ending in anostomosed chambers in *M. linki* and in *M. bambusicola*); *h1* setae (fifth pair of dorsocentrals) are long and robust (flagellate in *M. bambusicola*).

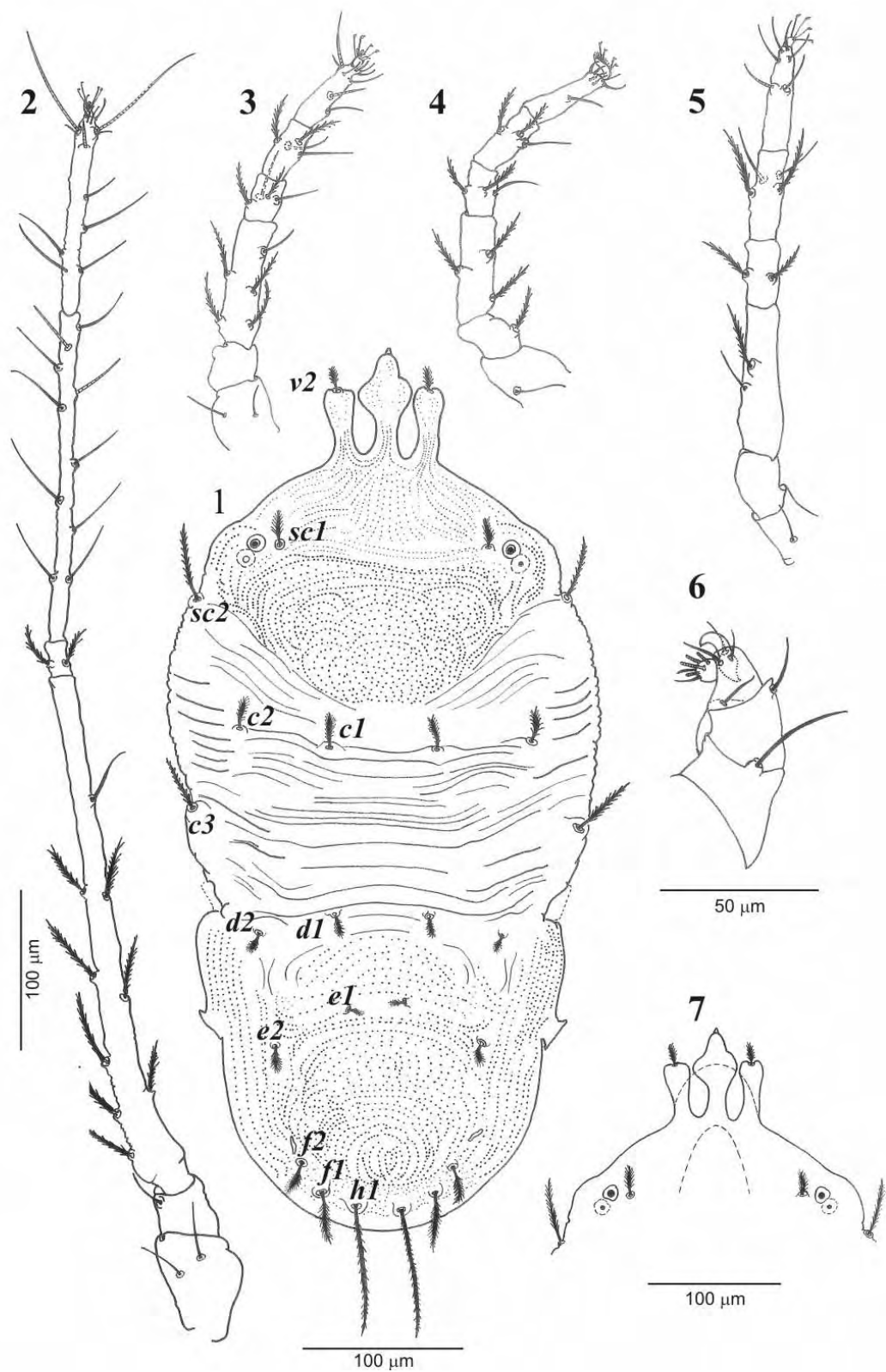


FIGURE 1-7: *Monoceronychus* n. sp. Female. 1. Dorsal view; 2-5. Legs I-IV, (from coxa to tarsus), in this sequence; 6. Palptarsus; 7. Prodorsal anterior projection.

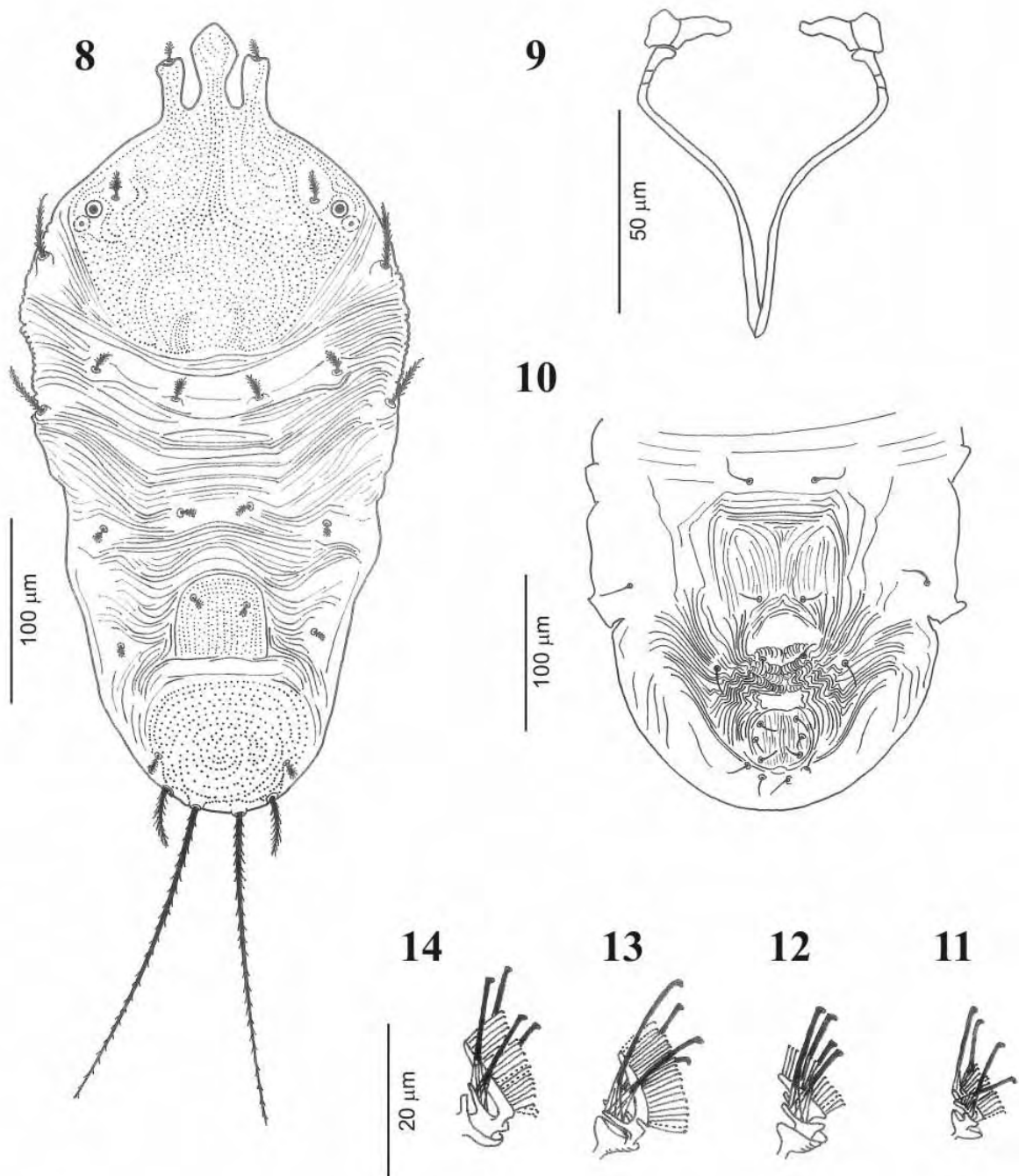


FIGURE 8-14. *Monoceronychus* n.sp. 8. Protonymph. Dorsal view. 9-14. Female. 9. Peritreme. 10. Genitoanal region; 11-14. Tarsal appendages of legs I-IV, in this sequence.

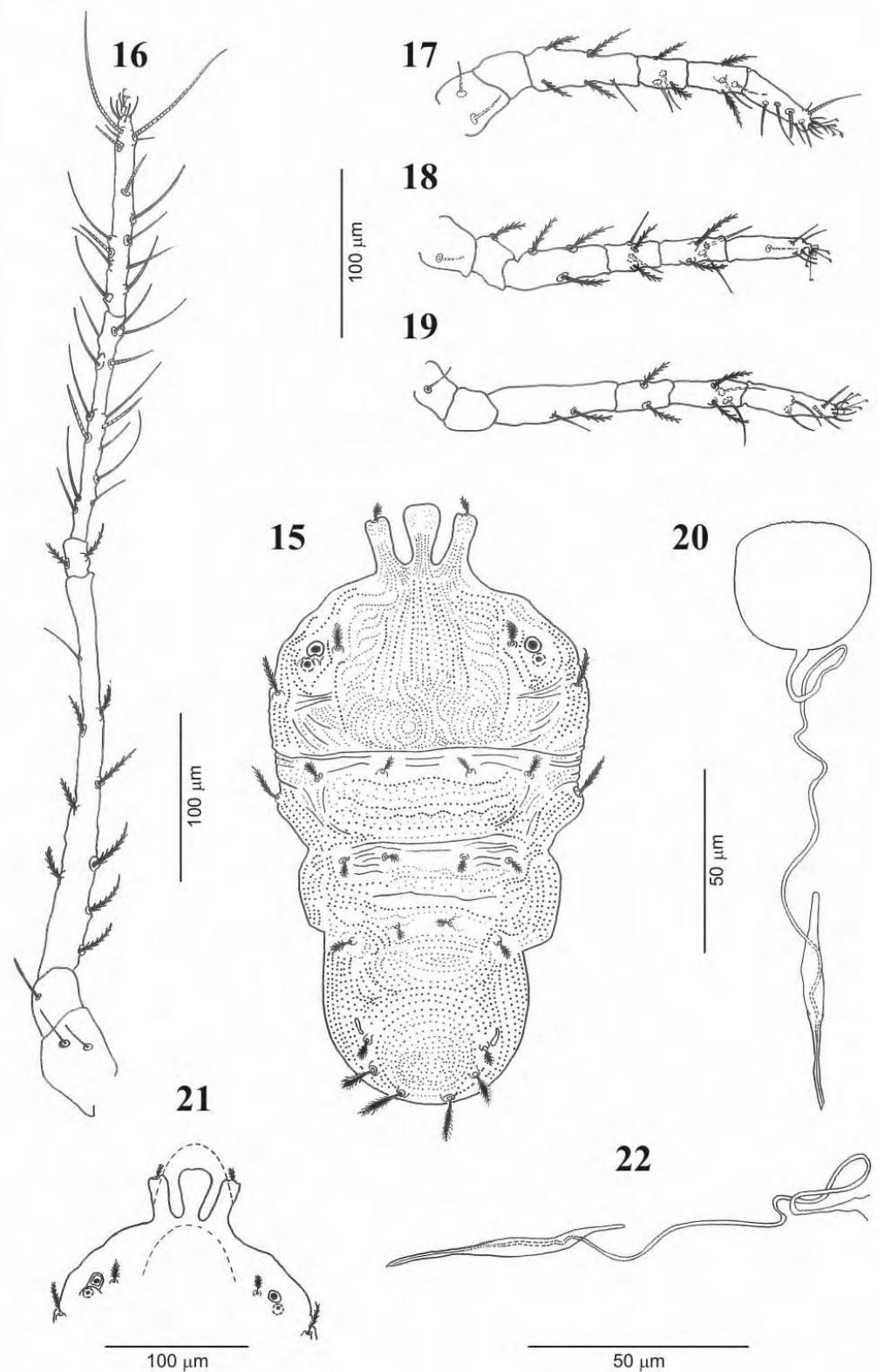


FIGURE 15-22. *Monoceronychus* n. sp. Male. 15. Dorsal view; 16-19. Legs I-IV (from coxa to tarsus), in this sequence; 20. Genital system detail 21. Prodorsal anterior projection; 22. *Aedeagus*.

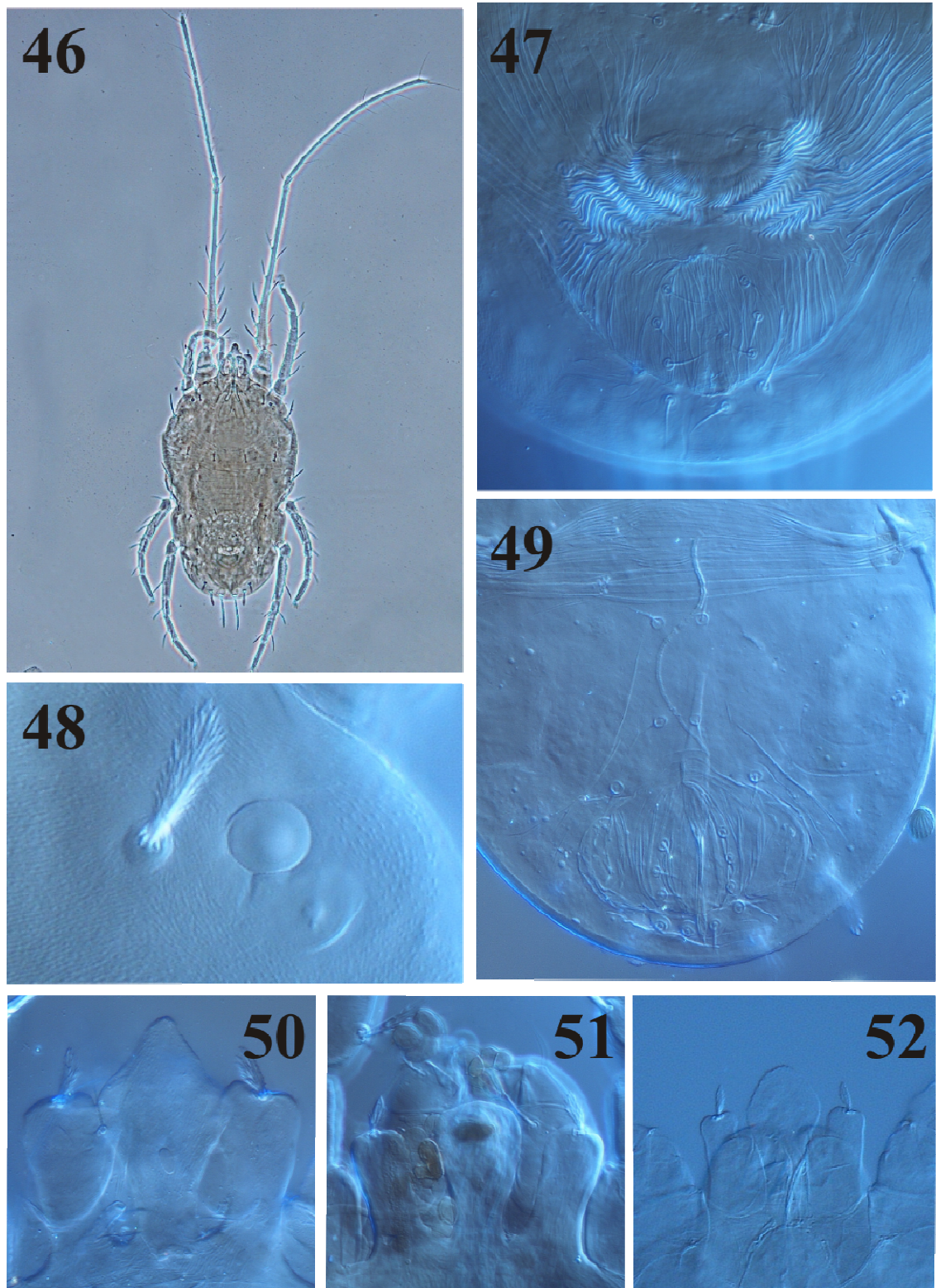


FIGURE 46-52. *Monoceronychus* n. sp. Micrographs. Female. 46. Dorsal view; 47. Genitoanal region; 48. Ocelli. 49. Male. Genitoanal region. 50-52. Prodorsal anterior projection. 50. Female; 51. Male; 52. Protonymph.

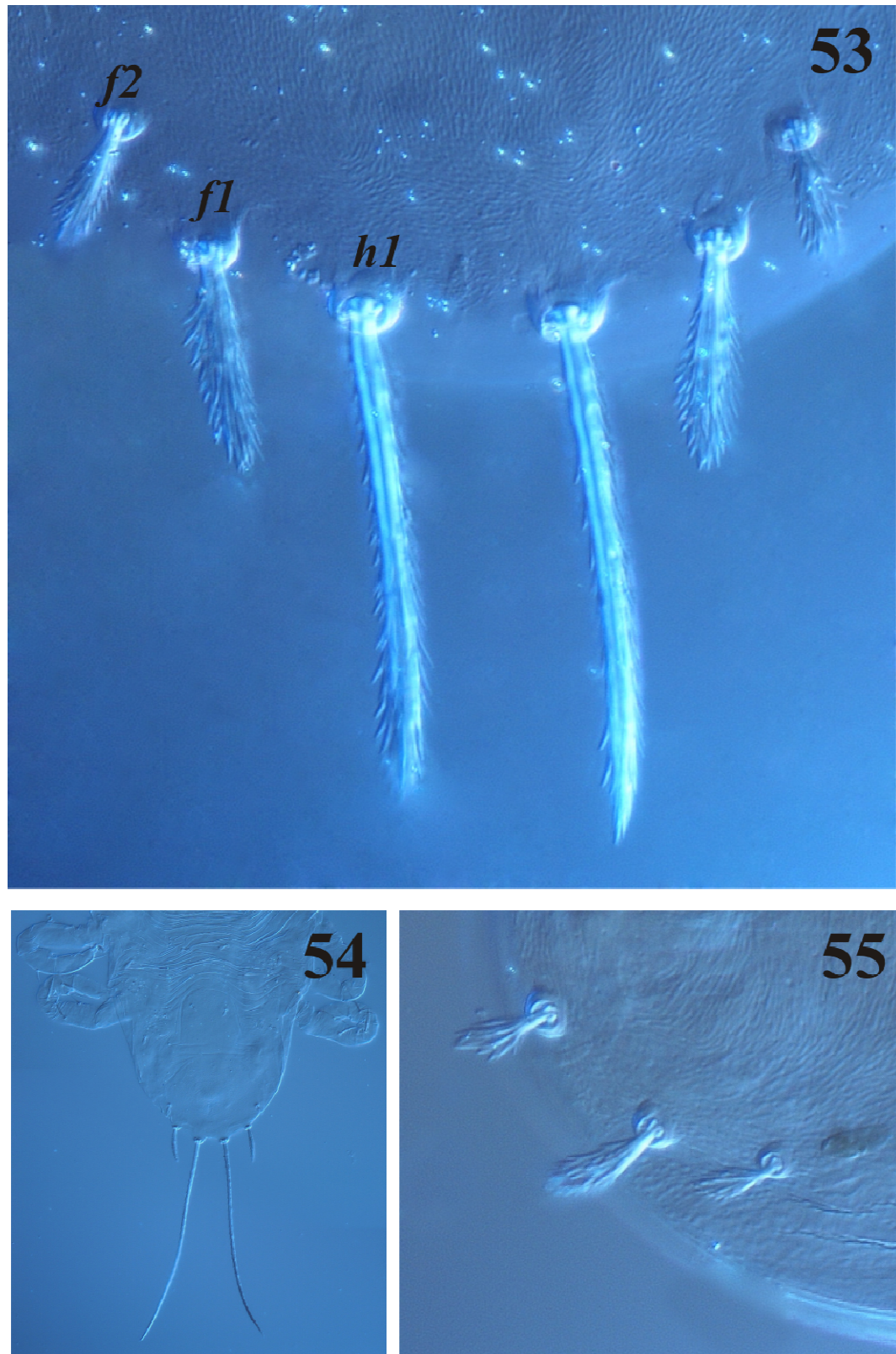


FIGURE 53-55. *Monoceronychus* n. sp. Micrographs. Hysterosomal caudal setae. 53. Female; 54. Protonymph; 55. Male.

Family **TETRANYCHIDAE** Donnadieu, 1975,

Subfamily **TETRANYCHINAE** Berlese, 1913

Tribe **TETRANYCHINI** Reck, 1950

Oligonychus Berlese, 1886

***Oligonychus* n. sp. Mendonça, Navia & Flechtmann**

(Figs 23-45 and 56-61)

Diagnosis. A typical *Oligonychus* with dorsal hysterosomal setae longer than longitudinal distances between bases of consecutive pairs. Tarsus I with three tactile and one sensory setae proximal to duplex; and two tactile setae ventrally beyond the duplex. Tarsus III and IV each with ten tactile and one sensory setae. *Aedeagus* upturned, stem at an angle slightly larger than 90° in relation to axis of shaft. The distal enlargement with the axis at an acute angle to that of shaft, with dorsal margin slightly sinuate and the tip bending down; anterior margin of knob acutely angulate. Tibia I of the male with seven tactile and four sensory setae; tarsus I with 11 tactile and three sensory setae.

FEMALE. Measurements (n=4). Body length 356 (348-377); width 247 (218-247). Color in life carmine red. **Dorsum.** Dorsal striation almost longitudinal on propodosoma and transversal on hysterosoma, except for the area between *f1* and *f2* setae, where the striation pattern becomes slightly transverse and irregular. Lobes of striae rounded, wider than tall and separated at the base. **Peritreme** slender, slightly curved and enlarged distally.

Gnathosoma. Rostrum reaching the distal third of femur I. Stylophore enlarged, rounded anteriorly. **Palp tarsus:** palptarsal thumb bears terminal eupathidium (spinneret) 5 (4-5) long and 5 (4-5) in diameter; two lateral eupathidia 6 (6-7) long each one; solenidia 4 (4) long.

Setae. Dorsal body setae long and variable in size. Setae *sc1*, *c1*, *d1*, *e1*, *f1*, *f2* and *h1* longer than distance between the bases of each member of the pair and all dorsal hysterosomal setae longer than longitudinal distances between bases of consecutive pairs. Prodorsal setae slender and slightly barbed. Prodorsal setal length: *v2* 65 (62-65), *sc1* 99 (91-99), *sc2* 78 (73-78). Distances between prodorsal setal insertions *v2-v2* 73 (65-73), *sc1-sc1* 88 (75-88), *sc2-sc2* 195 (182-195). Hysterosomal setae long, slender and pubescent. Hysterosomal setal length: *c1* 83 (83-86), *c2* 81 (81-86), *c3* 81 (81-83), *d1* 83 (83-86), *d2* 83 (83-91), *e1* 75 (75-81), *e2* 88 (86-94), *f1* 70 (70-73), *f2* 65 (62-70), *h3* 52 (49-52). Distances between hysterosomal setal insertions: *c1-c1* 65 (65-68), *c2-c2* 130 (122-130), *c3-c3* 221 (203-226), *d1-d1* 78 (70-78), *d2-d2* 166 (156-166), *e1-e1* 52 (49-52), *e2-e2* 120 (117-127), *f1-f1* 36 (34-39), *f2-f2* 49 (49-52), *h1-h1* 23 (23-29).

Legs. Tarsi I, II, III and IV with tactile and sensory setae. Tibia I showing tactile and sensory setae; tibia II, III and IV presenting only tactile setae. Tarsus I bears 3 tactile setae and one solenidion proximal to the duplex setae; two tactile setae on venter just beyond the first duplex seta. Empodia with 4 pairs of proximo-ventral hairs.

Leg chaetotaxy, from coxa to tarsus (solenidia in parentheses). No alternative setal count was observed.

- I. 2-1-9-5-7(1)-12(1) + 2 duplex
- II. 2-1-7-5-5-11(1) + 1 duplex
- IV. 1-1-2-3-5-10(1)
- V. 1-1-1-2-5-10(1)

Ventral striation. Ventral striae smooth, without lobes, transversal to *pg* setae except for the longitudinal pattern immediately anterior to the genital flap; flap with transverse striae.

MALE. Measurements (n=4). Smaller than female. Only one male in dorsoventral position, body length 325; width 195, including rostrum. The other three males were in lateral position. **Palptarsus:** terminal eupathidium (spinneret) 5 long and 6 in diameter; two lateral eupathidia 5 long; solenidion 4 long.

Legs. Tarsus I bears three tactile setae and three solenidia well proximal to the duplex setae; a single tactile seta on venter just beyond first duplex. Tarsus II bears 4 tactile setae and one solenidion well proximal to the duplex. Empodia provided with three pairs of proximo-ventral hairs.

Leg chaetotaxy, from coxa to tarsus (solenidia in parentheses). No alternative setal count was observed

- I. 2-1-8-5-7(4)-11(3) + 2 duplex
- II. 2-1-6-5-5-12(1) + 1 duplex
- VI. 1-1-2-2-5-8(1)
- VII. 1-1-1-2-5-8(1)

Aedeagus upturned, stem at an angle slightly larger than 90° in relation to axis of shaft. The distal enlargement with the axis at an acute angle to that of shaft, with dorsal margin slightly sinuate and the tip bending down; anterior margin of knob acutely angulate.

Holotype female. Brasil, Minas Gerais, Pirapora, latitude 17°21' S, longitude 44°56'W, altitude 489m; ex *Vitis vinifera* L., grape; 12. iv. 2006 and 8.viii.2008; D. Navia and R. S. Mendonça.

Paratypes. Three females and four males, same host and collection data as holotype.

Remarks: the closest species to *Oligonychus* n. sp. are *O. anonae* Paschoal, 1970 and *O. poutericola* Feres & Flechtmann, 1986. However the *aedeagus* of the new species presents the dorsal margin slightly sinuate, longer posterior margin and the tip bending down (dorsal margin of the knob straight in *O. anonae*; sharply sinuous and smaller in *O. poutericola*). Tarsus I of the male of *Oligonychus* n. sp. with 11 tactile setae and three sensory setae (eight tactile and six sensory in *O. anonae* and 12 tactile and three sensory in *O. poutericola*). *Oligonychus* n. sp. females have peritreme slender, slightly curved and enlarged distally (straight and ending in bulb in *O. anonae*; and straight and ending in a kidney-shaped opening in *O. poutericola*).

New Record***Eotetranychus smithi* Pritchard & Baker, 1955**

A collection of spider mites by D. Navia and P. Drumond from roses, *Rosa* spp. (Rosaceae), from Rio Branco, Acre, Brazil (9°58'18.49" South and 67°49'5.74" West), yielded female and male specimens of *E. smithi*, which is herein reported for the first time in South America.

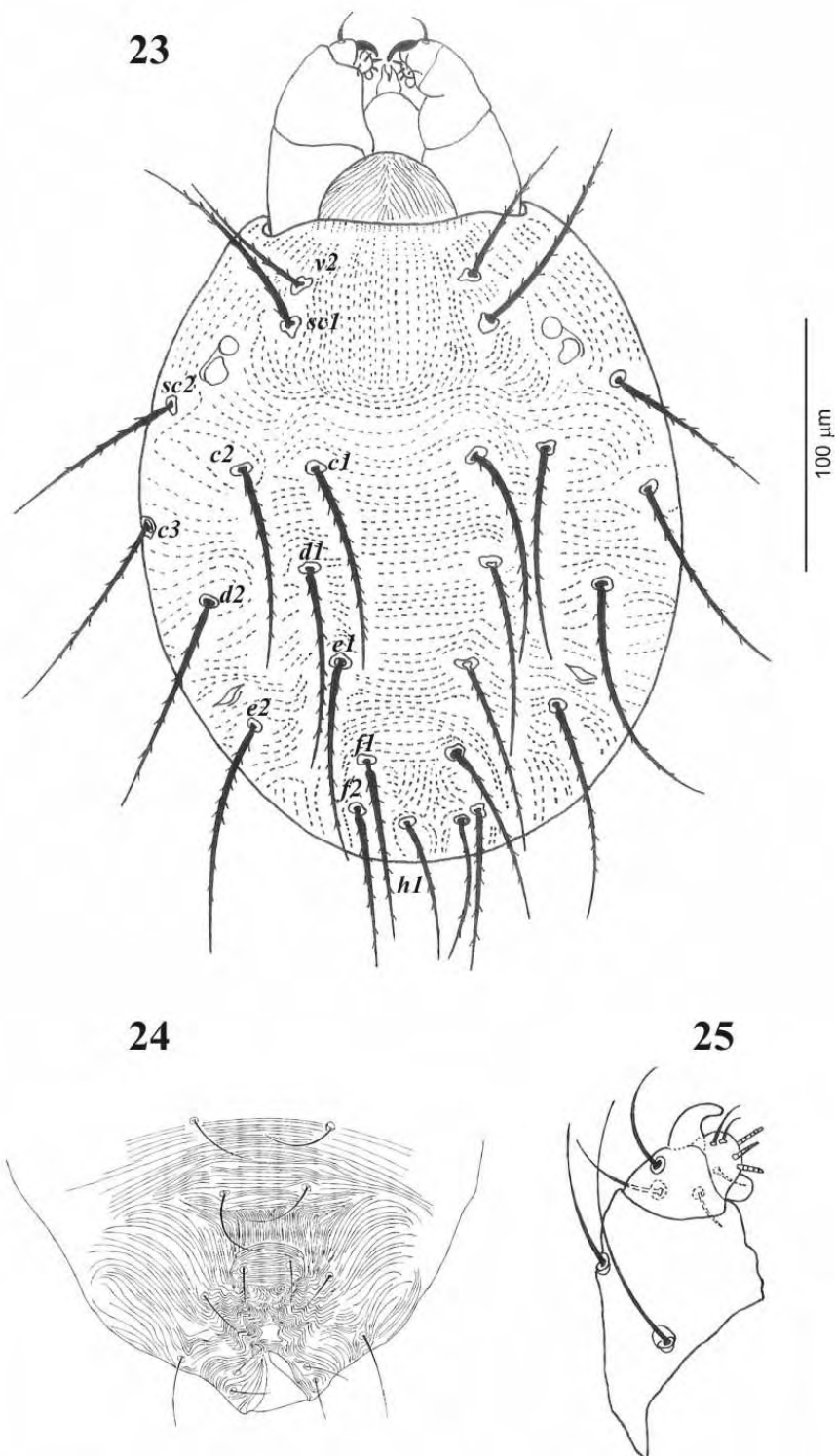


FIGURE 23-25. *Oligonychus* n. sp. Female. 23. Dorsal view; 24. Genitoanal region; 25. Palptarsus.

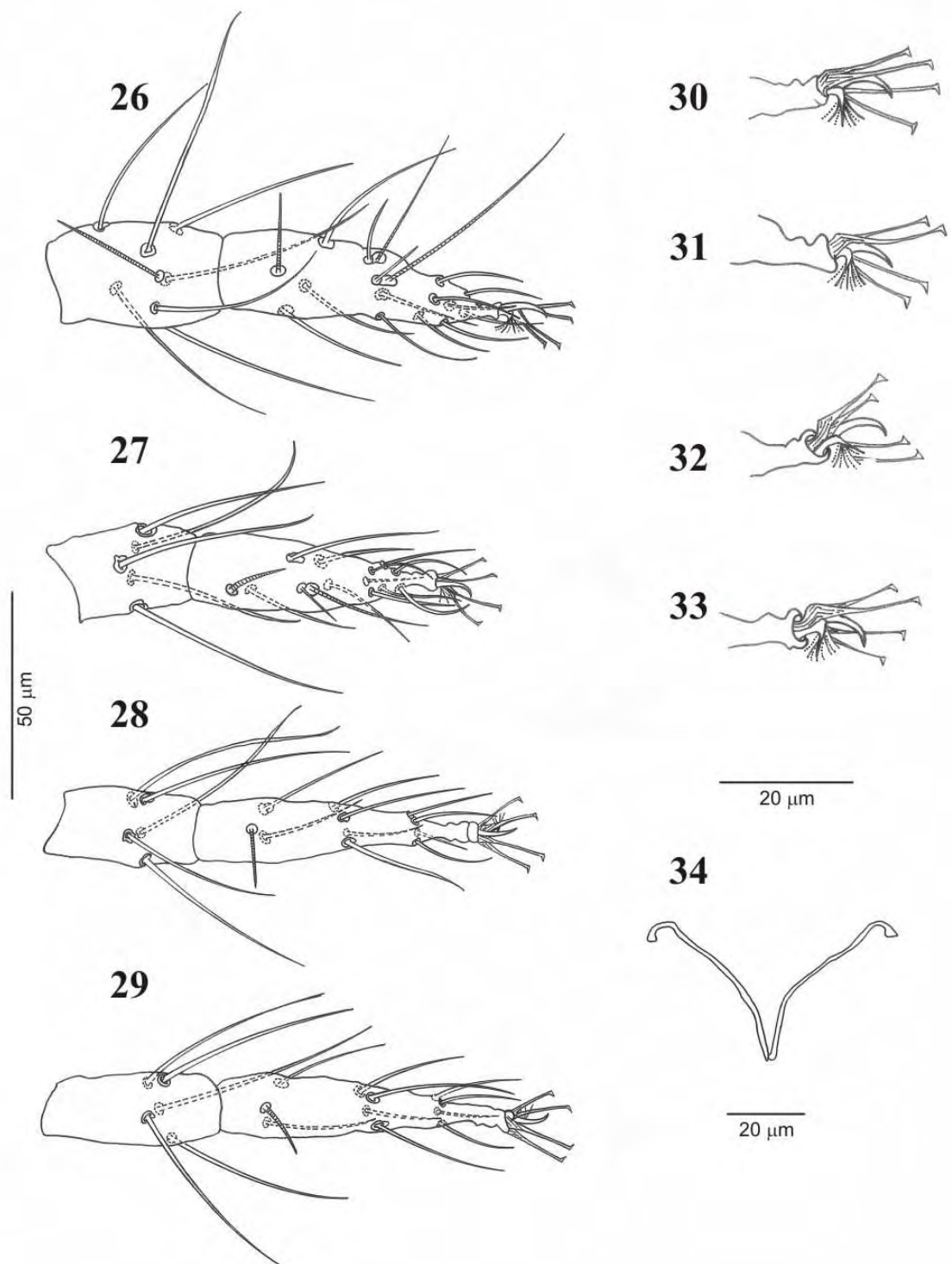


FIGURE 26-34. *Oligonychus* n. sp. Female. 26-29. Tibia and tarsus of legs I-IV, in this sequence; 30-33. Tarsal appendages of legs I-IV, in this sequence.; 34.

Peritreme.

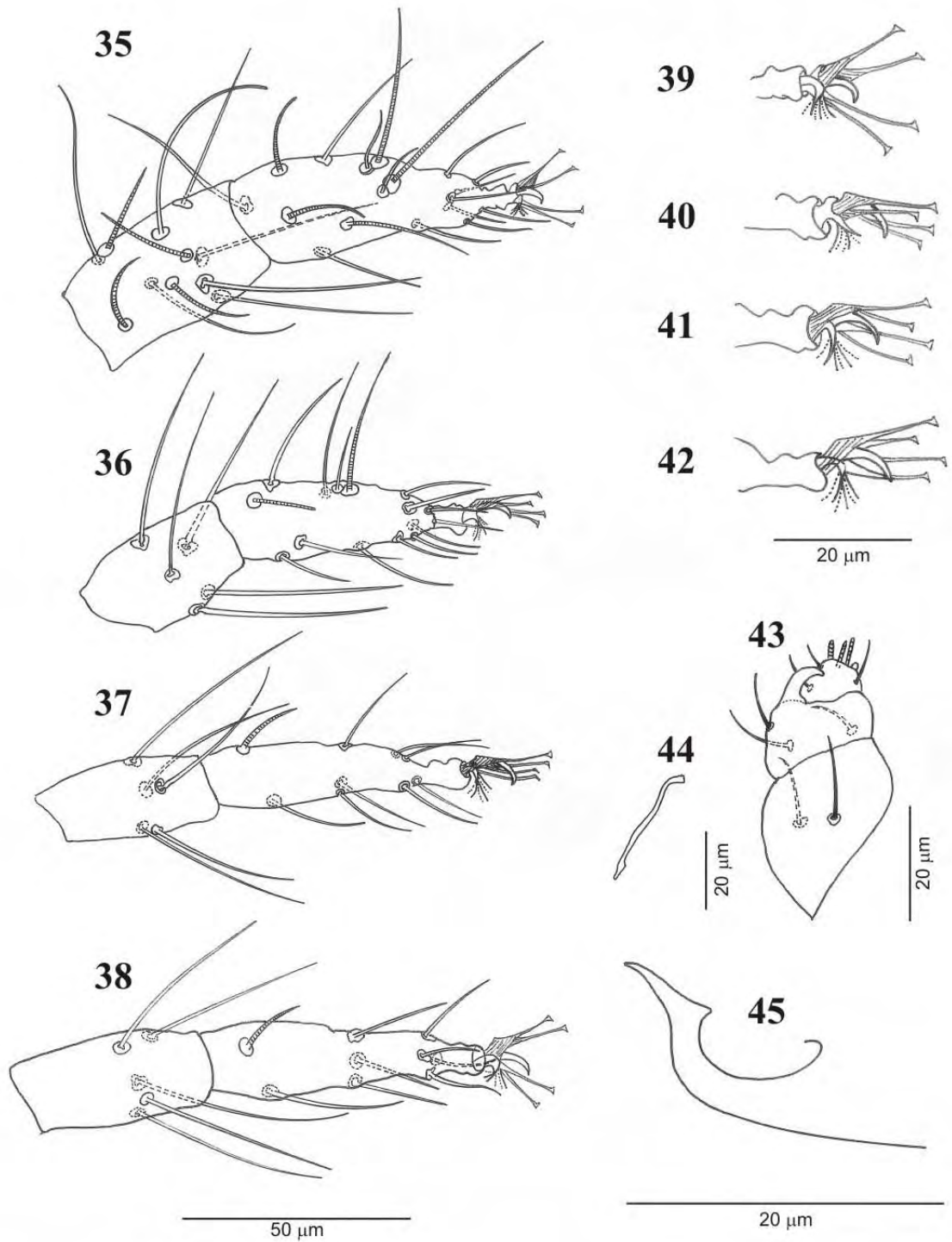


FIGURE 35-45. *Oligonychus* n. sp. Male. 35-38. Tibia and tarsus of legs I-IV, in this sequence; 39-42. Tarsal appendages of legs I-IV, in this sequence; 43. Palptarsus; 44. Peritreme; 45. Aedeagus.



FIGURE 56-58. *Oligonychus* n. sp. Micrographs. Male. 56. Aedeagus. Female. 57. Genitoanal region; 58. Peritreme

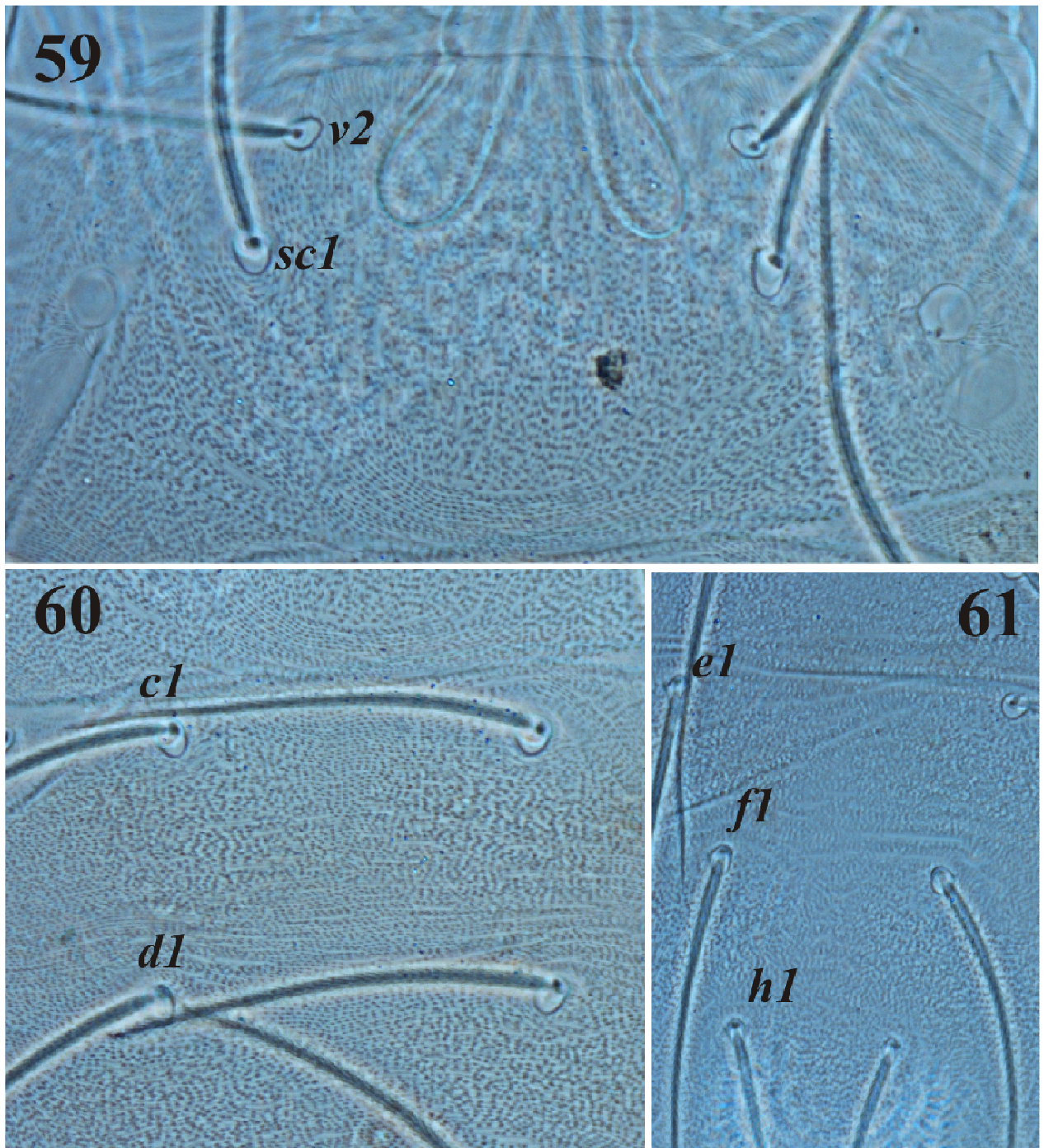


FIGURE 59-61. *Oligonychus* n. sp. Micrographs. Female. Dorsal striation pattern. 59. Propodosoma; 60. Hysterosoma between *c1* and *d1* setae; 61 Hysterosoma between *e1* to *h1*.

Acknowledgements

The authors are grateful to José Francisco Montenegro Valls, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia for the grass identification. To Paulo Roberto V. S. Pereira, Embrapa Trigo and Patrícia Drumond, Embrapa Acre for helping with mite collection. To Francisco José Ferragut, Universidad Politécnica de Valencia, for valorous suggestions on the elaboration of micrographs. This work was partially supported by CAPES, Fundação Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, Brazil. The authors are grateful to CNPq, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, Brazil, for the authors fellowships.

ANEXO 4. Sequências ITS (rDNA) das espécies do grupo *telarius* e de outras espécies de *Tetranychus* de pigmentação avermelhada previamente publicadas e usadas na composição do conjunto de dados. O número do acesso e o respectivo nome da espécie foram copiados do GenBank. Informações sobre a espécie de planta hospedeira e origem geográfica foram extraídas do artigo científico.

Nº do acesso	Espécie	Tamanho (pb)	País e localidade		Planta hospedeira			Referência
					Nome científico	Família	Nome comum	
AB076369	<i>T. urticae</i>	1205	Japão, Honshu, Wakayama	Goboh	<i>Citrullus lanatus</i>	Cucurbitaceae		Osakabe <i>et al.</i> (2002).
AY750700	<i>T. urticae</i>	543	Taiwan		Desconhecido			Yeh, W. B., Hsu, K., Hua, T. & Chang, N. T. Não publicado
X99881	<i>T. urticae</i>	613	Holanda		Desconhecido			Navajas <i>et al.</i> (1998).
DQ656440	<i>T. urticae</i>	474	Israel		<i>Citrullus lanatus</i>	Cucurbitaceae		Ben-David <i>et al.</i> (2007),
DQ656441	<i>T. urticae</i>	474	Israel		<i>Citrullus lanatus</i>	Cucurbitaceae		Ben-David <i>et al.</i> (2007)
DQ656442	<i>T. urticae</i>	474	Israel		<i>Citrullus lanatus</i>	Cucurbitaceae		Ben-David <i>et al.</i> (2007)
DQ680165	<i>T. urticae</i>	645	China, Changli (Palearctic)	Heibei	<i>Malus domestica</i>	Rosaceae	Maçã	Hong, X. Y., Xie, L. & Wang, J. H. Não publicado
DQ680166	<i>T. urticae</i>	645	China (Palearctic) Xingchenghina	Liaoning	<i>Malus domestica</i>	Rosaceae	Maçã	Hong, X. Y., Xie, L. & Wang, J. H. Não publicado
DQ680167	<i>T. urticae</i>	645	China (Palearctic) Taian	Shandong	<i>Malus domestica</i>	Rosaceae	Maçã	Hong, X. Y., Xie, L. & Wang, J. H. Não publicado
DQ680168	<i>T. urticae</i>	645	China (Palearctic) Zhengzhou	Henan	<i>Solanum melongena</i>	Solanaceae	Berinjela	Hong, X. Y., Xie, L. & Wang, J. H. Não publicado
DQ680169	<i>T. urticae</i>	645	China (Oriental) Xuzhou	Jiangsu	<i>Malus domestica</i>	Rosaceae	Maçã	Hong, X. Y., Xie, L. & Wang, J. H. Não publicado
DQ680170	<i>T. urticae</i>	645	China (Palearctic) Lanzhou	Gansu	<i>Prunus persica</i>	Rosaceae	Pêssego	Hong, X. Y., Xie, L. & Wang, J. H. Não publicado
DQ680171	<i>T. urticae</i>	645	China (Palearctic) Xian	Shaanxi	<i>Malus domestica</i>	Rosaceae	Maçã	Hong, X. Y., Xie, L. & Wang, J. H. Não publicado
DQ778064	<i>T. urticae</i>	645	Japão, Honshu Aomori	Kuroishi	Desconhecido			Hong, X. Y., Xie, L. & Wang, J. H. Não publicado
DQ778065	<i>T. urticae</i>	645	China (Oriental) Nanning	Guangxi	<i>Solanum melongena</i>	Solanaceae	Berinjela	Hong, X. Y., Xie, L. & Wang, J. H. Não publicado
DQ778066	<i>T. urticae</i>	645	China (Palearctic) Yinchuan	Ningxia	<i>Zea mays</i>	Poaceae	Milho	Hong, X. Y., Xie, L. & Wang, J. H. Não publicado
DQ778067	<i>T. urticae</i>	645	China (Oriental) Nanhui	Shanghai	<i>Ficus religiosa</i>	Moraceae	Figueira	Hong, X. Y., Xie, L. & Wang, J. H. Não publicado
DQ778068	<i>T. urticae</i>	645	China (Palearctic) Shihezi	Xinjiang	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Fabaceae	Feijão	Hong, X. Y., Xie, L. & Wang, J. H. Não publicado

■ Acessos destacados em cor cinza correspondem as sequências provavelmente geradas de exemplares erroneamente identificados. As sequências foram coletadas no Genbank em março de 2008.

ANEXO 4. Sequências ITS (rDNA) das espécies do grupo *telarius* e de outras espécies de *Tetranychus* de pigmentação avermelhada previamente publicadas e usadas na composição do conjunto de dados. O número do acesso e o respectivo nome da espécie foram copiados do GenBank. Informações sobre a espécie de planta hospedeira e origem geográfica foram extraídas do artigo científico.

Nº do acesso	Espécie	Tamanho (pb)	País e localidade		Planta hospedeira			Referência
					Nome científico	Família	Nome comum	
DQ778069	<i>T. urticae</i>	645	China (Oriental)	Hunan	<i>Glycine max</i>	Fabaceae	Soja	Hong, X. Y., Xie, L. & Wang, J. H. Não publicado
AM408046	<i>T. urticae</i>	481	Espanha	Onda	<i>Citrus reticulata</i>	Rutaceae	Tangerina	Hurtado <i>et al.</i> (2008).
AM408030	<i>T. urticae</i>	1123	Espanha	Castellón	<i>Citrus reticulata</i>	Rutaceae	Tangerina	Hurtado <i>et al.</i> (2008).
AM408031	<i>T. urticae</i>	1220	França	Alenyà	<i>Solanum lycopersicum</i>	Rutaceae	Tomate	Hurtado <i>et al.</i> (2008).
AM408035	<i>T. urticae</i>	1163	EUA	Flórida, Gainesville	<i>Citrus sinensis</i>	Rutaceae	Laranja	Hurtado <i>et al.</i> (2008).
AM408042	<i>T. urticae</i>	484	Espanha	Amposta	<i>Citrus reticulata</i>	Rutaceae	Tangerina	Hurtado <i>et al.</i> (2008).
AM408043	<i>T. urticae</i>	482	Espanha	Betxi	<i>Citrus reticulata</i>	Rutaceae	Tangerina	Hurtado <i>et al.</i> (2008).
AM408044	<i>T. urticae</i>	481	Espanha	Callosa	<i>Citrus reticulata</i>	Rutaceae	Tangerina	Hurtado <i>et al.</i> (2008).
AM408045	<i>T. urticae</i>	484	Espanha	Moncofar	<i>Citrus reticulata</i>	Rutaceae	Tangerina	Hurtado <i>et al.</i> (2008).
AB257736	<i>T. urticae</i>	1162	Japão, Honshu, Ibaraki	Tsukuba	Desconhecido			Osakabe, M., Kotsubo, Y., Tajima, R. & Hinomoto. Não publicado
AB257737	<i>T. urticae</i>	1162	Japão, Honshu, Ibaraki	Tsukuba	Desconhecido			Osakabe, M., Kotsubo, Y., Tajima, R. & Hinomoto. Não publicado
AB257738	<i>T. urticae</i>	1162	Japão, Honshu, Ibaraki	Tsukuba	Desconhecido			Osakabe, M., Kotsubo, Y., Tajima, R. & Hinomoto. Não publicado
DQ512866	<i>T. cinnabarinus</i>	645	China (Oriental)	Nanhui	<i>Gossypium hirsutum</i>	Malvaceae	Algodão	Xie <i>et al.</i> (2008).
DQ517304	<i>T. cinnabarinus</i>	645	China (Oriental)	Chibi	<i>Solanum melongena</i>	Solanaceae	Berinjela	Xie <i>et al.</i> (2008).
DQ523836	<i>T. cinnabarinus</i>	645	China (Oriental)	Shaoguan	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Fabaceae	Feijão	Xie <i>et al.</i> (2008).
DQ523837	<i>T. cinnabarinus</i>	645	China (Oriental)	Nanning	<i>Solanum melongena</i>	Solanaceae	Berinjela	Xie <i>et al.</i> (2008).
DQ523838	<i>T. cinnabarinus</i>	645	Hainan (China)	Danzhou	<i>Manihot esculenta</i>	Euphorbiaceae	Mandioca	Xie <i>et al.</i> (2008).
DQ523839	<i>T. cinnabarinus</i>	645	China (Oriental)	Beibei	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Fabaceae	Feijão	Xie <i>et al.</i> (2008).

■ Acessos destacados em cor cinza correspondem as sequências provavelmente geradas de exemplares erroneamente identificados. As sequências foram coletadas no Genbank em março de 2008.

ANEXO 4. Sequências ITS (rDNA) das espécies do grupo *telarius* e de outras espécies de *Tetranychus* de pigmentação avermelhada previamente publicadas e usadas na composição do conjunto de dados. O número do acesso e o respectivo nome da espécie foram copiados do GenBank. Informações sobre a espécie de planta hospedeira e origem geográfica foram extraídas do artigo científico.

Nº do acesso	Espécie	Tamanho (pb)	País e localidade		Planta hospedeira			Referência
					Nome científico	Família	Nome comum	
DQ515786	<i>T. cinnabarinus</i>	645	China (Palearctic)	Haidan	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Fabaceae	Feijão	Hong, X. Y. & Xie, L. Não publicado
DQ515787	<i>T. cinnabarinus</i>	645	China (Palearctic)	Wei	<i>Gossypium hirsutum</i>	Malvaceae	Algodão	Xie <i>et al.</i> (2008).
DQ515789	<i>T. cinnabarinus</i>	645	China (Palearctic)	Huhhot	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Fabaceae	Feijão	Hong, X. Y. & Xie, L. Não publicado
DQ515791	<i>T. cinnabarinus</i>	645	China (Palearctic)	Changchun	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Fabaceae	Feijão	Hong, X.Y. & Xie, L. Não publicado
DQ512867	<i>T. cinnabarinus</i>	645	China (Oriental)	Nantong	Desconhecido			Xie <i>et al.</i> (2008).
DQ512869	<i>T. cinnabarinus</i>	645	China (Oriental)	Anqing	<i>Gossypium hirsutum</i>	Malvaceae	Algodão	Xie <i>et al.</i> (2008).
DQ517300	<i>T. cinnabarinus</i>	645	China (Oriental)	Fuzhou	Desconhecido			Hong, X. Y & Xie L. Não publicado
DQ517301	<i>T. cinnabarinus</i>	645	Taiwan	Gaoxiong	<i>Solanum melongena</i>	Solanaceae	Berinjela	Hong, X. Y, Xie T. & Feng, L. M. Não publicado
DQ517302	<i>T. cinnabarinus</i>	645	China (Palearctic)	Binzhou	<i>Solanum melongena</i>	Solanaceae	Berinjela	Xie <i>et al.</i> (2008).
DQ517303	<i>T. cinnabarinus</i>	645	China (Palearctic)	Xinye	Desconhecido			Xie <i>et al.</i> (2008).
DQ523843	<i>T. cinnabarinus</i>	645	China (Palearctic)	Yinchuan	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Fabaceae	Feijão	Hong, X. Y., Xie, L. & He, D. H. Não publicado
DQ523844	<i>T. cinnabarinus</i>	645	China (Palearctic)	Xining	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Fabaceae	Feijão	Hong, X. Y. & Xie, L. Não publicado
DQ515790	<i>T. cinnabarinus</i>	645	China (Palearctic)	Shenyang	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Fabaceae	Feijão	Hong, X. Y. & Xie, L. Não publicado
DQ515788	<i>T. cinnabarinus</i>	647	China (Palearctic)	Yuncheng	<i>Gossypium hirsutum</i>	Malvaceae	Algodão	Xie <i>et al.</i> (2008).
DQ515792	<i>T. cinnabarinus</i>	647	China (Palearctic)	Jiamusi	<i>Solanum melongena</i>	Solanaceae	Berinjela	Xie <i>et al.</i> (2008).
DQ512868	<i>T. cinnabarinus</i>	645	China (Oriental)	Cixi	<i>Gossypium hirsutum</i>	Malvaceae	Algodão	Xie <i>et al.</i> (2008).
DQ512870	<i>T. cinnabarinus</i>	645	China (Oriental)	Pengze	<i>Gossypium hirsutum</i>	Malvaceae	Algodão	Xie <i>et al.</i> (2008).
DQ523841	<i>T. cinnabarinus</i>	645	China (Palearctic)	Zhouzhi	Desconhecido			Xie <i>et al.</i> (2008).

■ Acessos destacados em cor cinza correspondem as sequências provavelmente geradas de exemplares erroneamente identificados. As sequências foram coletadas no Genbank em março de 2008.

ANEXO 4. Sequências ITS (rDNA) das espécies do grupo *telarius* e de outras espécies de *Tetranychus* de pigmentação avermelhada previamente publicadas e usadas na composição do conjunto de dados. O número do acesso e o respectivo nome da espécie foram copiados do GenBank. Informações sobre a espécie de planta hospedeira e origem geográfica foram extraídas do artigo científico.

Nº do acesso	Espécie	Tamanho (pb)	País e localidade		Planta hospedeira			Referência
					Nome científico	Família	Nome comum	
DQ523842	<i>T. cinnabarinus</i>	645	China (Palearctic)	Lanzhou Gansu	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Fabaceae	Feijão	Xie <i>et al.</i> (2008).
DQ517305	<i>T. cinnabarinus</i>	645	China (Oriental)	Chibi Hubei	<i>Solanum melongena</i>	Solanaceae	Berinjela	Xie <i>et al.</i> (2008).
DQ523840	<i>T. cinnabarinus</i>	645	China (Oriental)	Lezhi Sichuan	Desconhecido			Xie <i>et al.</i> (2008).
AY750702	<i>T. truncatus</i>	543	Taiwan		Desconhecido			Yeh, W. B., Hsu, K., Hua, T. & Chang, N. T. Não publicado
AB257729	<i>T. truncatus</i>	1163	Japão, Honshu	Kyoto	<i>Boehmeria nivea</i>	Urticaceae	Rami	Osakabe, M., Kotsubo, Y., Tajima, R. & Hinomoto, N. Não publicado.
AB257730	<i>T. truncatus</i>	1164	Japão, Honshu	Kyoto	<i>Boehmeria nivea</i>	Urticaceae	Rami	Osakabe, M., Kotsubo, Y., Tajima, R. & Hinomoto, N. Não publicado.
EU007689	<i>T. kanzawai</i>	605	China		Desconhecido			Chang, S. C. & Ho, C.C. Não publicado
AY750701	<i>T. kanzawai</i>	543	Taiwan		Desconhecido			Hsu, K., Hua, T., Chang, N. T. M. & Yeh, W. B. Não publicado
AB076370	<i>T. kanzawai</i>	1203	Japão, Honshu,	Kanaya Shizuoka	<i>Camellia sinensis</i>	Theaceae	Chá verde	Osakabe <i>et al.</i> (2002).
X99876	<i>T. kanzawai</i>	535	Congo	Brazaville	<i>Manihot esculenta</i>	Euphorbiaceae	Mandioca	Navajas <i>et al.</i> (1998).
AJ295611	<i>T. turkestanii</i>	528	França	Montpellier	<i>Convolvulus arvensis</i>	Convolvulaceae	Corriola	Navajas & Boursot (2003).
DQ656467	<i>T. turkestanii</i>	474	Israel		<i>Malus sylvestris</i>	Rosaceae	Maçã	Ben-David <i>et al.</i> (2007).
DQ656468	<i>T. turkestanii</i>	474	Israel		<i>Prunus persicae</i>	Rosaceae	Pêssego	Ben-David <i>et al.</i> (2007).
AM408032	<i>T. turkestanii</i>	1223	França	Codognan	<i>Solanum melongena</i>	Solanaceae	Berinjela	Hurtado <i>et al.</i> (2008).
AM408041	<i>T. turkestanii</i>	483	Espanha	Castellón	<i>Convolvulus arvensis</i>	Convolvulaceae	Corriola	Hurtado <i>et al.</i> (2008).
França	<i>T. turkestanii</i>	1154	França	Codognan	<i>Solanum melongena</i>	Solanaceae	Berinjela	Navajas, M. & Migeon, A. Não publicado
AB076372	<i>T. pueraricola</i>	1208	Japão, Honshu,	Hitachiohta Ibaraki	<i>Pueraria lobata</i>	Fabaceae	Kudzu	Osakabe <i>et al.</i> (2002).
Y13609	<i>T. pueraricola</i>	483	Japão, Ibaraki	Itachi-Otha	<i>Pueraria lobata</i>	Fabaceae	Kudzu	Gotoh <i>et al.</i> (1998).

■ Acessos destacados em cor cinza correspondem as sequências provavelmente geradas de exemplares erroneamente identificados. As sequências foram coletadas no Genbank em março de 2008.

ANEXO 4. Sequências ITS (rDNA) das espécies do grupo *telarius* e de outras espécies de *Tetranychus* de pigmentação avermelhada previamente publicadas e usadas na composição do conjunto de dados. O número do acesso e o respectivo nome da espécie foram copiados do GenBank. Informações sobre a espécie de planta hospedeira e origem geográfica foram extraídas do artigo científico.

Nº do acesso	Espécie	Tamanho (pb)	País e localidade		Planta hospedeira			Referência
					Nome científico	Família	Nome comum	
AB076371	<i>T. ludeni</i>	1197	Japão, Honshu	Kishigawa	<i>Solanum melongena</i>	Solanaceae	Berinjela	Osakabe <i>et al.</i> (2002).
DQ656451	<i>T. ludeni</i>	479	Israel		<i>Lavatera sp.</i>	Malvaceae	Malvaíscos	Ben-David <i>et al.</i> (2007).
DQ656452	<i>T. ludeni</i>	479	Israel		<i>Lavatera sp.</i>	Malvaceae	Malvaíscos	Ben-David <i>et al.</i> (2007).
DQ656453	<i>T. ludeni</i>	1163	França	Codognan Mas Faget	<i>Solanum melongena</i>	Solanaceae	Berinjela	Hurtado <i>et al.</i> (2008).
AM408040	<i>T. ludeni</i>	488	Espanha	Castellón	<i>Parietaria judaica</i>	Urticaceae	Fava-da-cova	Hurtado <i>et al.</i> (2008).
AJ419833	<i>T. evansi</i>	542	Kenia	Nairobi	<i>Lycopersicon esculentum</i>	Solanaceae	Tomate	Knapp <i>et al.</i> (2003).
DQ656448	<i>T. evansi</i>	490	Israel		<i>Solanum nigrum</i>	Solanaceae	Erva Moura	Ben-David <i>et al.</i> (2007).
AB257746	<i>T. evansi</i>	1162	Japão, Honshu	Kyoto	Desconhecido			Osakabe, M., Kotsubo, Y., Tajima, R. & Hinomoto, N. Não publicado
AB257747	<i>T. evansi</i>	1162	Japão, Honshu	Kyoto	Desconhecido			Osakabe, M., Kotsubo, Y., Tajima, R. & Hinomoto, N. Não publicado.
AM408047	<i>T. evansi</i>	498	Portugal	Madeira	<i>Solanum nigrum</i>	Solanaceae	Erva Moura	Hurtado <i>et al.</i> (2008).
AM408033	<i>T. evansi</i>	1280	Espanha	Castellón	<i>Solanum nigrum</i>	Solanaceae	Erva Moura	Hurtado <i>et al.</i> (2008).
EU003876	<i>T. evansi</i>	541	Grécia	Tympac	<i>Solanum nigrum</i>	Solanaceae	Erva Moura	Tsagkarakou <i>et al.</i> (2007).
EU003876	<i>T. evansi</i>	543	Grécia	Tympac	<i>Solanum nigrum</i>	Solanaceae	Erva Moura	Tsagkarakou <i>et al.</i> (2007).
AB257733	<i>T. phaselus</i>	1171	Japão, Honshu,	Ushiku	Desconhecido			Osakabe, M., Kotsubo, Y., Tajima, R. & Hinomoto, N. Não publicado.
AB257734	<i>T. phaselus</i>	1171	Japão, Honshu,	Ushiku	Desconhecido			Osakabe, M., Kotsubo, Y., Tajima, R. & Hinomoto, N. Não publicado.
AB257735	<i>T. phaselus</i>	1171	Japão, Honshu,	Ushiku	Desconhecido			Osakabe, M., Kotsubo, Y., Tajima, R. & Hinomoto, N. Não publicado.
AB257748	<i>T. piercei</i>	1178	Japão, Honshu	Tsukuba	Desconhecido			Osakabe, M., Kotsubo, Y., Tajima, R. & Hinomoto, N. Não publicado.
AY750703	<i>T. piercei</i>	548	Taiwan		Desconhecido			Hsu, K., Hua, T., Chang, N. T. and Yeh, W. B. Não publicado.

■ Acessos destacados em cor cinza correspondem as sequências provavelmente geradas de exemplares erroneamente identificados. As sequências foram coletadas no Genbank em março de 2008.

ANEXO 4. Sequências ITS (rDNA) das espécies do grupo *telarius* e de outras espécies de *Tetranychus* de pigmentação avermelhada previamente publicadas e usadas na composição do conjunto de dados. O número do acesso e o respectivo nome da espécie foram copiados do GenBank. Informações sobre a espécie de planta hospedeira e origem geográfica foram extraídas do artigo científico.

Nº do acesso	Espécie	Tamanho (pb)	País e localidade		Planta hospedeira			Referência
					Nome científico	Família	Nome comum	
X99878	<i>T. neocaledonicus</i>	534	Benin	Cotonou	<i>Vigna unguiculata</i>	Fabaceae	Feijão fradinho	Navajas <i>et al.</i> (1998).
AB257728	<i>T. ezoensis</i>	1161	Japão, Honshu, Iwate	Morioka	Desconhecido			Osakabe, M., Kotsubo, Y., Tajima, R. & Hinomoto, N. Não publicado.
AB257745	<i>T. parakanzawai</i>	1161	Japão, Honshu, Ibaraki	Ami Ibaraki University	Desconhecido			Osakabe, M., Kotsubo, Y., Tajima, R. & Hinomoto, N. Não publicado.
AB257739	<i>T. okinawanus</i>	1380	Japão, Nansei-Shoto, Okinawa	Motobu	Desconhecido			Osakabe, M., Kotsubo, Y., Tajima, R. & Hinomoto, N. Não publicado.
AB257740	<i>T. okinawanus</i>	1384	Japão, Nansei-Shoto, Okinawa	Motobu	Desconhecido			Osakabe, M., Kotsubo, Y., Tajima, R. & Hinomoto, N. Não publicado.
AB257741	<i>T. okinawanus</i>	1378	Japão, Nansei-Shoto Okinawa	Itoman	Desconhecido			Osakabe, M., Kotsubo, Y., Tajima, R. & Hinomoto, N. Não publicado.
AB257742	<i>T. okinawanus</i>	1382	Japão, Nansei-Shoto Okinawa	Itoman	Desconhecido			Osakabe, M., Kotsubo, Y., Tajima, R. & Hinomoto, N. Não publicado.
AB257743	<i>T. okinawanus</i>	1384	Japão, Nansei-Shoto Okinawa	Naha	Desconhecido			Osakabe, M., Kotsubo, Y., Tajima, R. & Hinomoto, N. Não publicado.
AB257744	<i>T. okinawanus</i>	1382	Japão, Nansei-Shoto Okinawa	Naha	Desconhecido			Osakabe, M., Kotsubo, Y., Tajima, R. & Hinomoto, N. Não publicado.

■ Acessos destacados em cor cinza correspondem as sequências provavelmente geradas de exemplares erroneamente identificados. As sequências foram coletadas no Genbank em março de 2008.

ANEXO 5. Sequências *COI* (*mtDNA*) das espécies do grupo *telarius* e de outras espécies de *Tetranychus* de pigmentação avermelhada previamente publicadas e usadas na composição do conjunto de dados. O número do acesso e o respectivo nome da espécie foram copiados do GenBank. Informações sobre a espécie de planta hospedeira e origem geográfica foram extraídas do artigo científico.

Nº do acesso	Espécie	Tamanho (pb)	País e localidade		Planta hospedeira			Referência
					Nome científico	Família	Nome comum	
TurtCod	<i>T. urticae</i>	929	França	Codgnan Mas Faget	<i>Solanum melongena</i>	Solanaceae	Berinjela	Sequence Database GBGP, Inra., Montpellier
X80855	<i>T. urticae</i>	394	França, Montpellier	Montpellier	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Fabaceae	Feijão	Navajas <i>et al.</i> (1996).
X74571	<i>T. urticae</i>	564	Holanda		<i>Sambucus</i> sp	Caprifoliaceae	Sabugueiro	Fournier <i>et al.</i> (1994).
AB041257	<i>T. urticae</i>	644	Japão, Honshu	Tohoku	Desconhecido			Toda <i>et al.</i> (2000).
AB066449	<i>T. urticae</i>	396	Japão, Hokkaido	Sapporo	<i>Trifolium repens</i>	Fabaceae	Trevo branco	Hinomoto <i>et al.</i> (2001)
AB066450	<i>T. urticae</i>	396	Japão, Hokkaido	Naganuma	Glicine max	Fabaceae	Soja	Hinomoto <i>et al.</i> (2001)
AB066451	<i>T. urticae</i>	396	Japão, Hokkaido Hokkaido	Kimobetsu	<i>Trifolium repens</i>	Fabaceae	Trevo branco	Hinomoto <i>et al.</i> (2001)
AB066452	<i>T. urticae</i>	396	Japão, Hokkaido Hokkaido	Assabu	<i>Althaea rosea</i>	Malvaceae	Malva	Hinomoto <i>et al.</i> (2001)
AB066453	<i>T. urticae</i>	396	Japão, Honshu Ibaraki	Tsukuba	<i>Fragaria chiloensis (=ananassa)</i>	Rosacea	Morango	Hinomoto <i>et al.</i> (2001)
AB066454	<i>T. urticae</i>	396	Japão, Honshu Nara	Shinjo	<i>Chrysanthemum morifolium</i>	Asteraceae	Crisântemo	Hinomoto <i>et al.</i> (2001)
AB066455	<i>T. urticae</i>	396	Japão, Honshu Nara	Shimoichi	<i>Rosa hybrida</i>	Rosaceae	Rosa	Hinomoto <i>et al.</i> (2001)
AB066456	<i>T. urticae</i>	396	Japão, Nansei-Shoto, Okinawa	Itoman	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Fabaceae	Feijão	Hinomoto <i>et al.</i> (2001)
AB066457	<i>T. urticae</i>	396	Japão, Nansei-Shoto Okinawa	Hirara	<i>Capsicum annuum</i>	Solanaceae	Pimentão	Hinomoto <i>et al.</i> (2001)
AB066458	<i>T. urticae</i>	396	Itália, Toscana	Firenze	<i>Convolvulus arvensis</i>	Convolvulaceae	Corriola	Hinomoto <i>et al.</i> (2001)
AB066459	<i>T. urticae</i>	396	Brasil, Santa Catarina	Caçador	<i>Fragaria chiloensis (=x ananassa)</i>	Rosaceae	Morango	Hinomoto <i>et al.</i> (2001)
AB066460	<i>T. urticae</i>	396	Tailândia	Chiangmai	<i>Rosa hybrida</i>	Rosaceae	Rosa	Hinomoto <i>et al.</i> (2001)
AB066461	<i>T. urticae</i>	396	Taiwan	Miaoli	<i>Fragaria chiloensis (= ananassa)</i>	Rosaceae	Morango	Hinomoto <i>et al.</i> (2001)

■ Acessos destacados em cor cinza correspondem as sequências provavelmente geradas de exemplares erroneamente identificados. As sequências foram coletadas no Genbank em março de 2008

ANEXO 5. Sequências *COI* (*mtDNA*) das espécies do grupo *telarius* e de outras espécies de *Tetranychus* de pigmentação avermelhada previamente publicadas e usadas na composição do conjunto de dados. O número do acesso e o respectivo nome da espécie foram copiados do GenBank. Informações sobre a espécie de planta hospedeira e origem geográfica foram extraídas do artigo científico.

Nº do acesso	Espécie	Tamanho (pb)	País e localidade		Planta hospedeira			Referência
					Nome científico	Família	Nome comum	
AB066462	<i>T. urticae</i>	396	Japão, Honshu, Ibaraki	Tomobe	<i>Dianthus caryophyllus</i>	Caryophyllaceae	Cravo	Hinomoto <i>et al.</i> (2001)
AB066463	<i>T. urticae</i>	396	Japão, Honshu, Ibaraki	Tsukuba	<i>Fragaria chiloensis</i> (=x <i>ananassa</i>)	Rosaceae	Morango	Hinomoto <i>et al.</i> (2001)
AB066464	<i>T. urticae</i>	396	Japão, Honshu, Ibaraki	Tsuchiura	<i>Viola x wittrockina</i>	Violaceae	Amor perfeito	Hinomoto <i>et al.</i> (2001)
AB066465	<i>T. urticae</i>	396	Japão, Honshu, Chiba	Inzai	<i>Dianthus caryophyllus</i>	Caryophyllaceae	Cravo	Hinomoto <i>et al.</i> (2001)
AB066466	<i>T. urticae</i>	396	Japão, Honshu, Wakayama	Goboh	<i>Gypsophila paniculata</i>	Caryophyllaceae	Mosquitinho	Hinomoto <i>et al.</i> (2001)
AB066467	<i>T. urticae</i>	396	Japão, Honshu, Wakayama	Goboh	<i>Eustoma russellianum</i>	Gentianaceae	Lisianto	Hinomoto <i>et al.</i> (2001)
AB066468	<i>T. urticae</i>	396	Japão, Shikoku, Kochi	Nankoku	<i>Dianthus caryophyllus</i>	Caryophyllaceae	Cravo	Hinomoto <i>et al.</i> (2001)
AB066469	<i>T. urticae</i>	396	Itália, Toscana	Firenze	<i>Convolvulus arvensis</i>	Convolvulaceae	Corriola	Hinomoto <i>et al.</i> (2001)
AB079044	<i>T. urticae</i>	375	Japão, Honshu, Ibaraki	Tsukuba	<i>Fragaria chiloensis</i> (=x <i>ananassa</i>)	Rosaceae	Morango	Hinomoto & Takafuji (2001).
AB079045	<i>T. urticae</i>	375	Japão, Honshu, Ibaraki	Tsukuba	<i>Fragaria chiloensis</i> (=x <i>ananassa</i>)	Rosaceae	Morango	Hinomoto & Takafuji (2001).
AB116573	<i>T. urticae</i>	710	Japão, Honshu, Nara	Shimoichi	<i>Rosa hybrida</i>	Rosaceae	Rosa	Hinomoto, N. & Takafuji (2004).
AB116574	<i>T. urticae</i>	710	Japão, Honshu, Ibaraki	Tsuchiura	<i>Viola x wittrockina</i>	Violaceae	Amor perfeito	Hinomoto, N. & Takafuji (2004).
AJ414582	<i>T. urticae</i>	849	Holanda	Amsterdan	<i>Sambucus sp</i>	Caprifoliaceae	Sabugueiro	Navajas & Boursot (2003).
AJ316597	<i>T. urticae</i>	849	Grécia	Egion	<i>Citrus limon</i>	Rutaceae	Limão	Navajas & Boursot (2003).
AJ316598	<i>T. urticae</i>	849	Itália	Palermo	<i>Citrus limon</i>	Rutaceae	Limão	Navajas & Boursot (2003).
AJ316599	<i>T. urticae</i>	849	Espanha	Valencia	<i>Citrus aurantium</i>	Rutaceae	Laranja	Navajas & Boursot (2003).
AJ316605	<i>T. urticae</i>	849	Egito	Cairo	<i>Convolvulus arvensis</i>	Convolvulaceae	Corriola	Navajas & Boursot (2003).

■ Acessos destacados em cor cinza correspondem as sequências provavelmente geradas de exemplares erroneamente identificados. As sequências foram coletadas no Genbank em março de 2008

ANEXO 5. Sequências *COI* (*mtDNA*) das espécies do grupo *telarius* e de outras espécies de *Tetranychus* de pigmentação avermelhada previamente publicadas e usadas na composição do conjunto de dados. O número do acesso e o respectivo nome da espécie foram copiados do GenBank. Informações sobre a espécie de planta hospedeira e origem geográfica foram extraídas do artigo científico.

Nº do acesso	Espécie	Tamanho (pb)	País e localidade		Planta hospedeira			Referência
					Nome científico	Família	Nome comum	
AJ316606	<i>T. urticae</i>	849	Tunísia	Sousse	<i>Malva sp</i>	Malvaceae	Malva	Navajas & Boursot (2003)
DQ017588	<i>T. urticae</i>	453	China (Palearctic)	Shihezi Xinjiang	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Fabaceae	Feijão	Xie <i>et al.</i> (2006)
DQ017589	<i>T. urticae</i>	453	China (Palearctic)	Shingcheng Liaoning	<i>Malus pumila</i>	Rosaceae	Maçã	Xie <i>et al.</i> (2006)
DQ016514	<i>T. urticae</i>	453	China (Oriental)	Xuzhou Jiangsu	<i>Malus pumila</i>	Rosaceae	Maçã	Xie <i>et al.</i> (2006)
DQ016515	<i>T. urticae</i>	453	China (Oriental)	Changsha Hunan	<i>Glycine max</i>	Fabaceae	Soja	Xie <i>et al.</i> (2006)
DQ016516	<i>T. urticae</i>	453	China (Palearctic)	Kunming Yunnan	<i>Solanum melongena</i>	Solanaceae	Berinjela	Xie <i>et al.</i> (2006)
DQ016517	<i>T. urticae</i>	453	China Gansu (Palearctic)	Lanzhou	<i>Prunus persica</i>	Rosaceae	Pêssego	Xie <i>et al.</i> (2006)
DQ016518	<i>T. urticae</i>	453	China (Palearctic)	Xian Shaanxi	<i>Malus pumila</i>	Rosaceae	Maçã	Xie <i>et al.</i> (2006)
DQ016519	<i>T. urticae</i>	453	China (Oriental)	Nanning Guangxi	<i>Solanum melongena</i>	Solanaceae	Berinjela	Xie <i>et al.</i> (2006)
DQ016520	<i>T. urticae</i>	453	China (Palearctic)	Yinchuan Ningxia	<i>Zea mays</i>	Poaceae	Milho	Xie <i>et al.</i> (2006)
DQ016521	<i>T. urticae</i>	453	China (Palearctic)	Zhengzhou Henan	<i>Solanum melongena</i>	Solanaceae	Berinjela	Xie <i>et al.</i> (2006)
DQ016522	<i>T. urticae</i>	453	China (Palearctic)	Changli Hebei	<i>Malus pumila</i>	Rosaceae	Maçã	Xie <i>et al.</i> (2006)
DQ016523	<i>T. urticae</i>	453	China (Oriental)	Nanhui Shanghai	<i>Ficus religiosa</i>	Moraceae	Figueira	Xie <i>et al.</i> (2006)
DQ016524	<i>T. urticae</i>	453	China (Palearctic)	Taian Shandong	<i>Malus pumila</i>	Rosaceae	Maçã	Xie <i>et al.</i> (2006)
DQ437549	<i>T. cinnabarinus</i>	453	China (Oriental)	Nanhui Shanghai	<i>Gossypium hirsutum</i>	Malvaceae	Algodão	Xie <i>et al.</i> (2008)
DQ437558	<i>T. cinnabarinus</i>	453	China (Oriental)	Chibi Hubei	<i>Solanum melongena</i>	Solanaceae	Berinjela	Xie <i>et al.</i> (2008)
DQ437560	<i>T. cinnabarinus</i>	453	China (Oriental)	Shaoguan Guangdong	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Fabaceae	Feijão	Xie <i>et al.</i> (2008)

■ Acessos destacados em cor cinza correspondem as sequências provavelmente geradas de exemplares erroneamente identificados. As sequências foram coletadas no Genbank em março de 2008

ANEXO 5. Sequências *COI* (*mtDNA*) das espécies do grupo *telarius* e de outras espécies de *Tetranychus* de pigmentação avermelhada previamente publicadas e usadas na composição do conjunto de dados. O número do acesso e o respectivo nome da espécie foram copiados do GenBank. Informações sobre a espécie de planta hospedeira e origem geográfica foram extraídas do artigo científico.

Nº do acesso	Espécie	Tamanho (pb)	País e localidade		Planta hospedeira			Referência
					Nome científico	Família	Nome comum	
DQ437561	<i>T. cinnabarinus</i>	453	China (Oriental)	Nanning	<i>Solanum melongena</i>	Solanaceae	Berinjela	Xie <i>et al.</i> (2008)
DQ437562	<i>T. cinnabarinus</i>	453	China Hainan	Danzhou	<i>Manihot esculenta</i>	Euphorbiaceae	Mandioca	Xie <i>et al.</i> (2008)
DQ437563	<i>T. cinnabarinus</i>	453	China (Oriental)	Beibei	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Fabaceae	Feijão	Xie <i>et al.</i> (2008)
DQ437542	<i>T. cinnabarinus</i>	453	China (Palearctic)	Haidian	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Fabaceae	Feijão	Hong, X. Y., Xie, L. & He, D. H. Não publicado
DQ437543	<i>T. cinnabarinus</i>	453	China (Palearctic)	Wei	<i>Gossypium hirsutum</i>	Malvaceae	Algodão	Xie <i>et al.</i> (2008)
DQ437545	<i>T. cinnabarinus</i>	453	China (Palearctic)	Huhhot	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Fabaceae	Feijão	Hong, X. Y., Xie, L. & He, D. H. Não publicado
DQ437547	<i>T. cinnabarinus</i>	453	China (Palearctic)	Changchun	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Fabaceae	Feijão	Hong, X. Y., Xie, L. & He, D. H. Não publicado
DQ437550	<i>T. cinnabarinus</i>	453	China (Oriental)	Nantong	Desconhecido			Xie <i>et al.</i> (2008)
DQ437552	<i>T. cinnabarinus</i>	453	China (Oriental)	Anqing	<i>Gossypium hirsutum</i>	Malvaceae	Algodão	Xie <i>et al.</i> (2008)
DQ437554	<i>T. cinnabarinus</i>	453	China (Oriental)	Fuzhou	Desconhecido			Hong, X. Y., Xie, L. & He, D. H. Não publicado
DQ437555	<i>T. cinnabarinus</i>	453	Taiwan	Gaoxiong	<i>Solanum melongena</i>	Solanaceae	Berinjela	Hong, X. Y., Xie, L. & He, D. H. Não publicado
DQ437556	<i>T. cinnabarinus</i>	453	China (Palearctic)	Binzhou	<i>Solanum melongena</i>	Solanaceae	Berinjela	Xie <i>et al.</i> (2008)
DQ437557	<i>T. cinnabarinus</i>	453	China (Palearctic)	Xinye	Desconhecido			Xie <i>et al.</i> (2008)
DQ437567	<i>T. cinnabarinus</i>	453	China (Palearctic)	Yinchuan	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Fabaceae	Feijão	Hong, X. Y., Xie, L. & He, D. H. Não publicado
DQ437568	<i>T. cinnabarinus</i>	453	China (Palearctic)	Xining	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Fabaceae	Feijão	Hong, X. Y., Xie, L. & He, D. H. Não publicado
DQ437544	<i>T. cinnabarinus</i>	453	China (Palearctic)	Yuncheng	<i>Gossypium hirsutum</i>	Malvaceae	Algodão	Xie <i>et al.</i> (2008)
DQ437548	<i>T. cinnabarinus</i>	453	China (Palearctic)	Jiamusi	<i>Solanum melongena</i>	Solanaceae	Berinjela	Xie <i>et al.</i> (2008)

■ Acessos destacados em cor cinza correspondem as sequências provavelmente geradas de exemplares erroneamente identificados. As sequências foram coletadas no Genbank em março de 2008

ANEXO 5. Sequências *COI* (*mtDNA*) das espécies do grupo *telarius* e de outras espécies de *Tetranychus* de pigmentação avermelhada previamente publicadas e usadas na composição do conjunto de dados. O número do acesso e o respectivo nome da espécie foram copiados do GenBank. Informações sobre a espécie de planta hospedeira e origem geográfica foram extraídas do artigo científico.

Nº do acesso	Espécie	Tamanho (pb)	País e localidade		Planta hospedeira			Referência
					Nome científico	Família	Nome comum	
DQ437551	<i>T. cinnabarinus</i>	453	China (Oriental) Zhejiang	Cixi	<i>Gossypium hirsutum</i>	Malvaceae	Algodão	Xie <i>et al.</i> (2008).
DQ437553	<i>T. cinnabarinus</i>	453	China (Oriental) Jiangxi	Pengze	<i>Gossypium hirsutum</i>		Algodão	Xie <i>et al.</i> (2008)
DQ437565	<i>T. cinnabarinus</i>	453	China (Palearctic) Shaanxi	Zhouzhi	Desconhecido			Xie <i>et al.</i> (2008)
DQ437566	<i>T. cinnabarinus</i>	453	China (Palearctic) Gansu	Lanzhou	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Fabaceae	Feijão	Xie <i>et al.</i> (2008)
DQ437559	<i>T. cinnabarinus</i>	453	China (Oriental) Hunan	Changsha	<i>Gossypium hirsutum</i>	Malvaceae	Algodão	Xie <i>et al.</i> (2008)
DQ437564	<i>T. cinnabarinus</i>	453	China (Oriental) Chongqing	Beibei	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Fabaceae	Feijão	Xie <i>et al.</i> (2008)
DQ437546	<i>T. cinnabarinus</i>	453	China (Palearctic) Liaoning	Shenyang	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Fabaceae	Feijão	Hong, X. Y., Xie, L. & He, D. H. Não publicado
DQ656483	<i>T. cinnabarinus</i>	410	Israel		Desconhecido			Ben-David <i>et al.</i> (2007)
AB257315	<i>T. truncatus</i>	769	Japão, Honshu	Kyoto	<i>Boehmeria nivea</i>	Urticaceae	Rami	Hinomoto <i>et al.</i> (2007)
AB257316	<i>T. truncatus</i>	769	Japão, Honshu	Kyoto	<i>Boehmeria nivea</i>	Urticaceae	Rami	Hinomoto <i>et al.</i> (2007)
AB257317	<i>T. truncatus</i>	769	Japão, Honshu	Kyoto	<i>Boehmeria nivea</i>	Urticaceae	Rami	Hinomoto <i>et al.</i> (2007)
X80856	<i>T. kanzawai</i>	386	Congo	Brazaville	<i>Manihot esculenta</i>	Euphorbiaceae	Mandioca	Navajas <i>et al.</i> (1996).
AB116566	<i>T. kanzawai</i>	729	Japão		Desconhecido			Hinomoto & Takafuji (2004)
AB116567	<i>T. kanzawai</i>	744	Japão		Desconhecido			Hinomoto & Takafuji (2004)
AB116568	<i>T. kanzawai</i>	710	Japão Nansei-shoto Okinawa	Nago	<i>Prunus persica</i>	Rosaceae	Pêssego	Hinomoto & Takafuji (2004)
AB116569	<i>T. kanzawai</i>	759	Japão		Desconhecido			Hinomoto & Takafuji (2004)
AB116570	<i>T. kanzawai</i>	718	Japão, Kyushu, Kagoshima	Tanegashima	Desconhecido			Hinomoto & Takafuji (2004)

■ Acessos destacados em cor cinza correspondem as sequências provavelmente geradas de exemplares erroneamente identificados. As sequências foram coletadas no Genbank em março de 2008

ANEXO 5. Sequências *COI* (*mtDNA*) das espécies do grupo *telarius* e de outras espécies de *Tetranychus* de pigmentação avermelhada previamente publicadas e usadas na composição do conjunto de dados. O número do acesso e o respectivo nome da espécie foram copiados do GenBank. Informações sobre a espécie de planta hospedeira e origem geográfica foram extraídas do artigo científico.

Nº do acesso	Espécie	Tamanho (pb)	País e localidade		Planta hospedeira			Referência
					Nome científico	Família	Nome comum	
AB116571	<i>T. kanzawai</i>	723	Japão, Kyushu, Kagoshima	Yaku	<i>Camellia sinensis</i>	Theaceae	Chá verde	Hinomoto & Takafuji (2004)
AB116572	<i>T. kanzawai</i>	719	Japão		Desconhecido			Hinomoto & Takafuji (2004)
AB079033	<i>T. kanzawai</i>	729	Japão, Honshu, Ibaraki	Ami Ibaraki University	<i>Pueraria lobata</i>	Fabaceae	Kudzu	Hinomoto & Takafuji (2004)
AB079034	<i>T. kanzawai</i>	1203	Japão, Hokkaido, Hokkaido	Assabu	<i>Amphicarpaea edgeworthii</i>	Fabaceae	Amendoim bambarra	Hinomoto & Takafuji (2004)
AB079035	<i>T. kanzawai</i>	709	Japão, Hokkaido, Hokkaido	Hakodate	<i>Amphicarpaea edgeworthii</i>	Fabaceae	Amendoim bambarra	Hinomoto & Takafuji (2004)
AB079036	<i>T. kanzawai</i>	718	Japão, Honshu, Ibaraki	Tsukuba	<i>Morus alba</i>	Moraceae	Amora	Hinomoto & Takafuji (2004)
AB079037	<i>T. kanzawai</i>	759	Japão, Shikoku, Kochi	Kochi	<i>Fragaria chiloensis</i> (=x <i>ananassa</i>)	Rosaceae	Morango	Hinomoto & Takafuji (2004)
AB079039	<i>T. kanzawai</i>	768	Japão Honshu Shizuoka	Kanaya	<i>Camellia sinensis</i>	Theaceae	Chá verde	Hinomoto & Takafuji (2004)
AB079040	<i>T. kanzawai</i>	710	Japão, Honshu, Toyama	Toyama	<i>Solanum melongena</i>	Solanaceae	Berinjela	Hinomoto & Takafuji (2004)
AB079041	<i>T. kanzawai</i>	754	Japão, Honshu, Toyama	Toyama	<i>Malus domestica</i>	Rosaceae	Maçã	Hinomoto & Takafuji (2004)
AB079042	<i>T. kanzawai</i>	773	Japão, Honshu, Wakayama	Hikigawa	<i>Camellia sinensis</i>	Theaceae	Chá verde	Hinomoto & Takafuji (2004)
AB079048	<i>T. kanzawai</i>	770	Japão, Honshu, Shiga	Shigaraki	<i>Camellia sinensis</i>	Theaceae	Chá verde	Hinomoto & Takafuji (2004)
AB079049	<i>T. kanzawai</i>	761	Japão, Kyushu, Kagoshima	Yaku	<i>Clerodendrum trichotomum</i>	Verbenaceae	Lágrima de Cristo	Hinomoto & Takafuji (2004)
AB079050	<i>T. kanzawai</i>	768	Japão, Hokkaido, Hokkaido	Kimobetsu	<i>Trifolium pratense</i>	Fabaceae	Trevo vermelho	Hinomoto & Takafuji (2004)
AB079051	<i>T. kanzawai</i>	767	Japão, Honsh, Nara	Nishi Yoshino	<i>Diospyros kaki</i>	Ebenaceae	Caqui	Hinomoto & Takafuji (2004)
AB079052	<i>T. kanzawai</i>	370	Japão, Hokkaido, Hokkaido	Horokanai	<i>Trifolium pratense</i>	Fabaceae	Trevo vermelho	Hinomoto & Takafuji (2004)
AB079047	<i>T. kanzawai</i>	370	Jaon, Nansei-Shoto, Okinawa	Nago	<i>Prunus persica</i>	Rosaceae	Pêssego	Hinomoto & Takafuji (2004)

■ Acessos destacados em cor cinza correspondem as sequências provavelmente geradas de exemplares erroneamente identificados. As sequências foram coletadas no Genbank em março de 2008

ANEXO 5. Sequências *COI* (*mtDNA*) das espécies do grupo *telarius* e de outras espécies de *Tetranychus* de pigmentação avermelhada previamente publicadas e usadas na composição do conjunto de dados. O número do acesso e o respectivo nome da espécie foram copiados do GenBank. Informações sobre a espécie de planta hospedeira e origem geográfica foram extraídas do artigo científico.

Nº do acesso	Espécie	Tamanho (pb)	País e localidade		Planta hospedeira			Referência
					Nome científico	Família	Nome comum	
AB079043	<i>T. kanzawai</i>	375	Japão, Kyushu, Kagoshima	Tanegashima	<i>Camellia sinensis</i>	Theaceae	Chá verde	Hinomoto & Takafuji (2004).
AB079038	<i>T. kanzawai</i>	375	Japão, Kyushu, Kagoshima	Yaku	<i>Camellia sinensis</i>	Theaceae	Chá verde	Hinomoto & Takafuji (2004).
AB079103	<i>T. kanzawai</i>	765	Taiwan Taichung	Dungshr	<i>Manihot esculenta</i>	Euphorbiaceae	Mandioca	Hinomoto & Takafuji (2004).
AB079105	<i>T. kanzawai</i>	809	Taiwan Nantou	Lugu	<i>Camellia sinensis</i>	Theaceae	Chá verde	Hinomoto & Takafuji (2004).
AB079111	<i>T. kanzawai</i>	809	Taiwan Miaoli	Miaoli	<i>Pyrus pyrifolia</i>	Rosaceae	Pêssego asiático	Hinomoto & Takafuji (2004).
AB079110	<i>T. kanzawai</i>	370	Taiwan Changus	Shihu	<i>Prunus persica</i>	Rosaceae	Pêssego	Hinomoto & Takafuji (2004).
AB079112	<i>T. kanzawai</i>	370	Taiwan Miaoli	Miaoli	<i>Pyrus serotina</i>	Rosaceae	Pêra asiática	Hinomoto & Takafuji (2004).
AB079109	<i>T. kanzawai</i>	370	Taiwan Changus	Datsuen	<i>Pyrus serotina</i>	Rosaceae	Pêra asiática	Hinomoto & Takafuji (2004).
AB079108	<i>T. kanzawai</i>	370	Taiwan Taichung	Dungshr	<i>Pyrus serotina</i>	Rosaceae	Pêra asiática	Hinomoto & Takafuji (2004).
AB079107	<i>T. kanzawai</i>	370	Taiwan Nantou	Lugu	<i>Prunus persica</i>	Rosaceae	Pêssego	Hinomoto & Takafuji (2004).
AB079106	<i>T. kanzawai</i>	370	Taiwan Nantou	Minjian	<i>Prunus persica</i>	Rosaceae	Pêssego	Hinomoto & Takafuji (2004).
AB079104	<i>T. kanzawai</i>	370	Taiwan Nantou	Lugu	<i>Camellia sinensis</i>	Theaceae	Chá verde	Hinomoto & Takafuji (2004).
AB079102	<i>T. kanzawai</i>	370	Taiwan Taichung	Dungshr	<i>Pyrus serotina</i>	Rosaceae	Pêra asiática	Hinomoto & Takafuji (2004).
AY044644	<i>T. kanzawai</i>	902	China (Oriental) Fujian Taizhong	Taizhong	Desconhecido			Hong & Feng. Não publicado.
AY044646	<i>T. kanzawai</i>	902	China (Oriental) Jiangxi	Nanchang	Desconhecido			Hong & Feng. Não publicado.
AY044645	<i>T. kanzawai</i>	902	China (Oriental) Fujian	Fuzhou	Desconhecido			Hong & Feng. Não publicado.
AY044643	<i>T. kanzawai</i>	902	China (Oriental) Jiangxi	Nanchang	Desconhecido			Hong & Feng. Não publicado.
AY044642	<i>T. kanzawai</i>	902	China (Oriental) Fujian	Fuzhou	Desconhecido			Hong & Feng. Não publicado.

■ Acessos destacados em cor cinza correspondem as sequências provavelmente geradas de exemplares erroneamente identificados. As sequências foram coletadas no Genbank em março de 2008

ANEXO 5. Sequências *COI* (*mtDNA*) das espécies do grupo *telarius* e de outras espécies de *Tetranychus* de pigmentação avermelhada previamente publicadas e usadas na composição do conjunto de dados. O número do acesso e o respectivo nome da espécie foram copiados do GenBank. Informações sobre a espécie de planta hospedeira e origem geográfica foram extraídas do artigo científico.

Nº do acesso	Espécie	Tamanho (pb)	País e localidade		Planta hospedeira			Referência
					Nome científico	Família	Nome comum	
AB066470	<i>T. kanzawai</i>	396	Japão Honshu Shizuoka	Kanaya	<i>Camellia sinensis</i>	Theaceae	Chá verde	Hinomoto <i>et al.</i> (2001).
AJ414583	<i>T. turkestanii</i>	849	França	Montpellier	<i>Convolvulus arvensis</i>	Convolvulaceae	Corriola	Navajas & Boursot (2003)
AJ316600	<i>T. turkestanii</i>	849	França	Montpellier	<i>Euphorbia sp.</i>	Euphorbiaceae	Maleiteira	Navajas & Boursot (2003)
AJ316601	<i>T. turkestanii</i>	849	França	Mauguio Fréjorgues Melgueil	<i>Fragaria chiloensis</i> (=x <i>ananassa</i>)	Rosaceae	Morango	Navajas & Boursot (2003)
AJ316602	<i>T. turkestanii</i>	849	Holanda	Enkhuizen	<i>Convolvulus arvensis</i>	Convolvulaceae	Corriola	Navajas & Boursot (2003)
AJ316603	<i>T. turkestanii</i>	849	Polônia		<i>Convolvulus arvensis</i>	Convolvulaceae	Corriola	Navajas & Boursot (2003)
AJ316604	<i>T. turkestanii</i>	849	USA California	Watsonville	<i>Fragaria chiloensis</i> (=x <i>ananassa</i>)	Rosaceae	Morango	Navajas & Boursot (2003)
AB257313	<i>T. piercei</i>	467	Japão, Yaeyama	Taketomi Jima	<i>Morus sp.</i>	Moraceae	Amora	Hinomoto <i>et al.</i> (2007).
AB257314	<i>T. piercei</i>	467	Japão, Yaeyama	Taketomi Jima	<i>Morus sp.</i>	Moraceae	Amora	Hinomoto <i>et al.</i> (2007).
X80859	<i>T. neocaledonicus</i>	391	Benin	Cotonou	<i>Vigna unguiculata</i>	Fabaceae	Cowpea	Navajas <i>et al.</i> (1998).
X80860	<i>T. gloveri</i>	391	França	Ilha do Vento, Papara	<i>Colocasia sp.</i>	Araceae	Taro	Navajas <i>et al.</i> (1996).

■ Acessos destacados em cor cinza correspondem as sequências provavelmente geradas de exemplares erroneamente identificados. As sequências foram coletadas no Genbank em março de 2008

ANEXO 6. Variação nas sequências da região ITS2 do DNA ribossômico. **A.** *Tetranychus urticae* e *T. kanzawai*; **B.** *T. urticae* e *T. truncatus*; **C.** *T. urticae* e *T. turkestanii*; **D.** *T. urticae* e *T. pueraricola*. Somente os sítios variáveis são apresentados. Os pontos indicam identidade com as sequências de *Tetranychus urticae*. As sequências depositadas no GenBank como *T. cinnabarinus* e os acessos AB257736, AB257737, AB257738 depositados como *T. urticae* estão destacadas em cinza. A linha preta separa *T. urticae* das outras espécies de *Tetranychus* do grupo *telarius*.

A.

GenBank Nº do acesso - identificação	Sítios variáveis											Espécies	
	7	8	2	3	3	3	4	4	4	4	4		<i>T. urticae</i>
	9	0	3	0	3	8	0	1	2	3	5		
			1	9	9	8	6	1	0	4	5		
AB076369 <i>T.urticae</i> (37 x)	G	C	A	C	G	G	C	A	G	-	A		
X99876 <i>T.kanzawai</i> (2 x)	A	.	.	A	A	.	T	G	.	-	T	<i>T. kanzawai</i>	
AB076370 <i>T.kanzawai</i>	A	.	G	A	A	.	T	G	.	-	T		
AY750701 <i>T.kanzawai</i>	A	.	.	A	A	.	T	G	C	-	T		
DQ512866 <i>T.cinnabarinus</i> (6 x)	A	.	.	A	A	.	T	G	.	-	T		
AB257736 <i>T.urticae</i> (2 x)	A	.	.	A	A	.	T	G	.	T	T		
AB257737 <i>T.urticae</i>	A	.	.	A	A	A	T	G	.	T	T		

B.

GenBank Nº do acesso - identificação	Sítios variáveis											Espécies			
	6	9	1	2	3	3	3	3	3	3	3	4	4	<i>T. urticae</i>	
	8	4	2	1	0	0	1	2	3	3	9	1	5		
			0	0	5	9	1	1	7	9	5	1	4		
AB076369 <i>T.urticae</i> (37 x)	T	T	C	A	T	C	G	C	T	T	C	A	A		
AY750702 <i>T. truncatus</i> (2 x)	C	.	.	.	C	A	A	A	G	A	.	G	T	<i>T. truncatus</i>	
AB257730 <i>T. truncatus</i>		.	.	G	C	A	A	A	G	A	T	G	T		
DQ523844 <i>T. cinnabarinus</i> (11 x)	C	.	.	.	C	A	A	A	G	A	.	G	T		
DQ512869 <i>T. cinnabarinus</i>	C	G	.	.	C	A	A	A	G	A	.	G	T		
DQ515790 <i>T. cinnabarinus</i>	C	.	T	.	C	A	A	A	G	A	.	G	T		

C.

GenBank Nº do acesso - identificação	Sítios variáveis											Espécies	
			1	3	3	3	4	4	4	4			<i>T. urticae</i>
		5	1	0	3	5	1	4	3	5			
		8	6	9	9	8	1	6	4	4			
AB076369 <i>T. urticae</i> (37 x)	G	A	C	G	C	A	-	A	A				
AM408032 <i>T_turkestanii</i> (2 x)	.	.	.	A	T	T	-	.	T			<i>T.turkestanii</i>	
AM408041 <i>T_turkestanii</i>	.	G	.	A	T	T	T	.	T				
AJ295611 <i>T_turkestanii</i>	T	.	.	A	T	T	-	.	T				
DQ656467 <i>T_turkestanii</i>	.	.	A	A	T	T	-	.	T				
DQ656468 <i>T_turkestanii</i>	.	.	A	A	T	T	-	G	T				
DQ523840 <i>T_cinnabarinus</i> (5 x)	.	.	A	A	.	T	-	.	T				

D.

GenBank Nº do acesso - identificação	Sítios variáveis											Espécies		
	0	1	1	1	2	3	3	3	3	3	4	4	<i>T. urticae</i>	
	4	0	5	6	2	1	3	3	3	4	1	5		
	9	9	3	3	5	1	6	8	9	3	5	8		
AB076369 <i>T.urticae</i> (37 x)	C	T	-	-	C	C	T	-	-	G	A	A		
AY13609 <i>T. pueraricola</i>	T	Y	A	A	.	A	C	C	A	A	T	T	<i>T. pueraricola</i>	
AB076372 <i>T. pueraricola</i>	.	.	A	A	G	A	C	C	A	A	T	T		
DQ523842 <i>T. cinnabarinus</i> (3 x)	.	.	-	-	.	A	C	C	A	A	T	T		

ANEXO 7. Seqüências da região ITS do DNA ribossômico de *Tetranychus urticae* previamente publicadas. Nº de acesso copiado do GenBank e informações sobre plantas hospedeiras e origem geográfica extraídas do artigo científico.

Nº do acesso	Tamanho	País e localidade		Planta hospedeira			Referência
				Nome científico	Família	Nome comum	
AB076369	1205	Japão, Honshu, Wakayama	Goboh	<i>Citrullus lanatus</i> (Thunb.)	Cucurbitaceae	melancia	Osakabe <i>et al.</i> (2002).
AY750700	543	Taiwan		desconhecido			Yeh, W. B., Hsu, K., Hua, T. & Chang, N. T. Não publicado.
X99881	613	Holanda		desconhecido			Navajas <i>et al.</i> (1998).
DQ656440	474	Israel		<i>Citrullus lanatus</i> (Thunb.)	Cucurbitaceae	melancia	Ben-David <i>et al.</i> (2007),
DQ656441	474	Israel		<i>Citrullus lanatus</i> (Thunb.)	Cucurbitaceae	melancia	Ben-David <i>et al.</i> (2007)
DQ656442	474	Israel		<i>Citrullus lanatus</i> (Thunb.)	Cucurbitaceae	melancia	Ben-David <i>et al.</i> (2007)
DQ680165	645	China, Changli (Palearctic)	Heibei	<i>Malus domestica</i> L.	Rosaceae	maçã	Hong, X. Y., Xie, L. & Wang, J. H. Não publicado
DQ680166	645	China (Palearctic)	Liaoning	<i>Malus domestica</i> L.	Rosaceae	maçã	Hong, X. Y., Xie, L. & Wang, J. H. Não publicado
DQ680167	645	China (Palearctic) Taian	Shandong	<i>Malus domestica</i> L.	Rosaceae	maçã	Hong, X. Y., Xie, L. & Wang, J. H. Não publicado
DQ680168	645	China (Palearctic) Zhengzhou	Henan	<i>Solanum melongena</i> L.	Solanaceae	berinjela	Hong, X. Y., Xie, L. & Wang, J. H. Não publicado
DQ680169	645	China (Oriental) Xuzhou	Jiangsu	<i>Malus domestica</i> L.	Rosaceae	maçã	Hong, X. Y., Xie, L. & Wang, J. H. Não publicado
DQ680170	645	China (Palearctic) Lanzhou	Gansu	<i>Prunus persica</i> L.	Rosaceae	pêssego	Hong, X. Y., Xie, L. & Wang, J. H. Não publicado
DQ680171	645	China (Palearctic) Xian	Shaanxi	<i>Malus domestica</i> L.	Rosaceae	maçã	Hong, X. Y., Xie, L. & Wang, J. H. Não publicado
DQ778064	645	Japão Honshu Aomori	Kuroishi	Desconhecido			Hong, X. Y., Xie, L. & Wang, J. H. Não publicado
DQ778065	645	China (Oriental) Nanning	Guangxi	<i>Solanum melongena</i> L.	Solanaceae	berinjela	Hong, X. Y., Xie, L. & Wang, J. H. Não publicado
DQ778066	645	China (Palearctic) Yinchuan	Ningxia	<i>Zea mays</i> L.	Poaceae	milho	Hong, X. Y., Xie, L. & Wang, J. H. Não publicado
DQ778067	645	China (Oriental) Nanhui	Shanghai	<i>Ficus religiosa</i> L.	Moraceae	cerejeira	Hong, X. Y., Xie, L. & Wang, J. H. Não publicado
DQ778068	645	China (Palearctic) Shihezi	Xinjiang	<i>Phaseolus vulgaris</i> L.	Fabaceae	feijão	Hong, X. Y., Xie, L. & Wang, J. H. Não publicado
DQ778069	645	China (Oriental) Changsha	Hunan	<i>Glycine max</i> Merrill	Fabaceae	soja	Hong, X. Y., Xie, L. & Wang, J. H. Não publicado
AM408046	481	Espanha	Onda	<i>Citrus reticulata</i> Blanco	Rutaceae	tangerina	Hurtado <i>et al.</i> (2008).
AM408030	1123	Espanha	Castellón de la Plana	<i>Citrus reticulata</i> Blanco	Rutaceae	tangerina	Hurtado <i>et al.</i> (2008).
AM408031	1220	França		<i>Solanum lycopersicum</i> L.	Solanaceae	tomate	Hurtado <i>et al.</i> (2008).
AM408035	1163	EUA	Flórida	<i>Citrus sinensis</i> Osbeck	Rutaceae	laranja	Hurtado <i>et al.</i> (2008).
AM408042	484	Espanha	Amaposta	<i>Citrus reticulata</i> Blanco	Rutaceae	tangerina	Hurtado <i>et al.</i> (2008).
AM408043	482	Espanha	Betxi	<i>Citrus reticulata</i> Blanco	Rutaceae	tangerina	Hurtado <i>et al.</i> (2008).
AM408044	482	Espanha	Callosa	<i>Citrus reticulata</i> Blanco	Rutaceae	tangerina	Hurtado <i>et al.</i> (2008).
AM408045	484	Espanha	Moncofar	<i>Citrus reticulata</i> Blanco	Rutaceae	tangerina	Hurtado <i>et al.</i> (2008).

ANEXO 8. Seqüências da região *COI* do DNA mitocondrial de *Tetranychus urticae* previamente publicadas. Nº de acesso copiado do GenBank e informações sobre plantas hospedeiras e origem geográfica extraídas do artigo científico.

Nº do acesso	Tamanho	País e localidade		Planta hospedeira			Referência
				Nome científico	Família	Nome comum	
X80855	394	França, Montpellier	Montpellier	<i>Phaseolus vulgaris</i> L.	Fabaceae	feijão	Navajas <i>et al.</i> (1996).
X74571	564	Holanda		<i>Sambucus</i> sp	Caprifoliaceae	sabugueiro	Fournier <i>et al.</i> (1994).
AB041257	644	Japão, Honshu	Tohoku	desconhecido			Toda <i>et al.</i> (2000).
AB066449	396	Japão, Hokkaido	Sapporo	<i>Trifolium repens</i> L.	Fabaceae	trevo rasteiro	Hinomoto <i>et al.</i> (2001)
AB066450	396	Japão, Hokkaido	Naganuma	Glicine max Merrill	Fabaceae	soja	Hinomoto <i>et al.</i> (2001)
AB066451	396	Japão, Hokkaido Hokkaido	Kimobetsu	<i>Trifolium repens</i> L.	Fabaceae	trevo rasteiro	Hinomoto <i>et al.</i> (2001)
AB066452	396	Japão, Hokkaido Hokkaido	Assabu	<i>Althaea rosea</i> Cav.	Malvaceae	malvaisco	Hinomoto <i>et al.</i> (2001)
AB066453	396	Japão, Honshu Ibaraki	Tsukuba	<i>Fragaria grandiflora</i> Crantz	Rosaceae	morango	Hinomoto <i>et al.</i> (2001)
AB066454	396	Japão, Honshu Nara	Shinjo	<i>Chrysanthemum morifolium</i> Ramat	Asteraceae	crisântemo	Hinomoto <i>et al.</i> (2001)
AB066455	396	Japão, Honshu Nara	Shimoichi	<i>Rosa hybrida</i> Vill.	Rosaceae	rosa	Hinomoto <i>et al.</i> (2001)
AB066456	396	Japão, Nansei-Shoto Okinawa	Itoman	<i>Phaseolus vulgaris</i> L.	Fabaceae	feijão	Hinomoto <i>et al.</i> (2001)
AB066457	396	Japão, Nansei-Shoto Okinawa	Hirara	<i>Capsicum annuum</i> L.	Solanaceae	pimentão	Hinomoto <i>et al.</i> (2001)
AB066458	396	Itália, Toscana	Firenze	<i>Convolvulus arvensis</i>	Convolvulaceae	corriola	Hinomoto <i>et al.</i> (2001)
AB066459	396	Brasil, Santa Catarina	Caçador	<i>Fragaria grandiflora</i> Crantz	Rosaceae	morango	Hinomoto <i>et al.</i> (2001)
AB066460	396	Tailândia	Chiangmai	<i>Rosa hybrida</i> Vill.	Rosaceae	rosa	Hinomoto <i>et al.</i> (2001)
AB066461	396	Taiwan	Miaoli	<i>Fragaria grandiflora</i> Crantz	Rosaceae	morango	Hinomoto <i>et al.</i> (2001)
AB066462	396	Japão, Honshu, Ibaraki	Tomobe	<i>Dianthus caryophyllus</i> L.	Caryophyllaceae	cravina	Hinomoto <i>et al.</i> (2001)
AB066463	396	Japão, Honshu, Ibaraki	Tsukuba	<i>Fragaria grandiflora</i> Crantz	Rosaceae	morango	Hinomoto <i>et al.</i> (2001)
AB066464	396	Japão, Honshu, Ibaraki	Tsuchiura	<i>Viola x wittrockina</i>	Violaceae	amor-perfeito	Hinomoto <i>et al.</i> (2001)
AB066465	396	Japão, Honshu, Chiba	Inzai	<i>Dianthus caryophyllus</i> L.	Caryophyllaceae	cravina	Hinomoto <i>et al.</i> (2001)
AB066466	396	Japão, Honshu, Wakayama	Goboh	<i>Gypsophila paniculata</i> L.	Caryophyllaceae	mosquitinho	Hinomoto <i>et al.</i> (2001)
AB066467	396	Japão, Honshu, Wakayama	Goboh	<i>Eustoma russellianum</i> (Hook.) G.Don	Gentianaceae	lisianto	Hinomoto <i>et al.</i> (2001)
AB066468	396	Japão, Shikoku, Kochi	Nankoku	<i>Dianthus caryophyllus</i> L.	Caryophyllaceae	cravina	Hinomoto <i>et al.</i> (2001)
AB066469	396	Itália, Toscana	Firenze	<i>Convolvulus arvensis</i> L.	Convolvulaceae	corriola	Hinomoto <i>et al.</i> (2001)
AB079044	375	Japão, Honshu, Ibaraki	Tsukuba	<i>Fragaria grandiflora</i> Crantz	Rosaceae	morango	Hinomoto & Takafuji (2001).
AB079045	375	Japão, Honshu, Ibaraki	Tsukuba	<i>Fragaria grandiflora</i> Crantz	Rosaceae	morango	Hinomoto & Takafuji (2001).
AB116573	710	Japão, Honshu, Nara	Shimoichi	<i>Rosa hybrida</i> Vill.	Rosaceae	rosa	Hinomoto & Takafuji (2004).
AB116574	710	Japão, Honshu, Ibaraki	Tsuchiura	<i>Viola x wittrockina</i>	Violaceae	amor-perfeito	Hinomoto & Takafuji (2004).
AJ414582	849	Holanda	Amsterdam	<i>Sambucus</i> sp	Caprifoliaceae	sabugueiro	Navajas & Boursot (2003).
AJ316597	849	Grécia	Egion	<i>Citrus limon</i> L.	Rutaceae	limão	Navajas & Boursot (2003).
AJ316598	849	Itália, Toscana	Palermo	<i>Citrus limon</i> L.	Rutaceae	limão	Navajas & Boursot (2003).
AJ316599	849	Espanha	Valencia	<i>Citrus aurantium</i> L.	Rutaceae	laranja azeda	Navajas & Boursot (2003).
AJ316605	849	Egito	Cairo	<i>Convolvulus arvensis</i> L.	Convolvulaceae	corriola	Navajas & Boursot (2003).
AJ316606	849	Tunísia	Sousse	<i>Malva</i> sp	Malvaceae	malva	Navajas & Boursot (2003).
DQ017588	453	China (Paleártica) Xinjiang	Shihezi	<i>Phaseolus vulgaris</i> L.	Fabaceae	feijão	Xie <i>et al.</i> (2006).
DQ437546	453	China (Paleártica) Liaoning	Shenyang	<i>Phaseolus vulgaris</i> L.	Fabaceae	feijão	Hong, X.Y., Xie, L. & He, D.H. Não publicado
DQ656483	410	Israel		desconhecido			Ben-David <i>et al.</i> (2007).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abad, R., Pina, T., Castañera, P., & Urbaneja, A. (2006). Comparative life history traits of four most abundant phytoseiids in Spanish mandarines feeding on the two-spotted spider mites, *Tetranychus urticae*. In *Program Book and Abstract, 12th International Congress of Acarology, Amsterdam, The Netherlands, Jan Bruin (Ed.), August 21-26, 2006* (p.3).
- Allam, L., Hmimina, M. & Ouahbi, A. (1999). Influence of host plant changing on the development of *Tetranychus urticae* Koch (Acari, Tetranychidae): consequence of mite infestation in *Citrus* fields. *Journal of Applied Entomology*, 123(10), 597-601.
- Almaguel, L. & Machado, L. R. (1984). Nuevo acaro Tetranychidae en cana (*Saccharum officinarum*). *Ciencia e Técnica en la Agricultura, Protección de Plant*, 7(2), 45-55.
- Amorim, D. S. (1994). *Elementos básicos de sistemática filogenética*. São Paulo: Sociedade Brasileira de Entomologia (314p).
- Anaraki, P.B., Arbabi, M. & Ajbishe, R.S. (2007). Study on different eggplant cultivars for infestation to two spotted spider mite (*Tetranychus urticae* complex) in Varamin region. *Seed and Plant*, .23,(1),2.
- Andrews, K. L. & Poe, S. L. (1980). Spider mites of El Salvador, Central America (Acari: Tetranychidae). *Florida Entomologist*, 63(4), 502-505.
- Ansaloni, T., Miret, J.-A. J. & Ruíz, M. H. (2006). A new tool for Tetranychidae species molecular discrimination for quarantine purposes: a nested PCR-based technique. In *Program Book and Abstract, 12th International Congress of Acarology, Amsterdam, The Netherlands, Jan Bruin (Ed.), August 21-26, 2006* (p.12).
- Aragão, C. A., Dantas, B. F. & Benites, F. R. G. (2002). Efeito de aleloquímicos em tricomas foliares de tomateiro na repelência a ácaro (*Tetranychus urticae* Koch.) em genótipos com teores contrastantes de 2-tridecanona. *Acta Botanica Brasilica*, 16, 83-88.

- Aranda, B. R. & Flechtman, C. H. W. (1971). A report on the Tetranychidae of Paraguay. *Proceedings of the Entomological Society of Washington*, 73(1), 29-33.
- Arias Giralda, A. & Nieto Calderó, J. (1982). Eficacia de los insecticidas fosforados orgánicos y dos piretroides contra "pollilla del rácino" (*Lobesia botrana* Den. & Schiff.) y efecto secundario sobre "araña amarilla comun" (*Tetranychus urticae* Koch). *Boletín del Servicio de Defensa contra Plagas e Inspección Fitopatológica*, 7(1-2), 185-197, 1982. Resumo em CAB Abstracts on CD-ROM, 1982-83.
- Artofer, R. (1976). Spider-mites in vine cultivation. *Pflanzenarzt*, 29 (7), 73.
- Aucejo, S, Foo, M. & Ramis, M. (2003). Evaluation of the effectiveness of some miticides against *Tetranychus urticae* Koch (Tetranychidae) in clementines. *Boletín de Sanidad Vegetal, Plagas*, 29(3), 453-459.
- Avise, J. C. (1989). Gene trees and Organismal histories: a phylogenetic approach to population biology. *Evolution*, 43(6), 1192-1208.
- Avise, J. C. (2000). *Phylogeograph. The history and formation of species*. Cambridge, MA: Harvard University Press.
- Avise, J. C., Arnold, J., Ball, R.M., Bermingham, E., Lamb, T., Neigel, J. E., Reeb, C. A. & Saunders, N. C. (1987). Intraspecific phylogeography: the mitochondrial DNA bridge between population genetics and systematics. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 18, 489-522.
- Avise, J.C. (1994) *Molecular Markers, Natural History and Evolution*. New York, NY: Chapman and Hall.
- Baillod, M., Antonin, P. & Mittaz, C. (1982). Migrations, population estimates and injuriousness of the common yellow spider-mite, *Tetranychus urticae* Koch in viticulture in Wallis. *Revue Suisse de Viticulture, d'Arboriculture et d'Horticulture*, 21(3), 179-183. Resumo em CAB Abstract on CD-ROM, 1982/83.
- Baker, E. W. & Pritchard, A. E. (1960). The tetranychoid mites of Africa. *Hilgardia*, 29(11), 455-574.

- Baker, E. W. & Pritchard, A. E. (1962). Arañas rojas de América Central (Acarina:Tetranychidae). *Revista de la Sociedad Mexicana de Historia Natural*, 23, 309-340.
- Baker, E. W. & Tuttle, D. M. (1972). New species and further notes on the Tetranychoidea mostly from the south-western United States (Acarina: Tetranychidae and Tenuipalpidae). *Smithsonian Contributions to Zoology*, 116, 1-37.
- Baker, E. W. & Tuttle, D. M. (1994). *A guide to the spider mites (Tetranychidae) of the United States*. West Bloomfield, USA: Indira Publishing House. (347).
- Baker, E. W. (1975). Plant-feeding mites of Thailand (Tetranychidae, Tenuipalpidae, and Tuckerellidae). Plant Protection Service Technical Bulletin. Bangkok, Thailand, 35, 43p.
- Baker, R., Cowley, J. M. & Harte, D. J. (1993). *Pest risk assessment: a process for the assessment of pest risk associated with the importation of plants and plant products into New Zealand*. Auckland: Lynfield Plant Protection Centre Publication, 1 (16p).
- Baliraine, F. N., Bonizzoni, M., Guglielmino, C. R., Osir, E. O., Mulaa, F. J., Gomulski, L. M., Zheng, L., Quilici, S., Gasperi, G. & Malacrida, A. R. (2004) Population genetics of the potentially invasive African fruit fly species, *Ceratitis rosa* and *Ceratitis fasciventris* (Diptera: Tephritidae). *Molecular Ecology*, 13, 683-695.
- Banks, N. (1900). The red spiders of the United States (*Tetranychus* and *Stigmaeus*). United States Department of Agriculture, Division of Entomology *Technical Series*, 8, 65-77.
- Barbosa, S. & França, F. H. (1980). As pragas do tomateiro e seu controle. *Informe Agropecuário*, 6(66), 37-40.
- Barros, R. D., Soria, P. E. & Ribeiro, M. F. (2007). *Tetranychus urticae* Koch, 1836 (Acari: Tetranychidae) spider mite biological disequilibrium after insecticide applications on cotton plants. *Arquivos do Instituto Biológico*, 74(2), 171-174.

- Ben-David, T., Melamed, S., Gerson, U. & Morin, S. (2007). ITS2 sequences as barcodes for identifying and analyzing spider mites (Acari: Tetranychidae). *Experimental and Applied Acarology*, 41, 169-181.
- Bleicher, E. (1974). Ocorrência do acaro *Panonychus ulmi* (Koch, 1836) Tuttle & Baker (1966) no Estado de Santa Catarina. *Revista o Solo*, Piracicaba, 66(1), 64-64.
- Bolland, H. R., Guterrez, J. & Flechtmann, C. H. W. (1998). *World catalogue of the spider mite family (Acari: Tetranychidae), with references to taxonomy, synonymy, host plants and distribution*. Leyden, The Netherlands: Brill Academic Publishers. (392p).
- Bondar, G. (1930). Insetos daninhos e moléstias dos feijões na Bahia. *Boletim do Laboratorio de Pathologia Vegetal*, 9, 1-83.
- Bondar, G. (1938). Notas entomológicas de Bahia III. *Revista de Entomologia, Brasil*, 9(3-4), 441-445.
- Bonizzoni, M., Zheng, L., Guglielmino, C. R., Haymer, D. S., Gasperi, G., Gomulski, L. M. & Malacrida, A. R. (2001). Microsatellite analysis of medfly bioinfestations in California. *Molecular Ecology*, 10, 2515-2524.
- Botton, M., Scoz, P. L. & Arioli, C. J. (2002). IPM on peaches in Brazil: actual situation and future trends. *Acta Horticulturae*, 592, 655-658.
- Boudreaux, H. B. (1956). Revision of the two spotted spider mite (Acarina, Tetranychidae) complex, *Tetranychus telarius* (Linnaeus). *Annals of the Entomological Society of America*, 49, 43-49.
- Boudreaux, I. B. & Dosse, G. (1963) The usefulness of new taxonomic characters in females of the genus *Tetranychus* Dufour (Acari: Tetranyvhidae). *Acarologia*, 5, 13-33.
- Boudreaux, I. B. & Dosse, G. (1963). Concerning the names of some common spider mites. *Advances in Acarology*, 1, 350-364.
- Bridge, P. D., Spooner, B. M. & Panchal, G. (2003). On the unreliability of published DNA sequences. *New Phytologist*, 160, 43-48.
- Brower, A. V. Z., De Salle, R. & Vogler, A. (1996). Gene trees, species trees, and systematics: a cladistic perspective. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 27, 423-450.

- Bull, V., Beltran, M., Jiggins, C. D., McMillan, W. O. , Bermingham, E. & Mallet, J. (2006). Polyphyly and gene flow between non-sibling *Heliconius* species. *Bmc Biology* 4(11), 17p.
- Bund, C. F.& Helle, W. (1960). Investigations on the *Tetranychus urticae* complex in North West Europe. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 3,142-156.
- Bush, G. L. (1975). Modes of animal speciation. *Annual Review Ecological System*, 6, 339–357.
- Caceres, S. & Childers, C.C. (1991). Biology and life tables of *Galendromus helveolus* (Acari: Phytoseiidae) on Florida *Citrus*. *Environmental Entomology*, 20(1), 224-229.
- Caesar, R. M., Sörensson, M. & Cognato, A. (2006). Integrating DNA data and traditional taxonomy to streamline biodiversity assessment: an example from edaphic beetles in Klamath ecoregion, California, USA. *Diversity and Distributions*, 12,483-489.
- Carbonnelle, S., Hance, T., Migeon, A., Baret, P., Cros-Arteil, S. & Navajas, M. (2007). Microsatellite markers reveal spatial genetic structure of *Tetranychus urticae* (Acari : Tetranychidae) populations along a latitudinal gradient in Europe. *Experimental & applied Acarology*, 41, 225-241.
- Carmona, M. M. & Dias, J. C. S. (1980). O complexo Acarina nas culturas portuguesas. In *Congresso Português de Fitiatria e Fitofarmacologia*, 2, Lisboa, Portugal, December 1980(pp. 97-115).
- Chagas, C.M., Rossetti, V., Colariccio, A., Lovisolo, O., Kitajima, E.W. & Childers, C.C. (2001). *Brevipalpus* mites (Acari: Tenuipalpidae) as vectors of plant viruses. In R.B. Halliday, D. E. Walter, H. C. Proctor, R. A. Norton & M. J. Colloff (Eds) *Acarology: Proceedings of the 10th International Congress*, (pp. 369-375). Melbourne: CSIRO Publishing.
- Chiavegato, L. G., Mischán, M. M. & Cotas, M. P. (1983). Resistência do ácaro rajado *Tetranychus (T.) urticae* (Koch, 1836) (Acari: Tetranychidae) proveniente de diferentes regiões algodoeiras aos acaricidas. *Científica*, 11(1), 57-62.

- Childers, C. C., Kitajima, E. W., Welbourn, W. C., Rivera, C. & Ochoa, R. (2001). *Brevipalpus* mites on citrus and their status as vectors of *Citrus* leproses. *Manejo Integrado de Plagas*, 60, 66-70.
- Collins, F. H. & Paskewitz, S. M. (1996). A review of the use of ribosomal DNA (rDNA) to differentiate among cryptic *Anopheles* species. *Insect Molecular Biology*, 5, 1-9.
- Crandall, K.A. & Templeton, A.R. (1996). Applications of intraspecific phylogenetics. In P. H. Harvey (Org.) *New uses for new phylogenies* (p.81-99). Oxford: Oxford University Press.
- Cranham, J. E. Hop. (1985). Hop. In W. Helle & M. W. Sabelis (Eds) *Spider mites: their biology, natural enemies and control: World Crop Pests*, v. 1B, cap. 3.2.10 (pp. 367-370). Amsterdam, The Netherlands: Elsevier Science Publisher.
- Cranham, J. E. & Helle, W. (1985). Pesticide resistance in Tetranychidae. In W. Helle & M. W. Sabelis (Eds.). *Spider mites: their biology, natural enemies and control. World Crop Pests*, v. 1B, cap. 3.4 (pp. 405-421). Amsterdam, The Netherlands: Elsevier Science Publisher.
- Cruickshank, R. H. (2002). Molecular markers for the phylogenetics of mites and ticks. *Systematic and Applied Acarology*, 7, 3-14.
- Daud, R. D. & Feres, R. J. F. (2005). Diversidade e flutuação populacional de ácaros (Acari) em *Mabea fistulifera* Mart. (Euphorbiaceae) de dois fragmentos de mata estacional semidecídua em São José do Rio Preto, SP. *Neotropical Entomology*, 34(2), 191-201.
- Davis, J. J. (1968). Studies of Queensland Tetranychidae. 3. Records of the genus *Tetranychus*. *Queensland Journal of Agricultural & Animal Sciences*, 25, 27-67.
- De Boer, R. (1985). Reproductive barriers. In W. Helle & M. W. Sabelis (Eds) *Spider mites: their biology, natural enemies and control: World Crop Pests*, v. 1B, (pp. 193-200). Amsterdam, The Netherlands: Elsevier Science Publisher.

- De Leon, D. (1957). Two new *Eotetranychus* and a new *Oligonychus* from Southern Florida (Acarina: Tetranychidae). *Florida Entomologist*, 40(3), 111-113.
- Decroocq, V., Favé, M. G., Hagen, L., Bordenave, L. & Decroocq, S. (2003). Development and transferability of apricot and grape EST microsatellite markers across taxa. *Theoretical and Applied genetics*, 106(5), 912-922.
- Dennehy, T. J., Granett, J, Leigh, T. F. & Colvin, A. (1987). Laboratory and field investigations of spider mite (Acari: Tetranychidae) resistance to the selective acaricide propargite. *Journal of Economic Entomology*, 80(3), 565-574.
- Després, L. Kruger, F. J., Imbert-Establet, D. & Adamson, M. L. ITS2 ribosomal RNA indicates *Schistosoma hippopotami* is a distinct species. *International Journal for Parasitology*, 25,(2), 1509-1514.
- DeSalle, R., Egan, M. G. & Siddall, M. 2005 The unholy trinity: taxonomy, species delimitation and DNA barcoding. *Philosophical Transactions. of the Royal Society. Of London. B.* 360,1905-1916.
- Diéguez-Uribeondo, J., Fregeneda-Grandes, J. M., Cerenius, L., Pérez-Iñiesta, E., Aller-Gancedo, J. M. , Tellería, M. T., Söderhäll, K. & Martín, M. P. (2007). Re-evaluation of the enigmatic species complex *Saprolegnia diclina* - *Saprolegnia parasitica* based on morphological, physiological and molecular data. *Fungal Genetics and Biology*, 44, 585-601.
- Dong, H., Zhang, W., Yang, S. & Yang, Y. (1997). Fingerprints of four species of spider mites (Acari: Tetranychidae) detected by RAPD. *Systematic and Applied Acarology*, 2, 47-50.
- Doreste, E. (1967). Primera lista de acaros de de importancia agricola en Venezuela. Maracay, *Agronomia Tropical* , 18(4), 449-460.
- Dupont, L. M. (1979). On gene flow between *Tetranychus urticae* Koch, 1836 and *Tetranychus cinnabarinus* (Boisduval) Boudreaux, 1956 (Acari: Tetranychidae): synonymy between the two species. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 25,; 97-303.

- Edge, V. E. & James, D. G. (1986). Organo-tin resistance in two-spotted spider mite, *Tetranychus urticae* Koch (Acarina: Tetranychidae) in Australia. *Journal of Economic Entomology*, 79(6), 1477-1483.
- Ehara, S. & Yamaguchi, K. (2001). Discovery of *Tetranychus neocaledonicus* André (Acari: Tetranychidae) from Amami-Oshima Island, Japan. *Plant Protection*, 55, 268-272.
- Ehara, S. (1956). Notes on some tetranychid mites of Japan. *Japanese Journal of Applied Zoology*, 21(4), 139-147.
- Ehara, S. (1999). Revision of the Spider Mite Family Tetranychidae of Japan (Acari, Prostigmata). *Species Divers*, 4, 63-141.
- Excoffier, L., Laval, G. & Schneider, S. (2005). Arlequin ver. 3.0: An integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary Bioinformatics Online* 1:47-50.
- Excoffier, L., Smouse, P. & Quattro, J. M. (1992). Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: Application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics* 131,479-491.
- FAO (1997). Report of the 29th Session of the FAO Conference. In *Revised International Plant Crop Convention, Rome, Italy, November 7-18, 1997*.
- FAO (2004). International Standards for Phytosanitary Measures. Pest risk analysis for quarantine pests, including analysis of environmental risks and living modified organisms. In *Secretariat of the International Plant Protection Convention ISPM n° 11., Rome, Italy. 2004(38p)*. Food and Agriculture Organization of the United Nations.
- Fairley, T. L., Kilpatrick, C. W. & Conn, J. E. (2005). Intragenomic heterogeneity of internal transcribed spacer rDNA in neotropical malaria vector *Anopheles aquasalis* (Diptera : Culicidae). *Journal of Medical Entomology*, 42, 795-800.
- Felsenstein J (1985) Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. *Evolution* 39:783-791.
- Feres, R. J. F. & Flechtmann, C. H. W. (1986). Nova espécie de *Oligonychus* Berlese (Acari, Tetranychidae) da região de Botucatu, SP. *Revista Brasileira de Entomologia, São Paulo*, 30(1), 163-166.

- Feres, R. J. F. & Flechtmann, C. H. W. (1988). *Aponychus chiavegato* n.sp. collected From *Citrus* sp. (Rutaceae) in São Paulo, Brazil (Acari, Tetranychidae, Eurytetranychini). *Revista Brasileira de Biologia, São Paulo*, 48(4), 959-964.
- Feres, R. J. F. & Flechtmann, C. H. W. (1995). Mites (Acari) associated with bamboo (*Bambusa* sp., *Poaceae*) in a woody area from Northwestern São Paulo State, Brazil. . *Revista Brasileira de Zoologia, Curitiba*, 12(3), 533-546.
- Feres, R. J. F. & Flechtmann, C. H. W. (1995a). A new *Oligonychus* and description of the female allotype of *O. psidium* Estebanes & Baker (Acari: Tetranychidae) from *Qualea grandiflora* Mart. (Vochysiaceae) in northwestern São Paulo, Brazil. *Revista Brasileira de Zoologia, Curitiba*, 12(3), 529-532.
- Feres, R. J. F. & Flechtmann, C. H. W. (1995b). *Sonotetranychus angiopenis* n.sp. (Acari: Tetranychidae) from *Bauhinia* sp. (Fabaceae) in northwestern São Paulo State, Brazil. *International Journal of Acarology*, 21,(2), 89-91.
- Feres, R. J. F. & Flechtmann, C.H.W. (1986a). Duas novas espécies de *Tetranychus* Dufour (Acari, Tetranychidae) dos Estados de São Paulo e Rio de Janeiro. *Revista Brasileira de Biologia, São Paulo*, v. 46(2), 371-376.
- Feres, R. J. F. (1986). Dois Novos *Eotetranychus* (Acari, Tetranychidae) do Estado de São Paulo. *Revista Brasileira de Biologia, São Paulo*, 46(2), 365-369.
- Feres, R. J. F. (1992). *Allonychus brevipenis*, a new species from *Triplaris surinamensis* Cham. in Brazil with a new host records for *A. brasiliensis* (McGregor) and *A. reisi* Paschoal (Acari: Tetranychidae). *International Journal of Acarology*, 18(4), 299-301.
- Feres, R. J. F., Lofego, A. C. & Oliveira, A. R. (2005). Ácaros plantícolas (Acari) da "Estação Ecológica do Noroeste Paulista", Estado de São Paulo, Brasil. *Biota Neotropica*, 5(1), 1-14.
- Ferguson, G. (2008). Combined use of predatory mites for biological control of *Tetranychus urticae* (Acari: tetranychidae) in commercial greenhouse cucumber. *Bulletin OIL/SROP*, 32, 59-62.

- Ferla, J. N., Marchetti, M. A. & Gonçalves D. (2007). Ácaros predadores (Acari) associados à cultura do morango (*Fragaria* sp., Rosaceae) em plantas próximas no Estado do Rio Grande do Sul. *Biota Neotropica*, 7(2), 103-110.
- Ferla, N. J. & Botton, M. (2008). Ocorrência do ácaro vermelho europeu associado à cultura da videira no Rio Grande do Sul, Brasil. *Ciência Rural*, 38, 25-35.
- Ferla, N. J. (2004). Ácaros de importância para a região do Sul do Brasil. In *Anais do 20º Congresso Brasileiro de Entomologia, Resumos, Gramado, Brasil, September 5-10, 2004*(p.154). Sociedade Entomológica do Brasil.
- Ferreira, D. N. M. (1997). *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)*. Dissertação Mestrado. Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1997(300p).
- Ferreira, D. N. M. & Flechtmann, C. H. W. (1997). Two new phytophagous mites (Acari: Tetranychidae, Eriophyidae) from *Arachis pintoi* from Brazil.. *Systematic and Applied Acarology*, 2, 181-188.
- Flechtmann, C. H. W. (1967). *Contribuição para o conhecimento dos ácaros de plantas de algumas regiões do estado de São Paulo*. Tese (Doutorado). Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo. Piracicaba, 1967.(47p.).
- Flechtmann, C. H. W. (1967a). Ácaros encontrados sobre maçãs de procedência Argentina. *Anais da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"*, Piracicaba, 24: 83-85.
- Flechtmann, C. H. W. (1967b). New Tetranychidae (Acarina) from Brazil. *Anais Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"*, Piracicaba, 24, 323-331.
- Flechtmann, C. H. W. (1972). *Tetranychus (T.) urticae* Koch. 1836 (Acari) praga severa de orquídeas (*Catasetum* sp.) em ripados. *Revista de Agricultura*, Piracicaba, 47(2), 70-70.

- Flechte mann, C. H. W. (1976). A report on the Tetranychidae (Acari) of Brazil: an emendation. *Revista Brasileira de Entomologia, São Paulo*, 20(2), 115-116.
- Flechte mann, C. H. W. (1981). A small collection of spider mites from Jaguanum Island, Rio de Janeiro, Brazil, with description of *Aponychus insularis* (Prostigmata: Tetranychidae). *International Journal of Acarology*, 7(1-4), 87-90.
- Flechte mann, C. H. W. (1985). *Ácaros de importância agrícola*. São Paulo: Nobel (189p).
- Flechte mann, C. H. W. (2004). Two new plant feeding mites from *Brachiaria ruziziensis* in citrus groves in São Paulo, Brazil and new distribution records of other plant mites in Brazil. *Zootaxa*, 708, 1-11.
- Flechte mann, C. H. W. & Baker, E. W. (1970). A Preliminary report on the Tetranychidae (Acarina) of Brazil.. *Annals of the Entomological Society of America*, 63(1), 156-163.
- Flechte mann, C. H. W. & Baker, E. W. (1975). A report on the Tetranychidae (Acari) of Brazil. *Revista Brasileira de Entomologia, São Paulo*, 19(3), 111-122.
- Flechte mann, C. H. W. & Bastos, J. A. M.(1972). Ácaros Tetranychoides do Estado do Ceará, Brasil. *Ciência Agronômica, Fortaleza*, 2(2), 83-90.
- Flexner, J. L., Westigard, P. H. & Croft, B. A. (1988). Field reversion of organotin resistance in twospotted spider mite following relaxation of selection pressure. *Journal of Economic Entomology*, 81, 996-1002.
- Flores, E. C. H. (2001). *Estabilidade, seleção e padrão de herança da resistência do ácaro rajado, Tetranychus uricae Koch (Acari: Tetranychidae), ao Abamectin* (2001). Tese Doutorado. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Instituto de Biociências. Porto Alegre, 2001(94p).
- Foott, W. H. (1962). Competition between two species of mites. I. Experimental results. *Canadian Entomologist*. 94, 365-375.
- Foott, W. H. (1963). Competition between two species of mites. II. Factors influencing intensity. *Canadian Entomologist* 95, 45-57.

- Foster, G. N. & Barker, J. (1978). A new biotype of red spider mite (*Tetranychus urticae* Koch) causing typical damage to tomatoes. *Plant Pathology*, 24, 47-48.
- Fournier, D., Bride, J.M. & Navajas, M. 1994. Mitochondrial DNA from a spider mite: isolation, restriction map and partial sequence of the cytochrome oxidase subunit I gene. *Genetica*, 94: 73-75.
- Furtado, I. P., Moraes, G. J. de, Kreiter, S. & Knapp. M. (2006). Search for effective natural enemies of *Tetranychus evansi* in south and southeast Brazil. *Experimental & Applied Acarology*, 40 (3-4), 157-174.
- Futuyma, D. J. (1995). *Biologia evolutiva*. 2nd edn. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética. (630 p).
- Gallo, D., Nakano, O, Silveira Neto, S., Baptista, G. C. de, Carvalho, R. P. L., Berti Filho, E., Parra, J. R. P., Zucchi, R. A., Alves, S. B., Vendramim, J. D., Marchini, L. C., Lopes, J. R. S. & Omotto, C. (2002). *Manual de entomologia agrícola*. Piracicaba: FEALQ. (920p).
- Garrett, L. E. & Haramoto, F. H. (1967). A catalog of Hawaiian Acarina. *Proceedings of the Hawaiian Entomological Society*, 19(3), 381-414.
- Garros, C., Van Nguyen, C. , Trung, H. , Van Bortel, W. , Coosemans, M. & Manguin, S. (2008). Distribution of *Anopheles* in Vietnam, with particular attention to malaria vectors of the *Anopheles minimus* complex. *Malaria Journal*, 7, 11p.
- Girolami, V. & Mozzi, A. (1983). Distribution, economic threshold and sampling methods of *Panonychus ulmi* (Koch). In R. Cavalloro (Ed) *Statistical and mathematical methods in population dynamics and pest control*. Proceedings of meeting of the EC Experts' Group, Parma, Italy, October, 26-28 1983(pp. 90-101). Published for the Commission of the European communities by A. A. Balkema, Rotterdam, Boston.
- Goka, K. & Takafuji, A. (1997). Identification among seven species of spider mites (*Tetranychus*) (Acari: Tetranychidae) based on enzyme differentiation detected by electrophoreses. *Applied Entomology and Zoology*, 32, 127–134.

- Goka, K., Takafuji A., Toda, S. & Hamamura, T. (1996). Genetic distinctness between two forms of *Tetranychus urticae* Koch (Acari: Tetranychidae) detect by eletrophoresis. *Experimental and Applied Acarology*, 20, 683-693.
- Gonçalves, M. I. F., Maluf, W. R., Gomes, L. A. A. & Barbosa, L. V. (1998). Variation of 2-Tridecanone level in tomato plant leaflets and resistance to two mite species (*Tetranychus* sp.). *Euphytica*, 104, 33–38.
- Gotoh, T. & Shida, T. (2007). Life cycles and interactions in spider mites (Acari: Tetranychidae) on dwarf bamboo, *Sasa senanensis* (F. & S.) (Poaceae), in Japan. *International Journal of Acarology*, 33(3), 259-273.
- Gotoh, T., Bruin, J., Sabelis, M. W. & Menken, S. (1993). Host race formation in *Tetranychus urticae*: genetic differentiation, host plant preference, and mate choice in a tomato and a cucumber strain. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 68, 171-178.
- Gotoh, T. & Tokioka, T. (1996). Genetic compatibility among diapausing red, non-diapausing red and diapausing green forms of the two-spotted spider mite, *Tetranychus urticae* KOCH (Acari : Tetranychidae). *Japan entomology*, 64, 215-225.
- Gotoh, T., Gutierrez, J. & Navajs, M. (1998). Molecular comparison of sibling species *Tetranychus pueraricola* Ehara & Gotoh and *T. Urticae* Koch (Acari: Tetranychidae). *Entomological Science*, 1(1),55-57.
- Grafton-Cardwell, E. E., Granett, J. & Leigh, T. F. (1987). Spider mite species (Acari: Tetranychidae) response to propargite basis for an acaricide resistance management program. *Journal of Economic Entomology*, 80(3), 579-587.
- Greenstone, M. H. (2006). Molecular methods for assessing insect parasitism. *Bulletin of Entomological Research*, 96, 1-13.
- Guedes, J. V. C., Navia, D., Lofego, A. C. & Dequech, S. T. B. (2007). Ácaros associados à cultrura da soja no Rio Grande do Sul. *Neotropical Entomology*, 36(2), 288-293.

- Gupta, S. K. & Gupta, Y. N. (1994). A taxonomic review of Indian Tetranychidae (Acari: Prostigmata) with description of new species, redescriptions of known species and keys to genera and species. *Memoirs of the Zoological Survey of India*, 18(1), 1-196.
- Gupta, S. K. (1976). Contribution to our knowledge of tetranychid mites (Acarina) with descriptions of three new species from India. *Oriental Insects*, 10 (3), 327-351.
- Gupta, S. K. (1992). Arachnida: plant mites (Acari). In A. K. Ghosh (Ed.) *Fauna of West Bengal, (Arachnida and Acari) Part 3* (61-211). Calcutta, India: Zoological Survey of India.
- Gutierrez, J. & Schicha, E. (1983). The spider mite family Tetranychidae (Acari) in New South Wales. *International Journal of Acarology*, 9 (3), 99-116.
- Halbert, S. E. (1999). Bureau of Entomology, Nematology & Plant Pathology - Entomology Section. Florida Department of Agriculture and Consumer Services, Division of Plant Industry. *Tri-ology*, 8(2). Available via: <http://www.doacs.state.fl.us/pi/enpp/triology.html>. Last access: 20/02/2009.
- Hall, T. A. (1999). BIOEDIT: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series*, 41,95-98.
- Harvey, P.H. & Nee, S. (1996). What this book is about. In Harvey, P.H. (Org.) *New uses for new phylogenies* (pp.1-11). Oxford, UK: Oxford University Press.
- Hatzinikolis, E. N. (1969). Preliminary notes on Tetranychoid and Eriophiid mites infesting cultivated plants in Greece. *Proceedings of the 2nd International Congress of Acarology*, 161-167.
- Hawksworth, D. L. (2004). "Misidentification" in fungal DNA sequence databanks. *New Phytologist*, 161, 13-14.
- Helle, W. & Pijnacker, L. P. (1985). Parthenogenesis, chromosomes and sex. In W. Helle & M. W. Sabelis (Eds) *Spider mites: their biology, natural enemies and control. World Crop Pests*, vol. 1A, cap.1.2, (pp.129-139). Amsterdam, The Netherlands: Elsevier Science Publisher.

- Helle, W. & Sabelis, M. W. (1985). *Spider mites: their biology, natural enemies and control*. *World Crop Pests*. vol. 1A & 1B, Amsterdam, The Netherlands: Elsevier Science Publishers.
- Hence, T., Neuberg, P. & Noel-Lastelle, C. (1998). The use of fecundity, lobe biometry and the RAPD-PCR technique in order to compare strains of *Tetranychus* sp. *Experimental and Applied Acarology*, 22, 649-666.
- Hebert, P. D. N. & Gregory, T. R. (2005). The promise of DNA barcoding for taxonomy. *Systematic Biology*, 54, 852-859.
- Heungens, A. & Tirry, L. (2001). Chemical control of the two spotted spider mite *Tetranychus urticae* Koch on *Hedera helix* 'Anneborgh'. *Parasitica*, 57(4), 249-253.
- Hillis, D. M. & Dixon, M.T. (1991). Ribosomal DNA: molecular evolution and phylogenetic inference. *The Quarterly Review of Biology*, 66(4), 411-453.
- Hills M., Witsebboer H., Zabeau M., Vos P., Kesseli R. & Michelmore R. (1996). PCR-based fingerprinting using AFLPs as a tool for studying genetic relationships in *Lactuca* spp. *Theoretical and Applied Genetics* 93, 1202–1210.
- Hinomoto, N. & Takafuji, A. (2001). Genetic diversity and phylogeny of the Kanzawa spider mite, *Tetranychus kanzawai*, in Japan. *Experimental and Applied Acarology*, 25, 355-370.
- Hinomoto, N. & Takafuji, A. (2004). Evaluation of Mitochondrial Cytochrome Oxidase Subunit I Sequences in *Tetranychus kanzawai* Kishida (Acari: Tetranychidae) for Phylogeographic Studies. *Journal of the Acarological Society of Japan*, 13(1), 47-55.
- Hinomoto, N., Dinh Pha, T., Anh Tuan, P., Thi Bao Ngoc, L., Tajima, R., Ohashi, K., Osakabe, M. & Takafuji, A. (2007). Identification of spider mites (Acari: Tetranychidae) by DNA sequences: a case study in Northern Vietnam. *International Journal of Acarology*. 33, 53-60.

- Hinomoto, N., Osakabe, M., Gotoh, T. & Takafuji, A. (2001). Phylogenetic analysis of green and red forms of the two-spotted spider mite, *Tetranychus urticae* Koch (Acari: Tetranychidae), in Japan, based on mitochondrial cytochrome oxidase subunit I sequences. *Applied Entomology and Zoology*, 36, 459-464.
- Holst-Jensen, A., Vrålstad T.& Schumacher, T. (2004). On reliability. *New Phytologist*, 161, 11-13.
- Hirst, S. (1924). 4. Descriptions of new Acari, mainly parasitic on rodents. *Proceedings of the Zoological Society of London*, 1924, 49-69.
- Hirst, S. (1926). Descriptions of new mites including four new species of red spider. *Proceedings of the Zoological Society of London*, 1926, 825-841.
- Hluchy, M. & Pospisil, Z. (1996). Damage potential of the phytophagous Eriophyidae and Tetranychidae mites (Acari: Tetranychidae: Prostigmata) in grapevine. *Ochrana Roslin*, 24(3/4), 273-285, 1991. Resumo em CAB Abstracts on CD-ROM, 1996-97.
- Ho, C. C., Lo, K. C. & Chen, W. H. (1997). Spider mite (Acari: Tetranychidae) on various crops in Taiwan. *Journal of Agricultural Research of China*, 46 (4), 333-346.
- Holder, M. & Lewis, P. O. (2003). Phylogeny estimation: traditional and Bayesian approaches. *Nature Reviews*, 4, 275-284.
- Hoy, M. A. (1985). Recent advances in genetics and genetic improvement of the Phytoseiidae. *Annual Review Entomology*, 30, 345-370.
- Hoy, M. A. (1994). *Insect molecular genetics: an introduction to principles and applications*. San Diego: Academic Press. (546p).
- Huelsenbeck, J. P., Ronquist, F., Nielsen, R. & Bollback, J.P. (2001). Bayesian inference of phylogeny and its impact on evolutionary biology. *Science*, 294, 2310-2313.
- Hugenholtz, P. & Huber, T. (2003). Chimeric 16S rDNA sequences of diverse origin are accumulating in the public databases. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 53, 289-293.

- Hurtado, M. A.; Ansaloni, T.; Cros-Arteil, S., & Navajas, M.. (2008) Sequence analysis of the ribosomal internal transcribed spacers region in spider mites (Prostigmata: Tetranychidae) occurring in citrus orchards in Eastern Spain: use for species discrimination. *Annals of Applied Biology*, 153(2), 167-174
- Jacas, J. A. & Garcia, M. (2001). Side-effects of pesticides on selected natural enemies occurring in *Citrus* in Spain. *Bulletin OILB SROP*, 24(4), 103-112.
- Jeppson, L.R., Keifer, H.H. & Baker, E.W. (1975). *Mites injurious to economic plants*. Berkeley: University of California Press. (614p).
- Kaliszewski, M. J., Tobolewski, J., Seyoum, S., Chojnacki, I., Kaliszewska, M. M., Stanton, D. J. & Colwell, R. K. (1992). The polymerase chain reaction and sequencing of mite DNA. *International Journal of Acarology*, 18(3), 231-239.
- Kassemeyer, H. H. (1996). Integrated Management of grapevine diseases and pests. In *Brighton Crop Protection Conference, Pests and Diseases, Proceedings 3B-1, Brighton, UK, November 18-21, 1996* (pp.119-124). The British Crop Protection Council.
- Khalequzzaman, M., Mondal, M., Fazlul Haque, M. & Sajedul Karim, M. (2007). Predatory efficacy of *Phytoseiulus persimilis* Athias-Henriot (Acari: Phytoseiidae) on the two spotted spider mite *Tetranychus urticae* (Acari: Tetranychidae). *Journal of Biosciences*, 15, 127-132.
- Kimura M (1980) A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution* 16,111-120.
- Kimura, Y., Ishiguri, Y. & Kushita, T. (2005). Evaluation of acaricides against the two-spotted spider mite, *Tetranychus urticae* and the European red mite, *Panonychus ulmi*, from apple orchards in Aomori Prefecture. *Annual Report of the Society of Plant Protection of North Japan*, 56, 194-197.
- Knapp, M., Wagener, B. & Navajas, M. (2003). 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*, 11, 300-304.

- Krantz, G. W. (1962). *Monoceronychus boreus*, a new species of spider mite from Oregon. *Proceedings of the Entomological Society of Washington*, 64: 97-99.
- Krzywinski, J. & Besansky, N. J. (2003). Molecular systematics of *Anopheles*: from subgenera to subpopulations. *Annual Review of Entomology*, 48,111-139.
- Kumar, P. L., Fenton, B. & Jones, A. T. (1999). Identification of *Cecidophyopsis* mites (Acari : Eriophyidae) based on variable simple sequence repeats of ribosomal DNA internal transcribed spacer-1 sequences via multiplex PCR. *Insect Molecular Biology*, 8,(3), 347-357.
- Landeros, J., AIL, C., Badiil, M. H., Guerrero, E. & Cerna, E. (2006). Susceptibility and mechanism of resistance of *Tetranychus urticae* (Tetranychidae) populations from greenhouse roses. In *Program Book and Abstract, 12th International Congress of Acarology, Amsterdam, The Netherlands, Jan Bruin (Ed.), August 21-26, 2006* (p.106).
- Lee, J. H., Koh, S. H. & Jung, C. (2006). Acaricide resistance of *Tetranychus urticae* in apple orchards in Korea: implications for an acaricide resistance management. . In *Program Book and Abstract, 12th International Congress of Acarology, Amsterdam, The Netherlands, Jan Bruin (Ed.), August 21-26, 2006* (p.108).
- Lindquist, E. E. & Amrine Junior, J. W. (1996). Systematics, diagnoses for major taxa, and keys to families and genera with species on plants of economic importance. In E. E. Lindquist, M. W. Sabelis & J. Bruin (Org.). *Eriophyoid mites: their biology, natural enemies and control. World Crop Pests*, vol. 1A, cap. 1.1.2, (p.33-88). Amsterdam, The Netherlands: Elsevier Science Publisher.
- Livshits, I. Z. & Salinas-Croche. A. (1968). *Preliminares acerca de los acaros "Tetranicos" de Cuba*. Cuba, La Habana: Centro National Fitosanid. (156p.)
- Lozier; J. D., Roderick, G. K., & Mills, N. (2008). Evolutionarily significant units in natural enemies: Identifying regional populations of *Aphidius transcaspicus* (Hymenoptera: Braconidae) for use in biological control of mealy plum aphid. *Biological Control*, 43,(3), 532-541.

- Luikart, G. & England, P. R. (1999). Statistical analysis of microsatellite DNA data. *Trends in Ecology and Evolution*, 14(7), 251-291.
- Malhotra, A. & Thorpe, R. S. (2004). A phylogeny of four mitochondrial gene regions suggests a revised taxonomy for Asian pitvipers (*Trimeresurus* and *Ovophis*). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 34, (2004),83–100.
- Malufi, J. R. T. (2000). A new climatic classification for the State of Rio Grande do Sul, Brazil. *Revista Brasileira de Agrometeorologia*, 8(1),141-150.
- Marchetti, M. M. & Ferla, N. J. (2004). Resposta funcional de *Phytoseilus macropilis* Banks a diferentes populações de *Tetranychus urticae* Koch (Acari: Phytoseiidae e Tetranychidae). In *Anais do 20º Congresso Brasileiro de Entomologia, Resumos, Gramado, Brasil, September 5-10, 2004*(p.175). Sociedade Entomológica do Brasil.
- Marchetti, M. M., Steffens, L. E. & Ferla, N. J. (2003). Flutuação populacional de ácaros (Acari) na cultura do morango no Estado do Rio Grande do Sul. In *Anais do 8º Simpósio de Controle Biológico, Ácaros, Resumos, São Pedro, Brasil, June 22-26* (p.176). Sociedade Entomológica do Brasil.
- Marrelli, M. T., Sallum, M. A. M. & Marinotti, O. (2006). The second internal transcribed spacer of nuclear ribosomal DNA as a tool for Latin American anopheline taxonomy - A critical review. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, 101, 817-832.
- Martinez, A. Z., Torre, E. P. de la & Garcia, S. A. (2004). Principales acaros detectados en la provincia de Villa Clara. *Fitosanidad*, 8(1), 3-17.
- McGregor, E. A. (1914). Four new tetranychids. *Annals of the Entomological Society of America*, 7, 354-364.
- McGregor, E. A. (1917). Description of seven new species of red spiders. *Proceedings of the United States National Museum*, 51: 581-590.
- McGregor, E. A. (1945). A new genus and species of tetranychid mite from California. *Proceedings of the Entomological Society of Washington*, 47(4), 100-102.
- McGregor, E. A. (1950). Mites of the family Tetranychidae. *American Midland Naturalist*, 44 (2), 257-420.

- McMurtry, J. A. (1985). Citrus. In W. Helle, M. W. Sabelis (Eds) *Spider mites: their biology, natural enemies and control. World Crop Pests*, v. 1A, cap. 3.2.7 (pp. 339-347). Amsterdam, The Netherlands: Elsevier Science Publisher.
- Meyer, M. K. P. S & Ryke, P. A. J. (1959). A revision of the spider mites (Acarina : Tetranychidae) of South Africa, with descriptions of a new genus and new species. *Journal of the Entomological Society of Southern Africa*, 22(2), 330-366.
- Meyer, M. K. P. S. (1974). A revision of the Tetranychidae of Africa (Acari) with a key to the genera of the world. Department of Agricultural Technical Services, Republic of South Africa. *Entomology Memoir*, 36, 1-291.
- Meyer, M. K. P. S. (1987). African Tetranychidae (Acari: Prostigmata) - with reference to the world genera. Department of Agriculture and Water Supply, Republic of South Africa. *Entomology Memoir*, 69, 1-175.
- Michigan State University (MSU) (2005) Database of Arthropods Resistant to Pesticides. Available via: www.cips.msu.edu/resistance/rmdb/index.html. Last access: November 2005.
- Migeon, A. & Franck Dorkeld. (2006). Spider Mites Web: a comprehensive database for the Tetranychidae. Available via: <http://www.montpellier.inra.fr/CBGP/spmweb>. Last up date: December 2007. Last access: April 2009.
- Miller, R. W., Croft, B. A. & Nelson, R. D. (1985). Effect of early season immigration on cyhexatin and fometanate resistance of *Tetranychus urticae* (Acari: Tetranychidae) on strawberry in central California. *Journal of Economic Entomology*, 78, 1379-1388.
- Minami, K. (1980). *O Tomateiro*. 2ª ed. Campinas: Fundação Cargill. (310p).
- Miranda, I., Linares, G. & Ramos, M. (2003). Application of the multiple correspondence analysis to the exploratory analysis of population data of the *Tetranychus urticae* (Koch) (Acari: Tetranychidae) and its predators. Influence of temperature, relative humidity and rainfalls. *Revista de Protección Vegetal*, 18(1), 42-48.

- Monteiro, L. B., Belli, L., Souza, A. de & Werner, A. L. (2002). Efeito do manejo de plantas daninhas sobre *Neosiulus californicus* (Acari: Phytoseiidae) em pomar de macieira. *Revista Brasileira de Fruticultura*, 24(3), 680-682.
- Moraes, G. J. de M. & Flechtmann, C. H. W. (2008). *Manual de acarologia – Acarologia básica e ácaros de plantas cultivadas no Brasil*. Holos Editora, Ribeirão Preto. 308p.
- Moraes, G. J. de M. & Flechtmann, C. H. W. (2008). *Manual de acarologia – Acarologia básica e ácaros de plantas cultivadas no Brasil*. Ribeirão Preto, São Paulo: Holos Editora, Ribeirão Preto. (308p).
- Moraes, G. J. de, Moreira, A. N. & Delalibera Jr., I. (1995). Growth of the mite *Mononychellus tanajoa* (Acari: Tetranychidae) on alternative plant hosts in northeastern Brazil. *Florida Entomologist*, 78(2), 350-354.
- Moraes, L. A. H. de & Braun, J. (2002). Criação artificial de ácaros predadores Phytoseiidae para o controle biológico de ácaros fitófagos do morangueiro (*Fragaria* sp.). *Horticultura Brasileira*, 20(3). CD-ROM.
- Moritz, C. & Hillis, D. M. (1996). Molecular Systematics: context and controversies. In D. M. Hillis, C. Moritz & B. K. Mable (Eds) *Molecular Systematics* 2nd ed. (pp. 1-13). Massachusetts: Sinauer Associates.
- Mozes-Koch, R. & Gerson, U. (1998). Separation of acarine species by enzymatic, immunological and molecular methods. *Systematic and Applied Acarology*, 3, 9-18.
- Navajas, M. & Roderick, G. K. (2008). Molecular diagnosis. In J. L. Capinera (Ed.) *Encyclopedia of Entomology* (p.191-196). Dordrecht, The Nederland: Springer.
- Navajas, M. (2001). Genetics markers and mite population biology. In R. B. Halliday, D. E. Walter, H. C. Proctor, R. A. Norton, M. J. Colloff (Eds) *Acarology Proceedings of the 10th International Congress. Melbourne, Australia, July 5-10, 2001* (p. 149-151). CSIRO Publishing.
- Navajas, M. & Boursot, P. (2003). 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*, 270, 124-27. Supplement.

- Navajas, M. & Fenton, B. (2000). The application of molecular markers in the study of diversity in acarology: a review. *Experimental and Applied Acarology*, 24, 751-774.
- Navajas, M. (1998). Host plant associations in the spider mite *Tetranychus urticae* (Acari: Tetranychidae): insights from molecular phylogeography. *Experimental and Applied Acarology*, 22, 201-214.
- Navajas, M., Cotton, D., Kreiter, S. & Gutierrez, J. (1992). Molecular approach in spider mites (Acari: Tetranychidae): preliminary data on ribosomal DNA sequences. *Experimental and Applied Acarology*, 15, 211-218.
- Navajas, M., Fournier, D., Lagnel, J., Gutierrez, J. & Boursot, P. (1996a). Mitochondrial *COI* sequences in mites: evidence for variation in base composition. *Insect Molecular Biology*, 5(4), 281-285.
- Navajas, M., Gutierrez, J. & Gotoh, T. (1997). Convergence of molecular and morphological data reveals phylogenetic information on *Tetranychus* species and allows the restoration of the genus *Amphitetranynchus* (Acari: Tetranychidae). *Bulletin of Entomological Research*, 87, 283-288.
- Navajas, M., Gutierrez, J., Bonato, O., Bolland, H. R. & Mapangou-Divassa, S. (1994). Intraspecific diversity of the cassava green mite *Mononychellus progressivus* using comparisons of mitochondrial and nuclear ribosomal DNA sequences and cross-breeding. *Experimental and Applied Acarology*, 18, 351-360.
- Navajas, M., Gutierrez, J., Williams, M. & Gotoh, T. (2001). Synonymy between two spider mite species, *Tetranychus kanzawai* and *T. hydrangeae* (Acari: Tetranychidae), shown by ribosomal ITS2 sequences and cross-breeding experiments. *Bulletin of Entomological Research*, 91, 117-123.
- Navajas, M., Gutierrez, J., Lagnel, J. & Boursot, P. (1996). Mitochondrial cytochrome oxidase I in tetranychid mites: a comparison between molecular phylogeny and changes of morphological and life history traits. *Bulletin of Entomological Research*, 86, 407-417.

- Navajas, M., Lagnel, J., Fauvel, G. & Moraes, G. J. de (1999). Sequence variation of ribosomal Internal Transcribed Spacers (ITS) in commercially important Phytoseiidae mites. *Experimental and Applied Acarology*, 23, 851-859.
- Navajas, M., Lagnel, J., Gutierrez, J. & Boursot, P. (1998). Species-wide homogeneity of nuclear ribosomal ITS2 sequences in the spider mite *Tetranychus urticae* contrasts with extensive mitochondrial COI polymorphism. *Heredity*, 80(6), 742-752.
- Navajas, M., Perrot-Minnot, M. J., Langnel, J., Migeon, A., Bourse, T. & Cornuet, J. M. (2002). Genetic structure of a greenhouse population of the spider mite *Tetranychus urticae*: spatio-temporal analysis with microsatellite markers. *Insect Molecular Biology*, 11(2), 157-165.
- Navajas, M., Tsagkarakou, A., Lagnel, J. & Perrot-Minnot, M.J. (2000). Genetic differentiation in *Tetranychus urticae* (Acari: Tetranychidae): polymorphism, host races or sibling species? *Experimental and Applied Acarology*, 24, 365-376.
- Navia M. F., D. (2004). *Ácaros Eriophyoidea (Prostigmata) associados a palmeiras (Arecaceae), com ênfase no ácaro do coqueiro, Aceria guerreronis Keifer - espectro de hospedeiros e aspectos biogeográficos*. Tese (Doutorado). Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo. Piracicaba, 2004 (435p.).
- Navia, D. , Moraes, G. J., Roderick, G. & Navajas, M. (2005). The invasive coconut mite, *Aceria guerreronis* (Acari: Eriophyidae): origin and invasion sources inferred from mitochondrial (16S) and Ribosomal (ITS) sequences. *Bulletin of Entomological Research*, 95(6), 505-516.
- Navia, D., Flechtmann, C. H. W. & Moraes, G. J. (1998). Avaliação do risco de introdução de ácaros fitófagos associados à cultura da uva no Brasil. Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia (Publicação Técnica Embrapa). (51p.)

- Navia, D., Moraes, G. J. de & Flechtmann, C.H.W. (2007). Phytophagous mites as invasive alien species: quarantine procedures. In: Morales-Malacara JB, Behan-Pelletier V, Ueckermann E, Pérez TM, Estrada E, Gispert C, Badii M (Eds.). *Acarology: Proceedings of the XI International Congress*. Merida, México, pp: 307-316.).
- Neves, M. F. & Marino, M. K. (2002). Estudo da compatibilidade de cadeias integradas no Brasil: impacto das zonas de livre comércio – cadeia *Citrus*. Campinas: Instituto de Economia, Nett Femecau Unicamp 2002 (80p.). Available via www.mdic.gov.br Last access September 26, 2006.
- Nilsson, R. H., Ryberg, M., Kristiansson, E., Abarenkov, K., Larsson, K. H. & Kõljalg, U. (2006). Taxonomic Reliability of DNA Sequences in Public Sequence Databases: A Fungal Perspective. *PLoS ONE*, 1, e 59.
- Nishimura, S., Hinomoto, N. & Takafuji, A. (2007). The genetic variation among populations of *Tetranychus kanzaway* complex (Acari: Tetranychidae) indicating by using mitochondrial, ribosomal, and microsatellite DNA markers. *Journal of the Acarological Society of Japan*, 16 (2), 109-119.
- Noronha, A. C. S., Mota, A., Moraes, G. J. de & Coutinho, L. L. (2003). Caracterização molecular de populações de *Euseius citrifolius* Denmark & Muma e *Euseius concordis* (Chant) (Acari: Phytoseiidae) utilizando o seqüenciamento das regiões ITS1 e ITS2. *Neotropical entomology*, 32(4), 591-596.
- Oldfield, G. N. & Proeseler, G. (1996). Eriophyoid mites as vectors of plant pathogens. In E. E. Lindquist, M. W. Sabelis & J. Bruin (Org.) *Eriophyoid mites: their biology, natural enemies and control*. *World Crop Pests*, v. 1A (p.259-275). Amsterdam, The Netherlands: Elsevier Science Publisher.
- Oliveira, C. A. L. (1972). *Ação dos ácaros Polyphagotarsonemus latus (Banks, 1904) e Tetranychus (T.) urticae Koch, 1836 na depreciação quantitativa e qualitativa da produção algodoeira*. Tese Doutorado. Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo. Piracicaba (150p.).

- Oliveira, C. A. L. de & Calcanhoto, G. (1975). Ação do ácaro “rajado” *Tetranychus urticae* (Koch, 1836) na depreciação quantitativa da produção algodoeira. *O Biológico*, 41, 307-327.
- Oliveira, H., Janssen, A., Pallini, A., Venzon, M. & Duarte, V. (2007). A phytoseiid predator from the tropics as potencial biological control agent for the spider mite *Tetranychus urticae* Koch (Acari: Tetranychidae). *Biological Control*, 42(2), 105-109.
- Osakabe, Mh, Hirose, T. & Sato, M. (2002). Discrimination of four Japanese *Tetranychus* species (Acari: Tetranychidae) using PCR-RFLP of the inter-transcribed spacer region of nuclear ribosomal DNA. *Applied Entomology and Zoology*,. 37, 399–407.
- Papaionnaou-Souliotis, P., Ragusa Di Chiara, S. & Tsolakis, Ch. (1994). Phytophagous mites and their predators on cultivated plants in Greece during 1975-1990. *Annals of the Benaki Phytopathological Institute* 17, 35-87.
- Paschoal, A. D. (1970a). *Contribuição ao conhecimento da família Tetranychidae no Brasil (Arachnida : Acarina)*. Tese (Doutorado). Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo. Piracicaba, .(116p.).
- Paschoal, A. D.,(1970). New brazilian spider mites (Acarina: Tetranychidae). *Anais da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”*, 27:139-455.
- Perrot-Minnot, M. J. & Navajas, M. (1995). Pseudo-arrenotoky involves biparental inheritance of RAPD markers in males of the haplo-diploid mite *Typhlodromus pyri*. *Genome*, 38, 838-844.
- Polanco, C., Gonzalez, A. I., Fuente, A. & Dover, G. A. (1998). Multigene family of ribosomal DNA in *Drosophila melanogaster* reveals contrasting patterns of homogenisation for IGS and ITS spacer regions: a possible mechanism to resolve this paradox. *Genetics*, 149, 243-256.
- Poletti, M. Collette, L. de P. & Omoto, C. (2008). Compatibilidade de agrotóxicos com ácaros predadores *Neoseiulus californicus* (McGregor) e *Phytoseiulus macropolis* (Banks) (Acari: Phytoseiidae). *BioAssay*, 3(3), 1-14.

- Prasad, R. & Singh, J. (2007). Estimation of yield in okra caused by the red spider mite (*Tetranychus urticae* Koch) under influence of two different dates sowing. *Indian Journal of Entomology*, 69(2) 127-132.
- Pringle, K. L. (2001). Biological Control of Tetranychid mites in South African. In R. B. Halliday, D. E. Walter, H. C. Proctor, R. A. Norton & M. J. Colloff (Eds) *Acarology Proceedings of the 10th International Congress. Melbourne, Australia, July 5-10, 2001* (. p. 429-431). CSIRO Publishing.
- Pritchard, A. E. & Baker, E. W. (1955). A revision of the spider mite family Tetranychidae. *Memoirs Series, San Francisco, Pacific Coast Entomological Society*, 2, 472.
- Prokopy, R. J. & Croft, B. A. (1994). Apple insect pest management. In R. L. Metcalf & W. H. Luckmann (Eds) *Introduction to insect pest management* 3. ed., cap. 1B (pp. 543-585). New York: Willey Interscience.
- Quin, T.K. (1997). Population genetics of redlegged earth mites *Halotydeus destructor* and *H. anthropus* (Acarina: Penthaleidae) from Australia and/or South Africa. *Bulletin of Entomological Research*, 8, 289-298.
- Rabbinge, R. (1985). Aspects of damage assesment. In W. Helle & M. W. Sabelis (Eds) *Spider mites: their biology, natural enemies and control: World Crop Pests*, v. 1B, cap. 3.1 (pp. 261-270). Amsterdam, The Netherlands: Elsevier Science Publisher.
- Rahman, K. A. & Sapra, A. N. (1940). Mites of the family Tetranychidae from Lyallpur with descriptions of four new species. *Proceedings of the Indian Academy of Science, Ser. B*, 11, 17-196.
- Rajashekharappa, K. & Mallik, B. (2008). Estimation of loss caused due to spider mite, *Tetranychus urticae* koch (Acari: Tetranychidae) infestation on different varieties of carnation grown in polyhouse condition. *Environment and Ecology*, 26(1), 171-173.
- Rambier, A., (1958). Les tétranyques nuisibles à la vigne en France continentale. *Revue de Zoologie Agricole et Appliquée*, 1-3, 1-21.

- Ramos, M., Ramirez, A., Chico, R., Rodriguez, H. & Alvarez, C. D. (1988). Desarrollo y reproducción de *Polyphagotarsonemus latus* (Acariformes: Tarsonemidae) sobre naranjo Valencia y limón (verdadero) en relación con lima persa. *Revista de Protección Vegetal*, 3, 123-127.
- Raymond, M., & Rousset, F. (1995). An exact test for population differentiation. *Evolution* 49,1280-1283.
- Reeves, R. M. (1963). Tetranychidae infesting woody plants in New York State, and a life history study of the elm mite *Eotetranychus matthyssei* n. sp. Cornell University Agricultural Experimental Station, *Memoir*, 380. (99p.)
- Roderick, G. K. (1996). Geographic structure of insect populations: gene flow, phylogeography, and their uses. *Annual Review of Entomology*, 41,325-352.
- Ros, V. I. D. & Breeuwer, J. A. J. (2007). Spider mite (Acari: Tetranychidae) mitochondrial *COI* phylogeny reviewed: host plant relationships, phylogeography, reproductive parasites and barcoding. *Experimental and Applied Entomology*, 42,239-262.
- Ross, K. G., Shoemaker, D., Krieger, M. J. & Deheer, C. J. (1999). Assessing genetic structure with multiple classes of molecular markers: a case study involving the introduced fire ant *Solenopsis invicta*. *Molecular Biology and Evolution*, 16, 525-543.
- Rozas, J., Sánchez-DelBarrio, J. C., Messeguer, X. & Rozas, R. (2003). DnaSP, DNA polymorphism analyses by the coalescent and other methods. *Bioinformatics* 19, 2496-2497.
- Rowley, D. L., Coddington, J. A., Gates, M. W., Norrbom, A. L., Ochoa, R. A., Vandenberg, N. J. & Greenstone, M. H. (2007). Vouchering DNA-barcoded specimens: test of a nondestructive extraction protocol for terrestrial arthropods. *Molecular Ecology Notes*, 7,915-924.
- Ruedas, L. A. Salazar-Bravo, J., Dragoo, J. W. & Yates, T. L. (2000). The importance of being earnest: what, if anything, constitutes a "specimen examined?" *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 17,129-132.

- Saitou N & Nei M (1987) The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution* 4:406-425.
- Sances, F. V., Toscano, N. C, Lapre, L. F., Oatman, E. R. & Johnson, M. W. (1982). Spider mite can reduce strawberry yields. *California Agriculture*, 36,15-16.
- Sato, E. M., Silva, M. Z. da, Souza Filho, M. F. de, Matioli, A. L. & Raga, A. (2006). Management of *Tetranychus urticae* (Tetranychidae) in strawberry fields using *Neoseiulus californicus* (Phytoseiidae) and acaricides. In *Program Book and Abstract, 12th International Congress of Acarology, Amsterdam, The Netherlands, Jan Bruin (Ed.), August 21-26, 2006* (p.184).
- Sato, M. E., A., Souza Filho, M. S. de & Raga, A. (2002). Propargite resistance in *Tetranychus urticae* Koch (Acari: Tetranychidae) in the state of São Paulo, Brazil. *Arquivos do Instituto Biológico*, 69, 230-232. (Suplemento).
- Sato, M. E., Miyata, T., Silva, M. da, Raga, A. & Souza Filho, M. S. de (2004). Selections for fenpyroximate resistance and susceptibility, and inheritance, cross-resistance and stability of fenpyroximate resistance in *Tetranychus urticae* Koch (Acari: Tetranychidae). *Applied Entomology and Zoology*, 39, 293-302.
- Sato, M. E., Passerotti, C.M., Takematsu, A. P., Souza Filho, M. R., Potenza, M. R. & Sivieri, A. P. (2000). Resistência de *Tetranychus urticae* (Koch,1836) a acaricidas, em pessegueiro (*Prunus Persica* (L.) Batch) em Paranapanema e Jundiaí, SP. *Arquivos do Instituto Biológico*, 67(1), 117-123.
- Sato, M. E., Silva, M. Z. da, Cangani, K. G. & Raga, A. (2007). Seleções para resistência e suscetibilidade, detecção e monitoramento da resistência de *Tetranychus urticae* ao acaricida clorfenapir. *Bragantia*, 66(1), 89-95.
- Sato, M. E., Suplici Filho, N., Souza Filho, M. F. D. & Takematsu, A. P. (1994). Resistência do ácaro rajado, *Tetranychus urticae* (Koch, 1836) (Acari: Tetranychidae) a diversos acaricidas em morangueiro (*Fragaria sp.*) nos municípios de Atibaia e Piedade, SP. *Ecossistema*, 19, 40-46.

- Schnabel A., Nason, J. D. & Hamrick, J. L. (1998). Understanding the population structure of *Gleditsia triacanthos* L. Seed dispersal and variation in female reproductive success. *Molecular Ecology*, 7, 819-832.
- Schruff, G. A. (1985). Grape. . In W. Helle & M. W. Sabelis (Eds) *Spider mites: their biology, natural enemies and control: World Crop Pests*, v. 1B, cap. 3.1 (pp. 261-272). Amsterdam, The Netherlands: Elsevier Science Publisher.
- Silva, F. R. DA, Vasconcelos, G. J. N., Gondin, M. G. C. & Oliveira, J. V. de (2002). Compatibilidade reprodutiva entre duas populações identificadas como *Tetranychus urticae* Koch (Acari: Tetranychidae). In *Anais do Congresso de Iniciação Científica da Universidade Federal Rural de Pernambuco*, Recife: Imprensa Universitária, 2002. CD-ROM.
- Silva, P. (1954). Um novo ácaro nocivo ao tomateiro na Bahia. *Boletim do Instituto Biológica da Bahia*, 1(1), 1-20.
- Skorupska, A. & Boczek, J. (1985). Effect of the host plants change on the reproduction of hawthorn spider mite (*Tetranychus viennensis* Zacher). *Prace Naukowe Instytutu Ochrony Roslin*, 27, 5-22.
- Sollignac, M., Periquet, G., Anxolabehere, D. & Petit, C. (1995). Phylogénies et classifications. In M. Sollignac & coll *Génétique et évolution: l'espèce, l'évolution moléculaire*. Tome 2 (pp.301-355). Paris: Hermann. (367p)
- Soreng, R. J., Davidse, G. P., Peterson, M., Zuloaga, F. O., Judziewicz, E. J., Filgueiras, T. S. & Morrone, O. (2000). Catalogue of new world grasses (Poaceae). Available via: http://mobot.mobot.org/cgi-bin/search_vast. Last update: January 2009. Last access: January 2009.
- Souza Filho, M. F. de, Suplicy Filho, N., Sato, M. E. & Takematsu, A. P. (1994). Suscetibilidade do ácaro rajado proveniente de videiras de Pilar do Sul, SP, a diversos acaricidas. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 29(8), 1187-1192.
- Sperling, F. A. H., Anderson, G. S. & Hickey, D. A. (1994) A DNA-based approach to the identification of insect species used for postmortem interval estimation. *Journal of Forensic Sciences*, 39, 418-427.
- Stearns, S. C. & Hoekstra, R. F. (2003). *Evolução – uma introdução*. São Paulo: Atheneu Ed. (381p).

- Suplicy Filho, N., Souza Filho, M. F. DE, Takematsu, A. P. & Sato M. E. (1994). Resistência do ácaro rajado *Tetranychus urticae* (Koch) à acaricidas em roseiras, na região de Itapevi, SP. *Anais da Sociedade Entomológica do Brasil*, 23(1), 51-55.
- Takafuji, A., Santoso, S. & Hinomoto, N. (2001). Host-related differences in diapause characteristics of different geographical populations of the Kanzawa spider mite, *Tetranychus kanzawai* Kishida (Acari: Tetranychidae), in Japan. *Applied Entomology and Zoology*, 36, 177-184.
- Tamura, K., Dudley, J., Nei, M. & Kumar, S. (2007). MEGA4: Molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution*, 24, 1596-1599.
- Tanaka, M. A. de S., Betti, J. A. & Passos, F. A. (2000). Manejo Integrado de pragas do morangueiros. v.5., 61p. São Paulo: Secretaria da Agricultura e Abastecimento. (Manual Técnico, Série Especial).
- Templeton, A. R. (1979). The unit selection in *Drosophila mercatorium* II Genetics revolutions and the origin of coadapted genomes in parthenogenetics strains. *Genetics*, 92:1265-1282.
- Thewke, S. E. & Enns, W. R. (1969). The spider-mite complex (Acarina: Tetranychidae) in Missouri. Museum contributions, Columbia, Missouri, USA: University of Missouri, Monograph 1, 106.
- Thompson, J. D., Higgins, D.G., & Gibson, T. J. (1994). CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through weighting position-specific gap penalties and weight matrix. *Nucleic Acids Research*, 22:4673-4680.
- Tian, T., Grafton-Cardwell, E. E. & Granett, J. (1992). Resistance of *Tetranychus urticae* Koch (Acari: Tetranychidae) to cyhexatin and fenbutatin-oxide in California pears. *Journal of Economic Entomology*, 85, 2088-2095.
- Tixier, M. S., Kreiter, S., Allam, L., Ouahbi, A. & Hmimina, M. (2003). Phytoseiid and tetranychid mites (Acari: Mesostigmata, Prostigmata) of some Moroccan crops. *Acarologia*, 43 (1/2), 87-96.

- Tixier, M.S., Kreiter, S., Ferragut F. & Cheval, B. (2006). The suspected synonymy of *Kampimodromus hmiminai* and *Kampimodromus adrianae* (Acari : Phytoseiidae): morphological and molecular investigations. *Canadian Journal of Zoology* 84 (8): 1216-1222.
- Toda, S., Osakabe, M. H. & Komazaki, S. (2000). Interspecific diversity of mitochondrial CO1 sequences in Japanese *Panonychus* species (Acari: Tetranychidae). *Experimental and Applied Acarology*, 24, 821-829.
- Tonietto, J. A. & Carbonneau, A. (2004). A multicriteria climatic classification system for graping-growing regions worldwide. *Agricultural and Forest Meteorology* 124, 81-97.
- Tonietto, J., Vianello, R. L. & Regina, M. de A. (2006). Caracterização macroclimática e potencial enológico de diferentes regiões com vocação vitícola de Minas gerais. *Informe Agropecuário* 27(231), 32-55.
- Trumble, J. T. & Morse, D. J. P. (1993). Economics of Integrating the Predaceous Mite *Phytoseiulus persimilis* (Acari: Phytoseiidae) with Pesticides in Strawberries. *Horticultural Entomology*, 8(3), 879-885.
- Tsagkarakou, A., Navajas, M. & Lagnel, J.(1997). Population structure in the spider mite *Tetranychus urticae* on Crete based on multiple allozymes. *Heredity*, 7, 84-92.
- Tsagkarakou, A., Navajas, M., Papaionou-Souliots, P. & Pasteur, N. (1998). Gene flow among *Tetranychus urticae* (Acari: Tetranychidae) populations in Greece. *Molecular Ecology*, 7, 71-79.
- Tsagkarakou, A., Navajas, M., Rousset, F. & Pasteur, N. (1999). Genetic differentiation in *Tetranychus urticae* from greenhouses in France. *Experimental and Applied Acarology*, 23, 365-378.
- Tsagkarakou A, Cros-Arteil S. & Navajas M (2007). First record of the invasive mite *Tetranychus evansi* in Greece. *Phytoparasitica*, 35(5), 519-522.
- Tuttle, D. M. & Baker E. W. (1964). The spider mites of Arizona (Acarina : Tetranychidae). *Agricultural Experiment Station*, University of Arizona, Technical Bulletin, 158: 1-41.
- Tuttle, D. M. & Baker, E. W. & Abbatiello, M. (1976). Spider mites of Mexico (Acarina : Tetranychidae). *International Journal of Acarology*, 2(2): 1-102.

- Tuttle, D. M. & Baker, E. W. (1968). *Spider mites of southwestern United States and a revision of the family Tetranychidae*. Tuscon, USA: The University of Arizona Press. (143p).
- Tuttle, D. M., Baker, E. W. & Sales, F. M. (1977). Spider mites (Tetranychidae: Acarina) of the state of Ceará, Brazil. *International Journal of Acarology*, 3 (1), 1-8.
- Uesugi, R. & Osakabe M. H. (2007). Isolation and characterization of microsatellite loci in the two-spotted spider mite, *Tetranychus urticae* (Acari: Tetranychidae). *Molecular Ecology Notes*, 7, 290-292.
- Urueta, E. J. (1975). Aranas rojas (Acarina: Tetranychidae) del Departamento de Antioquia. *Revista Colombiana de Entomología*, 1(2), 1-14.
- Van Bortel, W. & Coosemans, M. (2003). Suggesting new species? Comments on "Evidence for a new species of Anopheles Minimus from the Ryukyu Archipelago, Japan". *Journal of the American Mosquito Control Association*, 1, 261-264.
- Van de Vrie, M. (1985). Apple. In W. Helle & M. W. Sabelis (Eds) *Spider mites: their biology, natural enemies and control: World Crop Pests*, v. 1B, cap. 3.2.4 (pp. 311-325). Amsterdam, The Netherlands: Elsevier Science Publisher.
- Vargas, C., Merayo, A. & Aguilar, H. (1996). Identificación de acaros en coberturas vivas y malezas en Costa Rica. *Manejo Integrado de Plagas*, 40, 40-43.
- Veerman, A. (1974). Carotenoid metabolism in *Tetranychus urticae* koch (Acari: Tetranychidae). *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 47:101-16.
- Vilgalys, R. (2003). Taxonomic misidentification in public DNA databases. *New Phytologist*, 160, 3-4.
- Villablanca, F. X., Roderick, G. K. & Palumbi, S. R. (1998). Invasion genetics of the Mediterranean fruit fly: variation in multiple nuclear introns. *Molecular Ecology*, 7, 547-560.

- Vogler, A. P. & DeSalle, R. (1994). Evolution and phylogenetic information content of the ITS-1 region in the tiger beetle *Cicindela dorsalis*. *Molecular Biology and Evolution*, 11(3), 393-405.
- Waite, G. K. (2001). Managing spider mites in field-grown strawberries using *Phytoseiulus persimilis* and "pest-in-first" technique. In R. B. Halliday, D. E. Walter, H. C. Proctor, R. A. Norton, M. J. Colloff (Eds). *Acarology Proceedings of the 10th International Congress. Melbourne, Australia, July 5-10, 2001* (p. 381-383). CSIRO Publishing.
- Watanabe, M. A., Moraes, G. J. de, Gastaldo Junior, I. & Nicollela, G. (1994). Controle biológico do ácaro rajado com ácaros predadores fitoseídeos (Acari: Tetranychidae, Phytoseiidae) em culturas de pepino e morango. *Scientia Agrícola*, 51:75-81.
- Weaver Jr, R. E. 2004. Bureau of Entomology, Nematology & Plant Pathology - Entomology Section. Tri-ology, 43:2. Florida Department of Agriculture and Consumer Services, Division of Plant Industry. Disponível em: <http://www.doacs.state.fl.us/pi/enpp/triology.html>. Acesso: 20/02/2009.
- Weekers, P. H. H., Jockheere, J. F. & Dumont, H. J. (2001). Phylogenetic relationship inferred from ribosomal ITS sequences and biogeographic patterns in representatives of the genus *Calopteryx* (Insecta: Odonata) of the West Mediterranean and adjacent west European zone. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 20(1), 89-99.
- Weir, B. S. & Cockerham C. C. (1994) Estimating F-Statistics for the Analysis of Population Structure *Evolution*, 38, (6), 1358-1370.
- Will, K. W., Mishler, B. D. & Wheeler, Q. D. (2005). The perils of DNA barcoding and the need for integrative taxonomy. *Systematic Biology* 54:844-851.
- Wright, S. (1978). *Evolution and the genetics of population*. Vol 4. Variability among and within natural populations. Chicago: University of Chicago Press.
- Wysoki. M. Other outdoor crops. In W. Helle & M. W. Sabelis (Eds) *Spider mites: their biology, natural enemies and control: World Crop Pests*, v. 1B, cap. 3.2.12 (pp. 375-384). Amsterdam, The Netherlands: Elsevier Science Publisher.

- XIE, L., HONG, X.-Y & XUE, X-F. (2006) Population structure of the two-spotted spider mite (Acari: Tetranychidae) from China. *Annals of the Entomological Society of America*, 99, 959-965.
- XIE, L., XIE, R.-R., ZHANG, K.-J. & HONG, X.-Y. (2008). Genetic relationship between the carmine spider mite *Tetranychus cinnabarinus* (Boisduval) and the two-spotted mite *T. urticae* Koch in China based on the mtDNA and rDNA ITS2 sequences. *Zootaxa* 1726, 18-32.
- Yaninek, J.S. & Moraes, G. J. (1991). A synopsis of classical biological control of mites in agriculture. In F. Dusabeck V. Bukva (Eds). *Modern acarology*. v.1 (pp.133-149). Prague: Academia, The Hague SPB Academic Publication.
- Zhang, D. X. & Hewitt, G. M. (2003). Nuclear DNA analyses in genetic studies of populations: practice, problems and prospects. *Molecular Ecology*, 12, 563-584.