

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOLOGIA

**SISTEMÁTICA MOLECULAR PARA ÁCAROS PLANOS  
DO GÊNERO *BREVIPALPUS* DONNADIEU (ACARI:  
TENUIPALPIDAE) – UTILIZAÇÃO DE MARCADORES  
MOLECULARES MITOCONDRIAIS E NUCLEARES**

**ÍISIS CAROLINA SOUTO DE OLIVEIRA**

DISSERTAÇÃO (MESTRADO)

BRASÍLIA - DF  
AGOSTO DE 2014



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

**SISTEMÁTICA MOLECULAR PARA ÁCAROS PLANOS DO  
GÊNERO *BREVIPALPUS* DONNADIEU (ACARI: TENUIPALPIDAE) –  
UTILIZAÇÃO DE MARCADORES MOLECULARES MITOCONDRIAIS E  
NUCLEARES**

**ÍISIS CAROLINA SOUTO DE OLIVEIRA**

Dissertação de Mestrado apresentada  
como parte dos requisitos necessários  
à obtenção do Título de Mestre em  
Zoologia pelo Programa de Pós-  
Graduação em Zoologia da  
Universidade de Brasília.

**ORIENTADOR: DENISE NAVIA MAGALHÃES FERREIRA  
CO-ORIENTADOR: RENATA SANTOS DE MENDONÇA**

**BRASÍLIA - DF  
2014**

**Aos meus pais Hélio e Soraya,  
à minha irmã Letycia,  
pela compreensão, carinho e apoio**

**DEDICO**

Às pesquisadoras

***Denise Navia e Renata Mendonça***

Pelo apoio, orientação, paciência, ensinamentos e  
exemplo de dedicação

**Agradeço especialmente**

## AGRADECIMENTOS

À Universidade de Brasília, Instituto de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Zoologia e ao corpo docente pelo conhecimento adquirido.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de mestrado.

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

À Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia (CENARGEN) por todo o suporte para o desenvolvimento deste trabalho. Aos projetos "Inovação e Suporte Tecnológico para a Defesa Fitossanitária no Brasil", Edital CNPq/SDA/MAPA 064/2008, processo No. 578353/2008-3; e "Quarentena de Germoplasma Vegetal para o Sistema Nacional de Pesquisa Agropecuária", Macroprograma 1 Embrapa, projeto No. 01090100404-00, pelo financiamento.

Aos pesquisadores colaboradores e suas Instituições, pelo envio de amostras, essenciais para o desenvolvimento do projeto de pesquisa: **no Brasil** – Prof. Dr. Manoel Guedes Correa Gondim Jr., Universidade Federal Rural de Pernambuco, UFRPe, Recife; Dra. Rosa de Belém das Neves Alves, Embrapa CENARGEN e Prof. Dr. Elliot W. Kitajima, Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", ESALQ-USP, Piracicaba, São Paulo. **No exterior** – Prof. Dr. Francisco José Ferragut, Universidad Politécnica de Valencia, Valencia, Espanha e ao Engenheiro Agrônomo Roberto C. Trincado, Servicio Agrícola y Ganadero, Curacaví, Santiago de Chile, Chile.

Aos companheiros da PPG-ZOO na UnB: Meiriane, Pedro, Michele e Diego pelas conversas, apoio, amizade e ajuda.

À equipe do Laboratório de Quarentena Vegetal, em especial aos companheiros de todas as horas Larissa, Stefânia, Stephanie, Mércia, Ritane, Andreza, Macária e Rayan. Bem como, Flávia, Maria Elvira e Maria e pelo carinho e atenção, apoio e amizade.

A todos os colegas, funcionários e pesquisadores do Núcleo Temático de Segurança Biológica da Embrapa Cenargen pela amizade e por todos os momentos compartilhados (ressalvo-me a não citar nomes pelo carinho que tenho a todos).

Aos amigos mais que especiais, Thais, Filipe, Gabriela, Anna, Larissa, Victor e Clara, pela compreensão nas minhas ausências, carinho e apoio constante.

## SUMÁRIO

RESUMO .....	x
ABSTRACT .....	xii

### Capítulo 1

1.1 INTRODUÇÃO.....	1
1.2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	3
1.2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	3
1.2.1 Acari.....	3
1.2.2 Ácaros plantícolas.....	4
1.2.3 Ácaros Fitófagos.....	4
1.2.4 Família Tenuipalpidae.....	5
1.2.5 Ácaros do gênero <i>Brevipalpus</i> - importância econômica e quarentenária.....	6
1.2.6 Taxonomia dos ácaros <i>Brevipalpus</i> .....	9
1.2.7 Sistemática molecular de ácaros plantícolas.....	12
1.2.8 Sistemática molecular de ácaros <i>Brevipalpus</i> .....	15
1.2.9 Taxonomia integrativa.....	16
1.3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	18

#### Lista de Tabelas

<b>Tabela 1.1:</b> Principais caracteres utilizados por Baker e Tuttle (1987) para a divisão do gênero <i>Brevipalpus</i> em grupos.....	10
--	----

### Capítulo 2 - SISTEMÁTICA MOLECULAR PARA ÁCAROS PLANOS DO GÊNERO *BREVIPALPUS* DONNADIEU (ACARI: TENUIPALPIDAE) – UTILIZAÇÃO DE MARCADORES MOLECULARES MITOCONDRIAIS E NUCLEARES

2.1 INTRODUÇÃO.....	31
OBJETIVOS GERAIS.....	34
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	34
2.2 MATERIAIS E MÉTODOS.....	35
2.2.1 Amostras.....	35
2.2.2 Identificação Morfológica.....	36
2.2.3 Avaliação de protocolos de extração de DNA.....	39
2.2.4 Avaliação de <i>primers</i> e otimização de protocolos de amplificação de DNA.....	41
2.2.5 Análises e edição das sequências.....	46
2.2.6 Análises Filogenéticas.....	46
2.2.7 Distância genética.....	47
2.2.8 Conjunto de dados.....	47
2.3 RESULTADOS.....	49
2.3.1 Avaliação de protocolos de extração de DNA.....	49
2.3.2 Avaliação de <i>primers</i> e otimização de protocolos de amplificação de DNA.....	49
2.3.3 Análises filogenéticas e estatística descritiva.....	50
2.3.3.1 <i>COI primers</i> DNF & DNR.....	52
2.3.3.2 <i>COI primers</i> LCO & HCO.....	58
2.3.3.3 ITS 2.....	62
2.3.3.4 Subunidade D1-D3 (28S).....	67
2.3.4 Integração de dados moleculares e morfológicos.....	71
2.4 DISCUSSÃO.....	83
2.4.1 Avaliação de protocolos de extração de DNA.....	83
2.4.2 Avaliação de primers e protocolos de amplificação de DNA.....	83
2.4.3 Análises filogenéticas.....	84
2.4.4 Distâncias genéticas.....	86
2.4.5 Caracteres taxonômicos em um contexto filogenético.....	87
2.4.6 Informações biológicas obtidas através da identificação acurada de <i>Brevipalpus</i> .....	89
2.5 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	92

2.6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	93
-------------------------------------	----

### Lista de Tabelas

<b>Tabela 2.1:</b> Dados de coleta (localidade, hospedeiros, coletores e datas) das amostras de ácaros <i>Brevipalpus</i> obtidas nesse estudo, número de lâminas e espécimes preservados, e identificação morfológica.....	38
<b>Tabela 2.2:</b> Fragmentos amplificados e <i>primers</i> utilizados nas reações de PCR e no seqüenciamento do DNA dos espécimes de ácaros <i>Brevipalpus</i> .....	42
<b>Tabela 2.3:</b> Reações de PCR testadas para a amplificação do fragmento <i>COI</i> , primers DNF & DNR. Os blocos sombreados indicam as alterações feitas de uma reação para a outra.....	43
<b>Tabela 2.4:</b> Reações de PCR testadas para a amplificação do fragmento <i>COI</i> , primers LCO1490 & HCO2198. Os blocos sombreados indicam as alterações feitas de uma reação para a outra.....	44
<b>Tabela 2.5:</b> Reações de PCR testadas para a amplificação da região ITS2, primers Bph1Rev & 28SC. Os blocos sombreados indicam as alterações feitas de uma reação para a outra.....	44
<b>Tabela 2.6:</b> Reações de PCR testadas para a amplificação da subunidade D1-D3 do gene 28S primers D23F D6R. Os blocos sombreados indicam as alterações feitas de uma reação para a outra.....	45
<b>Tabela 2.7:</b> Quantidade e descrição das sequências obtidas nesse estudo. Número dos espécimes para os quais sequências do fragmento foram obtidas entre parênteses, e espécimes recuperados após extração de DNA em negrito. Composição de siglas das amostras: País/Estado AR (Argentina); BR (Brasil)/ RR (Roraima) PE (Pernambuco) MG (Minas Gerais) RO (Roraima) SP (São Paulo) AL (Alagoas); CH (Chile); ES (Espanha); IS (Israel). Hospedeiros: <i>Anmu</i> ( <i>Annona muricata</i> ); <i>Cepa</i> ( <i>Cecropia pachystachya</i> ); <i>Cicl</i> ( <i>Citrus clementina</i> ); <i>Cisi</i> ( <i>Citrus sinensis</i> ); <i>Cobo</i> ( <i>Coniza bonariensis</i> ); <i>Conu</i> ( <i>Cocos nucifera</i> ); <i>Dere</i> ( <i>Delonix regia</i> ); <i>Ersp</i> ( <i>Erica</i> sp.); <i>Hest</i> ( <i>Helichrysum stoechas</i> ); <i>Hiro</i> ( <i>Hibiscus rosa-sinensis</i> ); <i>Ipba</i> ( <i>Ipomoea batatas</i> ); <i>Lisi</i> ( <i>Ligustrum sinensis</i> ); <i>Mggr</i> ( <i>Magnolia grandiflora</i> ); <i>Myla</i> ( <i>Myoporum laetum</i> ); <i>Oleu</i> ( <i>Olea europea</i> ); <i>Paed</i> ( <i>Passiflora edulis</i> ); <i>Phsp</i> ( <i>Phoenix</i> sp.); <i>Pito</i> ( <i>Pittosporum tobira</i> ); <i>Ripu</i> ( <i>Ribes punctatum</i> ); <i>Roof</i> ( <i>Rosmarinus officinalis</i> ); <i>Sovi</i> ( <i>Solanum violaeifolium</i> ); <i>Teca</i> ( <i>Tecomaria capensis</i> ).....	51
<b>Tabela 2.8:</b> Identificação das linhagens e haplótipos obtidos a partir das sequências do fragmento <i>COI</i> ( <i>primers</i> DNF DNR).....	53
<b>Tabela 2.9:</b> Matriz de distância entre as linhagens de ácaros <i>Brevipalpus</i> usando a correção Tamura-Nei (93), baseada nas sequências do fragmento <i>COI</i> (mtDNA) ( <i>primers</i> DNF DNR).....	57
<b>Tabela 2.10:</b> Identificação das linhagens e haplótipos obtidos a partir das sequências do fragmento <i>COI</i> ( <i>primers</i> LCO HCO).....	59
<b>Tabela 2.11:</b> Matriz de distância entre as linhagens de ácaros <i>Brevipalpus</i> usando a correção Kimura 2-Parâmetros (K2P), baseada nas sequências do fragmento <i>COI</i> (mtDNA) ( <i>primers</i> LCO HCO).....	61
<b>Tabela 2.12:</b> Identificação das linhagens e genótipos obtidos a partir das sequências do fragmento ITS2.....	63
<b>Tabela 2.13:</b> Matriz de distância entre as linhagens de ácaros <i>Brevipalpus</i> usando a correção Kimura 2-Parâmetros (K2P), baseada nas sequências da região ITS2 (rDNA).....	66
<b>Tabela 2.14:</b> Identificação das linhagens e genótipos obtidos a partir das sequências do fragmento D1-D3.....	68
<b>Tabela 2.15:</b> Matriz de distância entre as linhagens de ácaros <i>Brevipalpus</i> usando a correção Tamura 3-Parâmetros (T92), baseada nas sequências da subunidade D1-D3 do gene 28S (rDNA).....	70
<b>Tabela 2.16:</b> Distâncias genéticas intra e interespecíficas para ácaros <i>Brevipalpus</i> para as quatro regiões do genoma avaliadas.....	71

### Lista de Figuras

**Figura 1:** Árvore filogenética ML (TN93 + G) inferida a partir de sequências de *COI* (*primers* DNF DNR) de *Brevipalpus* recuperadas do Genbank e obtidas nesse estudo. Informações sobre a composição dos haplótipos na tabela 2.8 e informações sobre as sequências provenientes do Genbank no anexo 1. O número de vezes que cada haplótipo foi encontrado nas amostras está entre parênteses. Os valores de bootstrap estão

localizados sobre os ramos. A identificação de espécies e linhagens encontra-se a direita e a dos grupos, a esquerda. *Comunicação pessoal, R. Ochoa, USDA, 2014.**Nomenclatura de acordo com Beard <i>et al.</i> (2013). ***Nomenclatura de acordo com Beard <i>et al.</i> (2012).....	56
<b>Figura 2:</b> Árvore filogenética ML (modelo K2P) inferida a partir de sequências de COI ( <i>primers</i> LCO HCO) de <i>Brevipalpus</i> obtidas nesse estudo. Informações sobre a composição dos haplótipos na tabela 2.10. O número de vezes que cada haplótipo foi encontrado nas amostras está entre parênteses. Os valores de bootstrap estão localizados sobre os ramos. A identificação de espécies e linhagens encontra-se a direita e a dos grupos, a esquerda. *Comunicação pessoal, R. Ochoa, USDA, 2014. **Nomenclatura de acordo com Beard <i>et al.</i> 2013.....	60
<b>Figura 3:</b> Árvore filogenética ML (GTR + G) inferida a partir de sequências de ITS2 de <i>Brevipalpus</i> recuperadas do Genbank e obtidas nesse estudo. Informações sobre a composição dos genótipos na tabela 2.12 e informações sobre as sequências provenientes do Genbank no anexo 1. O número de vezes que cada genótipo foi encontrado nas amostras está entre parênteses. Os valores de bootstrap estão localizados sobre os ramos. A identificação de espécies e linhagens encontra-se a direita e a dos grupos, a esquerda. *Comunicação pessoal, R. Ochoa, USDA, 2014. **Nomenclatura de acordo com Beard <i>et al.</i> (2013). ***Nomenclatura de acordo com Beard <i>et al.</i> (2012).....	65
<b>Figura 4:</b> Árvore filogenética ML (T92) inferida a partir de sequências da subunidade D1-D3 (28S) de <i>Brevipalpus</i> obtidas nesse estudo. Informações sobre a composição dos genótipos na tabela 2.14. O número de vezes que cada genótipo foi encontrado nas amostras está entre parênteses. Os valores de bootstrap estão localizados sobre os ramos. A identificação de espécies e linhagens encontra-se a direita e a dos grupos, a esquerda. *Comunicação pessoal, R. Ochoa, USDA, 2014.**Nomenclatura de acordo com Beard <i>et al.</i> 2013.....	69
<b>Figura 5:</b> Espermateca de ácaros <i>Brevipalpus</i> do grupo <i>phoenicis</i> , micrografias em contraste de interferência diferencial (DIC) (objetiva 100x). <b>A.</b> <i>Brevipalpus yothersi</i> , colônias mantidas sobre frutos de laranja, Brasília, DF; <b>B.</b> <i>Brevipalpus</i> n. <i>yothersi</i> , coletado em hibiscus de Pernambuco, Brasil; <b>C.</b> <i>Brevipalpus incognitus</i> , coletado em coqueiro, Minas Gerais, Brasil; <b>D.</b> <i>Brevipalpus yothersi</i> , coletado em laranjeiras, Bella Vista, Corrientes, Argentina. (Fotos: D. Navia, Embrapa Cenargen, Brasil & F. Ferragut, UPV, Espanha).....	73
<b>Figura 6:</b> Espermateca de ácaros <i>Brevipalpus</i> do grupo <i>obovatus</i> , micrografias em contraste de interferência diferencial (DIC) (objetiva 100x). <b>A.</b> <i>Brevipalpus</i> grupo <i>phoenicis</i> Tipo 1, coletado em <i>Alnus subcordata</i> , Colombo, Paraná; <b>B.</b> <i>Brevipalpus obovatus</i> , coletado em manjeriço, em Aracaju, Sergipe, Brasil; <b>C.</b> <i>Brevipalpus chilensis</i> , coletado em videiras, Chile; <b>D.</b> <i>Brevipalpus</i> grupo <i>phoenicis</i> espécie F. (Fotos: F. Ferragut, UPV, Espanha & D. Navia, Embrapa Cenargen, Brasil).....	76
<b>Figura 7:</b> Espermateca de ácaros <i>Brevipalpus</i> do grupo <i>cuneatus</i> , micrografias em contraste de interferência diferencial (DIC) (objetiva 100x). <b>A.</b> <i>Brevipalpus oleae</i> , coletado em oliveira, Valencia, Espanha; <b>B.</b> <i>Brevipalpus</i> grupo <i>cuneatus</i> sp. 1, coletado em alecrim, Valencia, Espanha; <b>C.</b> <i>Brevipalpus</i> grupo <i>cuneatus</i> sp. 2, coletado em <i>Erica</i> sp., Castellón, Espanha. (Fotos: F. Ferragut, UPV, Espanha).....	78
<b>Figura 8:</b> Espermateca de um ácaro <i>Brevipalpus</i> do grupo <i>californicus</i> , micrografia em contraste de interferência diferencial (DIC) (objetiva 100x). <b>A.</b> <i>Brevipalpus</i> grupo <i>californicus</i> espécie B, coletado em citros nos EUA (Fotos: F. Ferragut, UPV, Espanha & D. Navia, Embrapa Cenargen, Brasil).....	80
<b>Figura 9:</b> <i>Brevipalpus</i> sp. coletado em <i>Citrus sinensis</i> , Bella Vista, Corrientes, Argentina, micrografias em contraste de interferência diferencial (DIC). <b>A.</b> propodosoma dorsal; <b>B.</b> opistossoma dorsal; <b>C.</b> propodosoma ventral; <b>D.</b> opistossoma ventral (objetiva 40x); <b>E.</b> espermateca (objetiva 100x); <b>F.</b> superfície do poro do propodosoma (objetiva 100x). (Fotos F. Ferragut, UPV, Espanha).....	82

#### Lista de Anexos

<b>Anexo 1:</b> Sequências de DNA de ácaros <i>Brevipalpus</i> usadas na composição do conjunto de dados. O número do acesso, informações sobre a espécie de planta hospedeira e origem geográfica foram extraídas do Genbank.....	101
--	-----

## RESUMO

Souto-Oliveira. I., C. **Sistemática molecular para ácaros planos do gênero *Brevipalpus* Donnadieu (Acari: Tenuipalpidae) – utilização de marcadores moleculares mitocondriais e nucleares.** 2014, 107P. Dissertação (Mestrado), Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Brasília, DF.

O gênero *Brevipalpus* Donnadieu destaca-se como um dos mais importantes na família Tenuipalpidae. Esses ácaros fitófagos podem causar danos a seus hospedeiros, sejam diretos, pela alimentação em folhas, ramos e frutos, sejam indiretos, devido à transmissão de vírus. A taxonomia dos ácaros *Brevipalpus*, especialmente das espécies de importância econômica, tem representado um desafio para os acarologistas; numerosas sinonímias têm sido estabelecidas e a ocorrência de espécies crípticas tem sido confirmada. A acurada identificação desses ácaros é fundamental para compreensão do papel de cada espécie na transmissão dos fitovírus, para a determinação dos hospedeiros de cada espécie, e para a definição de medidas de prevenção e controle. Estudos morfológicos com a utilização de diferentes técnicas de microscopia têm possibilitado um imenso avanço na taxonomia do grupo. Em uma abordagem integrativa, além dos estudos morfológicos é fundamental dispor de ferramentas adicionais para a construção de uma sistemática consistente dos grupos de organismos. Até o momento apenas um fragmento, da região Citocromo Oxidase I (COI) do DNA mitocondrial foi explorado na sistemática de *Brevipalpus*. A utilização de um maior número de marcadores moleculares, independentes, é importante para a consistência dos estudos. O presente trabalho teve como objetivos contribuir para o avanço da sistemática molecular de ácaros *Brevipalpus*, através da avaliação e otimização de protocolos de extração e amplificação de DNA; comparação de filogenias obtidas a partir de sequências de quatro regiões do genoma, incluindo marcadores mitocondriais - dois fragmentos da região COI -, e nucleares - regiões "Internal Transcriber Spacer II" (ITS2) e subunidade D1-D3 do gene 28S; apresentação de faixas de distâncias genéticas intra e interespecíficas; e avaliação de caracteres morfológicos em um contexto filogenético. Foram obtidas 25 amostras de *Brevipalpus*, de cinco países - Argentina, Brasil, Chile, Espanha, e Israel -, de 22 plantas hospedeiras. Foram avaliados dois protocolos de extração de DNA em relação ao rendimento da concentração de DNA, de sua qualidade e eficiência para amplificação, sendo um parcialmente destrutivo e um não destrutivo. Apesar do rendimento da concentração de DNA dos dois protocolos ser similar, observou-se maior eficiência de amplificação com o DNA obtido através do método parcialmente destrutivo. Para cada um dos quatro pares de primers foram testadas Reações de Polimerase em Cadeia (PCR) com variações nas concentrações de componentes da reação (MgCl<sub>2</sub>, BSA, DNTP e primers), assim como nas condições das reações (temperaturas de amplificação, número e tempo dos ciclos). As reações de PCR foram alteradas para possibilitar a amplificação do DNA com apenas 2µL de DNA molde, permitindo a amplificação dos quatro marcadores com DNA de um único espécime. Para as análises filogenéticas, além das sequências obtidas durante

o desenvolvimento desse estudo, foram incluídas, nos *datasets* das análises filogenéticas, sequências de *Brevipalpus* recuperadas do GenBank. O fragmento da região *COI* amplificado com os primers DNR e DNF foi de 373 pares de base (pb) e o alinhamento final foi composto por 190 sequências de *Brevipalpus* (92 obtidas nesse estudo, 98 recuperadas do GenBank), as quais foram classificadas em 89 haplótipos, agrupados em 18 linhagens. O fragmento da região *COI* amplificado com os primers LCO e HCO foi de 650pb e o alinhamento final foi composto por 64 sequências (todas obtidas nesse estudo), as quais foram classificadas em 31 haplótipos, agrupados em 12 linhagens. O fragmento da região ITS2 foi de 500pb e o alinhamento final foi composto por 109 sequências (108 obtidas nesse estudo, uma recuperada do GenBank), as quais foram classificadas em 43 genótipos, agrupados em 14 linhagens. O fragmento da região D1-D3 foi de 900pb e o alinhamento final foi composto por 74 sequências (todas obtidas nesse estudo), as quais foram classificadas em 28 genótipos, agrupados em 11 linhagens. De forma geral, as topologias das árvores filogenéticas obtidas a partir de sequências das quatro regiões do genoma foram congruentes. Apesar de não ter sido possível obter sequências dos quatro fragmentos para todos os espécimes foi possível fazer a correspondência entre os clados das diferentes árvores a partir das informações sobre as amostras e/ou espécimes sequenciados. Entretanto, entre as árvores dos diferentes marcadores, foram observadas algumas incongruências na divisão de linhagens dentro dos grupos *phoenicis* e *obovatus*. A principal diferença na topologia das árvores filogenéticas, foi a posição do clado do grupo *cuneatus*. O status taxonômico de algumas populações, que provavelmente constituem novos táxons para a ciência, foi aclarado. Os resultados das análises filogenéticas indicaram a necessidade da condução de estudos mais detalhados para esclarecer a posição taxonômica de linhagens próximas a *B. yothersi*, *B. incognitus* e *B. phoenicis* tipo 1, para as quais não houve consenso entre as filogenias das diferentes regiões. O valor filogenético de alguns dos caracteres morfológicos que têm sido utilizados para a taxonomia de *Brevipalpus* foi discutido com a finalidade de subsidiar a revisão da classificação de grupos. As informações geradas representam um ponto de partida para a construção de uma classificação taxonômica consistente para os ácaros *Brevipalpus*, baseada nas relações filogenéticas entre os táxons.

## ABSTRACT

Souto-Oliveira. I., C. **Molecular systematics for flat mites of the genus *Brevipalpus* Donnadieu (Acari: Tenuipalpidae) – using mitochondrial and nuclear molecular markers.** 2014, 107P. Dissertation (Master Science), Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Brasília, DF.

The genus *Brevipalpus* is one of the most important in the Tenuipalpidae family. These phytophagous mites can cause damage to their host plants either directly, by feeding on leaves, stems and fruits or indirectly, by transmitting plant virus. *Brevipalpus* mite taxonomy, particularly of economically important species, represents a challenge for acarologists; numerous synonyms have been established and the occurrence of cryptic species has been confirmed. The accurate identification of these mites is essential to understand the role of each species in the transmission of plant viruses, for listing host plants of each species, and for defining prevention and control strategies. Morphological studies applying different microscopy techniques have enabled a considerable advance in the taxonomy of the group. In an integrative approach, besides the morphological studies is essential to have additional tools for building a consistent systematics for groups of organisms. So far, only one fragment of the Cytochrome Oxidase I (COI) region, of the mitochondrial DNA had been explored in *Brevipalpus* systematics. Employing a higher number of independent molecular markers is important to give consistency for the studies. The present study aimed to contribute for the advance of *Brevipalpus* mite molecular systematics by evaluating and optimizing DNA extraction and amplification protocols; comparing phylogenies obtained from sequences of four different genome regions, including mitochondrial– two fragments of the COI region -, and nuclear markers – regions Internal Transcriber Spacer II (ITS2) and the subunit D1-D3 of the gene 28S; presenting intra and interspecific genetic distances; and evaluating the morphological traits in a phylogenetic context. For the study 25 samples of *Brevipalpus* were obtained, from five countries – Argentina, Brazil, Chile, Spain and Israel, from 22 host plants. Two protocols of DNA extraction were evaluated considering DNA concentration, quality and efficiency for amplification, being one partially destructive and the other one non destructive. Although the DNA concentration for both protocols has been similar, the partially destructive method was more efficient for DNA amplification. For each of the four pairs of primers Polymerase Chain Reactions (PCR) were tested with variations on the components of reaction (MgCl<sub>2</sub>, BSA, DNTP and primers) as well as in the reactions conditions (amplification temperatures, number and duration of cycles). Reactions were adjusted to make possible DNA amplification from 2µL of DNA, thus allowing amplification of the four markers from DNA of one specimen.

For the phylogenetic analyses, in addition to the sequences obtained in this study, *Brevipalpus* sequences retrieved from Genbank were included in the datasets. The length of the amplified fragment of the COI region using primers DNF & DNR was 373 base pairs (bp) and the final alignment included 190 sequences (92 obtained in this study, 98 retrieved from Genbank), which were classified in 89 haplotypes, clustered in 18 lineages. The length of the amplified fragment of the COI region using primers LCO & HCO was 650bp and the final alignment included 64 sequences (all obtained in this study), which were

classified in 31 haplotypes, clustered in 12 lineages. The length of the amplified fragment of the ITS2 region was 500bp and the final alignment included 109 sequences (108 obtained in this study, one retrieved from Genbank), which were classified in 43 genotypes, clustered in 14 lineages. The length of the amplified fragment of the subunit D1-D3 of the gene 28S was 900bp and the final alignment included 74 sequences (all obtained in this study), which were classified in 28 genotypes, clustered in 11 lineages. In general topologies of phylogenetic trees obtained from sequences of the four genome regions were congruent. Although it wasn't possible to obtain sequences of the four fragments for all the specimens, it was possible to match clades trees from information of the sequenced samples and/or specimens. However, incongruences in the division of lineages within groups *phoenicis* and *obovatus* were observed between trees built from different markers. The main difference between the phylogenetic trees topologies, was the position of the *cuneatus* group. Taxonomic status of some populations, which probably constitute new taxa, was clarified. Results of phylogenetic analyses showed the need to conduct further studies to clarify the taxonomic position of lineages close to *B. yothersi*, *B. incognitus* and *B. phoenicis* tipo 1, to which were observed incongruencies between phylogenies. The phylogenetic value of some morphological characters used for *Brevipalpus* taxonomy was discussed to support the revision of groups classification. Information provided represents a starting point for the development of a consistent taxonomic classification of the *Brevipalpus* mites, based on the phylogenetic relations between groups and taxa.

## CAPÍTULO 1

### 1.1 INTRODUÇÃO

Os ácaros da família Tenuipalpidae (Acari: Trombidiformes: Prostigmata), comumente conhecidos como ácaros planos, são estritamente fitófagos (Mesa *et al.* 2009). Essa família inclui várias espécies de importância agrícola, tanto por causarem danos diretos, devido à alimentação de colônias numerosas (Moraes & Flechtmann 2008), como indiretos, devido à sua ação como vetores de vírus (Kitajima *et al.* 2010).

Um dos gêneros de maior importância em Tenuipalpidae é *Brevipalpus* Donnadieu, com cerca de 280 espécies (Mesa *et al.* 2009). Nesse gênero destacam-se três espécies - *B. phoenicis* (Geijskes, 1939), *B. obovatus* Donnadieu, 1875 e *B. californicus* (Banks, 1904). Essas espécies são relatadas infestando mais de 900 plantas incluindo monocotiledôneas e dicotiledôneas; plantas anuais e perenes; frutíferas, florestais e ornamentais. Essas espécies foram reportadas como vetoras de, pelo menos, um fitovírus (Childers *et al.* 2003a). Além disso, algumas espécies de *Brevipalpus* são de expressão quarentenária, implicando no controle de trânsito de material de seus hospedeiros (Navia *et al.* 2006). Alguns dos vírus transmitidos por *Brevipalpus* (VTBs) afetam culturas importantes como citros, café e maracujá. Entre os VTBs destaca-se o *Citros leprosis vírus C* (CiLV C), que causa a leprose do citros, um dos principais problemas da citricultura nacional (Chagas *et al.* 2003; Kitajima *et al.* 2003; Rodrigues *et al.* 2003).

Devido à sua importância econômica e quarentenária, e ao envolvimento na transmissão de fitovírus, a identificação acurada das espécies de *Brevipalpus* é fundamental para a adoção de medidas de prevenção e controle. A identificação precisa é fundamental para a determinação do espectro de hospedeiros de cada espécie e seu envolvimento na transmissão dos diversos fitovírus.

Vários problemas vêm sendo apontados na taxonomia de ácaros do gênero *Brevipalpus*, principalmente das espécies de importância econômica, e observa-se a necessidade de uma completa revisão da mesma. Alguns autores

têm levantado a hipótese de ocorrência de complexos de espécies crípticas (Welbourn *et al.* 2003; Rodrigues *et al.* 2004; Groot & Breeuwer 2006). Estudos morfológicos detalhados têm ressaltado a importância de caracteres que não vinham sendo explorados (Beard *et al.* 2012, 2013; Navia *et al.* 2013). Uma abordagem integrativa, a partir de dados morfológicos, moleculares e biológicos, é essencial para a construção da sistemática de *Brevipalpus*.

Avanços têm sido obtidos através de estudos morfológicos detalhados dos ácaros *Brevipalpus*, com a utilização de diferentes técnicas de microscopia (Beard *et al.* 2012, 2013). Dados moleculares devem ser integrados aos estudos morfológicos, pois podem aclarar dúvidas sobre variabilidade intra e interespecífica, e permitir a construção de uma sistemática, baseada nas relações evolutivas entre os táxons (Hillis *et al.* 1996; Navia *et al.* 2013). Estudos de sistemática molecular de *Brevipalpus* têm sido baseados em sequências de um único marcador, a região Citocromo Oxidase I (COI) do DNA mitocondrial (Rodrigues *et al.* 2004; Groot & Breeuwer 2006; Navia *et al.* 2013). É necessário obter e avaliar informação molecular de outras regiões do genoma que têm sido exploradas na sistemática de ácaros de outros grupos.

## 1.2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 1.2.1 Acari

Os ácaros são artrópodes pertencentes à classe Arachnida, subclasse Acari, e estão entre os grupos de invertebrados de maior sucesso biológico devido à sua diversidade ecológica e morfológica (Krantz & Walter 2009). Esses pequenos artrópodes tiveram sucesso na colonização dos mais variados ambientes terrestres e aquáticos (incluindo marinho), onde apresentam os mais diversos hábitos alimentares, incluindo a saprofagia, fungivoria, predação, parasitismo e fitofagia. O pequeno tamanho desses animais facilita sua dispersão. Por meios naturais, podem ser dispersos por caminhamento, pelo vento ou por outros animais, vertebrados e invertebrados. Através da atividade humana podem ser disseminados pelo trânsito de animais e vegetais (Krantz & Walter 2009; Hoy 2011).

De acordo com Walter & Proctor (1999) aproximadamente 55.000 espécies de ácaros são conhecidas, porém os autores estimam que existam de 500.000 a 1.000.000 espécies no grupo. As espécies descritas estão agrupadas em 5.500 gêneros (com 1200 subgêneros), e estes em 124 superfamílias e 540 famílias (Krantz & Walter 2009).

A subclasse Acari é, atualmente, dividida em duas superordens: Parasitiformes e Acariformes. A superordem dos Parasitiformes é formada por ácaros que possuem de um a quatro pares de estigmas posteriores à coxa II e coxas móveis, sendo dividida nas ordens Opilioacarida, Holothyrida, Ixodida e Mesostigmata. Já a superordem dos Acariformes é formada por ácaros que não possuem estigmas visíveis posteriores à coxa II e tem as coxas fundidas ao ventre, sendo dividida nas ordens Trombidiformes e Sarcoptiformes (Krantz & Walter 2009).

Tem sido bastante discutido entre os acarologistas se os Acari constituem um grupo mono ou polifilético. Atualmente a hipótese mais aceita é de que a subclasse Acari seja um grupo monofilético, pois suas duas superordens compartilham características vistas como primitivas e porque, até o momento, não existem evidências de que alguma dessas superordens possa ser mais próximas de outros grupos de Arachnida do que entre si (Krantz & Walter 2009).

### 1.2.2 Ácaros plantícolas

Dentre os ácaros que vivem no ambiente terrestre temos os de solo, que se alimentam de raízes de plantas ou material em decomposição, fungos, bactérias e predadores; e os plantícolas, que vivem na parte aérea das plantas e podem ter hábitos alimentares bastante variados. Os ácaros plantícolas podem ser: 1) predadores de outros ácaros ou de pequenos insetos. Nesse grupo estão ácaros Trombidiformes e Mesostigmata, principalmente das famílias Phytoseiidae e Ascidae; 2) fungívoros ou saprófagos, que se alimentam de algas ou folhas em decomposição. Esses ocorrem principalmente nos Oribatida, e em vários gêneros de Trombidiformes; 3) fitófagos, que se alimentam das plantas em si, pólen ou néctar. Esses podem estar presentes no grupo dos Parasitiformes e Acariformes, sendo muito comuns na ordem Trombidiformes (Krantz & Walter 2009).

### 1.2.3 Ácaros Fitófagos

Os ácaros fitófagos costumam ser mais lentos e menos esclerotizados que os ácaros predadores. Muitos deles são de coloração viva, vermelhos, amarelos ou verdes; enquanto que outros podem ser translúcidos ou brancos (Krantz & Walter 2009). A maioria destes ácaros possui o dígito móvel das quelíceras modificado em forma de estilete, o que possibilita que se alimentem do conteúdo das células vegetais. Os estiletos penetram na célula e, quando retraído, o conteúdo celular chega à superfície da folha e é sugado pelo ácaro (Moraes & Flechtmann 2008).

Os ácaros fitófagos podem causar danos diretos ou indiretos a suas plantas hospedeiras. Os danos diretos são causados pela alimentação dos ácaros nas plantas que, em caso de infestações muito severas, pode levar à morte das mesmas. Os danos indiretos se dão pela ação como vetores ou disseminadores de fitopatógenos (Moraes & Flechtmann 2008; Hoy 2011). Além disso, as populações de ácaros fitófagos podem desenvolver rapidamente resistência a pesticidas, dificultando seu controle (Van Leeuwen *et al.* 2010; Hoy 2011).

Os ácaros fitófagos constituem também um grupo de organismos de expressão quarentenária. Podem causar sérios impactos quando introduzidos

em novas áreas, onde encontrem condições favoráveis a seu desenvolvimento e ausência de inimigos naturais eficientes. Algumas características que ressaltam o potencial dos ácaros fitófagos como pragas quarentenárias são: a facilidade de passarem despercebidos à inspeções visuais; e a capacidade de sobreviverem em condições ambientais adversas e de se adaptarem a novos hospedeiros (Navia *et al.* 2006).

As principais famílias de ácaros fitófagos são Tetranychidae, Eriophyidae, Tenuipalpidae e Tarsonemidae (Jeppson *et al.* 1975; Helle & Sabelis 1985; Jeppson 1989; Lindquist *et al.* 1996; Moraes & Flechtmann 2008). De acordo com Moraes e Flechtmann (2008), as principais espécies de ácaros considerados pragas importantes no Brasil são o ácaro da leprose do citros, *B. phoenicis*; o ácaro rajado, *Tetranychus urticae* (Koch, 1836); e o ácaro branco, *Polyphagotarsonemus latus* Banks (1904). Estas espécies são cosmopolitas e polífagas, sendo pragas de várias culturas importantes (Moraes & Flechtmann 2008).

#### **1.2.4 Família Tenuipalpidae**

A família Tenuipalpidae (Acariformes: Trombidiformes: Prostigmata) está amplamente distribuída por todo o mundo, sendo composta por cerca de 891 espécies, pertencentes a 34 gêneros (Mesa *et al.* 2009). Juntamente com Tetranychidae, Tuckerellidae, Allochaetophoridae e Linotetranaeidae, essa família compõe a superfamília Tetranychoidae, (Jeppson *et al.* 1975; Ochoa & Salas 1989). As espécies de importância econômica estão em Tetranychidae, Tenuipalpidae e Tuckerellidae. As outras famílias não são tão diversas quanto essas e não apresentam grande importância econômica (Krantz & Walter 2009).

Os tenuipalpeos são achatados dorsoventralmente, movimentam-se lentamente e são conhecidos como ácaros planos (Ochoa & Salas 1989; Moraes & Flechtmann 2008) ou, em Inglês, como “false spider mites” (Baker *et al.* 1975; Baker & Tuttle 1987). Essa família se diferencia das demais da superfamília Tetranychoidae por possuir palpos simples, com cinco ou menos segmentos, e sem a modificação unha-dedão; opistossoma com no máximo 13 pares de setas dorsais e laterais (seta *c1* presente, seta *c4* ausente, 2 pares de setas *h*); e de um a três pares de setas pseudoanais (Krantz & Walter 2009).

De acordo com a análise filogenética de Quirós-González (1985), Tenuipalpidae é considerado um grupo monofilético.

Todos os tenuipalpeos são fitófagos, podendo causar danos a suas plantas hospedeiras através da alimentação em folhas, galhos e frutos (Mesa *et al.* 2009). A alimentação de ácaros tenuipalpeos em plantas hospedeiras pode causar manchas cloróticas ou esbranquiçadas nas folhas que podem se tornar marrons levando a morte e queda prematura. Podem ocorrer também lesões necróticas nas bainhas foliares, leves deformações nas gemas e redução da brotação, necrose em frutos e ramos tenros e, com menor frequência, a formação de galhas (Moraes & Flechtmann 2008). Além dos danos diretos, vários desses ácaros são vetores de vírus (Rodrigues *et al.* 2003; Childers & Derrick 2003; Kitajima *et al.* 2003) e existem relatos de espécies que carregam esporos de fungos associados a plantas (Evans *et al.* 1993; Ochoa *et al.* 1994; Mesa *et al.* 2009).

Em Tenuipalpidae grande parte das espécies que causam dano econômico significativo a plantas cultivadas pertence aos gêneros *Brevipalpus* Donnadieu e *Tenuipalpus* Donnadieu. Atualmente são relatadas 28 espécies de Tenuipalpidae no Brasil, dentre essas 13 pertencentes ao gênero *Tenuipalpus* e 10 pertencentes ao gênero *Brevipalpus* (Mesa 2005; De Castro & Feres, 2013; Flechtmann & Noronha 2013; Navia *et al.* 2013).

#### **1.2.5 Ácaros do gênero *Brevipalpus* - importância econômica e quarentenária**

Os ácaros do gênero *Brevipalpus* apresentam de 200-300  $\mu\text{m}$ , coloração vermelho-alaranjada, corpo dividido em propodossoma e opistossoma, um par de ocelos, e a sua ornamentação pode ser muito variada (Welbourn *et al.* 2003).

*Brevipalpus* é o maior gênero da família Tenuipalpidae, com aproximadamente 280 espécies distribuídas no mundo, sendo 129 espécies na região Neotropical, 69 na região Neoártica, 49 na região Oriental, 23 no Paleártico Ocidental, 9 no Paleártico Oriental e 3 na região Afrotropical, não havendo registros apenas nas regiões Australiana e nas Ihas do Pacífico (Mesa *et al.* 2009).

A importância econômica dos ácaros *Brevipalpus* vem crescendo, em especial por sua capacidade de transmissão de fitopatógenos (Childers & Derrick 2003; Alberti & Kitajima 2014). As populações desses ácaros podem ser numerosas. Os ácaros desse gênero atacam diversas culturas, principalmente frutíferas e ornamentais (Jeppson *et al.* 1975; Hoy 2011).

No Brasil, as culturas mais afetadas por *Brevipalpus* são café (*Coffea* spp., Rubiaceae), citros (*Citrus* spp., Rutaceae), maracujá (*Passiflora* spp., Passifloraceae), antúrio (*Anthurium* sp., Araceae), azaléia (*Azalea* sp., Ericaceae), cipreste (*Cupressus* sp., Cupressaceae) e orquídeas (Orchidaceae) (Moraes & Flechtmann 2008).

As cinco espécies de *Brevipalpus* de maior importância econômica no mundo são: *B. phoenicis*, *B. obovatus*, *B. californicus* (Banks 1904), *Brevipalpus chilensis* Baker, 1949 e *Brevipalpus lewisi* McGregor, 1949 (Childers *et al.* 2003b). As três primeiras espécies estão presentes no Brasil.

Além das três espécies de importância econômica, também foram relatadas no Brasil sete outras espécies: *B. cassia* Baker, Tuttle & Abbatiello, 1975 (Miranda 2008), *B. russulus* (Boisduval, 1867) (Chiavegato 1976), *B. chamaedorae* Baker, Tuttle & Abbatiello, 1975 (Vasconcelos *et al.* 2005), *B. tuberellus* De Leon, 1960, *B. araucanus* Gonzalez, 1975, *B. artemisiae* Baker & Tuttle, 1964 (Mesa, 2005) e *B. incognitus* Navia & Ferragut 2013 (Navia *et al.* 2013).

As espécies de *Brevipalpus* podem ser polípagas e mais de uma espécie pode estar presente em um mesmo hospedeiro ou localidade (Childers *et al.* 2003a, Beard *et al.* 2012, 2013). Em um trabalho analisando hospedeiras das três espécies de maior importância econômica (*B. phoenicis*, *B. californicus* e *B. obovatus*), Childers *et al.* (2003a) relataram 928 espécies, em 513 gêneros, distribuídos em 139 famílias de plantas.

Inicialmente, estudos sobre ácaros vetores de fitovírus citavam poucas espécies dentro da família Eriophyidae (Keifer 1952; Slykhuis 1963; Walkey 1991; Oldfield & Proeseler 1996). Porém, atualmente, outras famílias têm sido relatadas como vetores, principalmente, Tenuipalpidae. Na família Tenuipalpidae apenas os ácaros do gênero *Brevipalpus* são relatados como vetores de viroses de plantas (Childers & Derrick 2003; Bastianel *et al.* 2006; Kitajima *et al.* 2010). Estudos recentes relatam a ocorrência de VTBs (Vírus

Transmitidos por *Brevipalpus*) em quase 40 espécies de plantas (Kitajima *et al.* 2010).

Os ácaros *Brevipalpus* são responsáveis pela transmissão do vírus da leprose do citros *Citrus leprosis virus* - CiLV (Musumecchi & Rosseti 1963); da mancha anular do cafeeiro, *Coffee ringspot virus* - CoRSV (Chagas 1973); da mancha anelar do *Ligustrum*, *Ligustrum ringspot virus* (Rodrigues & Nogueira 1996); da pinta verde do maracujazeiro, *Passion fruit green ringspot virus* - PFGSV (Kitajima *et al.* 1997); e da mancha anular das orquídeas, *Orchid fleck virus* - OFV (Maeda *et al.* 1998). Além destas, 34 outras plantas ornamentais, de 17 famílias, são hospedeiras e podem ser afetadas por VTBs (Kitajima *et al.* 2010).

Dentre as doenças causadas por VTBs, a leprose dos citros, originalmente descrita nos EUA (Fawcett 1963), destaca-se como um dos principais problemas da citricultura paulista, ocorrendo também em vários outros Estados (Rodrigues *et al.* 2003). Seus prejuízos diretos têm sido avaliados entre 40 e 60 milhões de dólares/ano (Salva & Massari 1995) e o custo do controle do ácaro vetor em cerca de 80 milhões de dólares (Rodrigues *et al.* 2003). A resistência aos acaricidas afeta a eficiência dos produtos aplicados para o controle desses ácaros (Omoto 1999). Estudos confirmam a transmissão de fitovírus por ácaros do gênero *Brevipalpus* (Kitajima *et al.* 2003; Bastianel *et al.* 2006), as únicas espécies que comprovadamente transmitem vírus são *B.phoenicis*, *B.californicus* e *B.obovatus*, porém a questão de quais espécies, além dessas, estão envolvidas ainda não foi definitivamente respondida (Alberti & Kitajima 2014).

No gênero *Brevipalpus* há algumas espécies regulamentadas como quarentenárias, por apresentarem distribuição restrita, poderem ser disseminadas pelo trânsito de material vegetal (especialmente pelo comércio de frutos), e apresentam potencial de causar impacto em áreas onde ainda não ocorrem (Navia *et al.* 2006). Alguns *Brevipalpus* exóticos têm sido interceptados em pontos de entrada no país, em frutos e em material propagativo (Gonzaga *et al.* 2014 in press). No Brasil, *B. chilensis* e *B. lewisi* são regulamentados como pragas quarentenárias ausentes, de acordo com a Instrução Normativa Nº 41, de 01 de julho de 2008.

### 1.2.6 Taxonomia dos ácaros *Brevipalpus*

Os ácaros do gênero *Brevipalpus* apresentam palpo com quatro segmentos, uma a três setas no segmento distal do palpo; três pares de setas propodossomais, seis ou sete pares de setas histerossomais laterais e um a três pares de setas dorsocentrais (ausência de setas dorsolaterais); placas ventrais e genitais separadas; adulto apresenta, dorsalmente, ornamentação reticulada. Apesar dos machos serem diferentes das fêmeas, o padrão de setas e ornamentação permanecem os mesmos em ambos (Baker *et al.* 1975; Jeppson *et al.* 1975; Baker & Tuttle 1987).

A primeira revisão taxonômica do gênero *Brevipalpus* foi realizada por Baker (1949), colocando o grupo dentro da família Pseudoleptidae (atual Tenuipalpidae), então composta por 39 espécies.

Baker *et al.* (1975) dividiram o gênero em 7 grupos, sem nomes definidos, numerados em algarismos romanos.

Meyer (1979) dividiu o gênero em oito grupos de espécies -*absens*, *californicus*, *cuneatus*, *obovatus*, *phoenicis*, *pterinus*, *recki* e *spinosus*- este último correspondendo ao gênero *Cenopalpus* Pritchard & Baker (considerado uma sinonímia de *Brevipalpus*).

Em uma nova revisão, Baker e Tuttle (1987) dividiram o gênero (então constituído por 165 espécies), em 6 grupos - *cuneatus*, *frankeniae*, *californicus*, *obovatus*, *phoenicis* e *portalis* - os quais correspondiam aos grupos de Baker (1975), porém diferentes dos de Meyer (1979). Esta divisão em grupos de Baker e Tuttle (1987) vem sendo utilizada em trabalhos recentes. Um resumo dos caracteres utilizados na divisão apresentada por Baker e Tuttle (1987) é mostrado na Tabela 1.1.

**Tabela 1.1:** Principais caracteres utilizados por Baker e Tuttle (1987) para a divisão do gênero *Brevipalpus* em grupos.

Grupo	Setas hysterossoma	Setas dorsocentraes	Solenídeos no tarso II	Setas do Palpo	Fórmula do grupo*
<i>californicus</i>	7	3	2	3	7/4/3/2
<i>cuneatus</i>	7	3	1	3	7/4/3/1
<i>portalis</i>	7	3	2	2	7/4/2/1
<i>frankeniae</i>	7	3	1	1	7/3/1/1
<i>phoenicis</i>	6	3	2	3	6/4/3/2
<i>obovatus</i>	6	3	1	3	6/4/3/1

\*Referente a número de setas hysterossomais/ número de segmentos do palpos/ número de setas no segmento distal do palpo/ número de solenídeos do tarso II.

A taxonomia de ácaros do gênero *Brevipalpus*, especialmente das espécies de importância econômica, tem representado um desafio para acarologistas. A grande variabilidade intraespecífica tem resultado em numerosas sinonímias.

Um notável exemplo é *B. phoenicis*. Mesa *et al.* (2009) listaram cinco sinonímias para essa espécie – *B. deleoni* Pritchard & Baker, 1958, descrita de *Petrea* sp., em Miami, Florida, EUA; *B. mcbridei* Baker, 1949, descrita de uma planta da família Juglandaceae, em Orlando, Florida, EUA; *B. papayensis* Baker, 1949, descrita de uma planta da família Caricaceae, em Kailua, Oahu, Havaí, EUA; *B. phoenicoides* Gonzalez, 1975, descrita de *Citrus reticulata*, Blanco, na Tailândia; e *B. yothersi* Baker, 1949, descrita de *Ligustrum* sp., em Orlando, Florida, EUA. Além disso, esses autores apontaram mais nove espécies que poderiam também constituir sinônimos júniores de *B. phoenicis*.

*Brevipalpus phoenicis* foi descrito por Geijskes em 1939, sob o nome inicial de *Tenuipalpus phoenicis* em uma planta da família Arecaceae (*Phoenix* sp.), posteriormente foi colocado no gênero *Brevipalpus* por Sayed em 1946. Em 1949 foi redescrito por Baker como *B. pseudocuneatus*, porém em 1965 voltou à denominação de *B. phoenicis* no trabalho de Duzgunes (Mesa *et al.* 2009). Diversas espécies foram consideradas sinônimos júniores de *B. phoenicis*. Atualmente *B. phoenicis* é considerado um complexo de espécies, e essas espécies vem sendo identificadas temporariamente como morfoespécies por Beard *et al.* (2013). Desde que confirmada a transmissão da leprose dos citros e de outras viroses por ácaros *Brevipalpus* nas Américas, *B. phoenicis* tem sido considerado como principal vetor dos mesmos. Recentemente, durante a

revisão taxonômica do gênero *Brevipalpus*, comparando espécimes com material tipo, especialistas verificaram que o táxon *B. phoenicis* não ocorre nas Américas, sendo este restrito a palmeiras do Norte da África e introduzidas na Europa. Na verdade, a espécie de *Brevipalpus* dominante nas Américas e o principal vetor da leprose dos citros é *Brevipalpus yothersi* Baker, 1949, o qual havia sido considerado sinônimo de *B. phoenicis*. O táxon *B. yothersi* está sendo revalidado (Ochoa, Comunicação pessoal 2014; Beard *et al.* 2014).

A principal dificuldade para a identificação taxonômica das espécies de *Brevipalpus* é a definição do que constitui variabilidade intra ou interespecífica. Um agravante, observado por Welbourn *et al.* (2003), é de que a aparência de algumas características morfológicas pode variar de acordo com a idade do indivíduo, alimentação e técnicas de montagem.

Além disso, autores tem levantado suspeita da ocorrência de espécies crípticas no gênero (Baker & Tuttle 1987; Welbourn *et al.* 2003; Rodrigues *et al.* 2004). Há a necessidade de estudos mais detalhados incluindo a utilização de novos caracteres morfológicos e de análises moleculares para buscar uma identificação mais acurada das espécies do gênero (Welbourn *et al.* 2003).

Alguns caracteres morfológicos que não vinham sendo explorados tem se mostrado úteis para a identificação de ácaros *Brevipalpus* (Beard *et al.* 2012, 2013; Navia *et al.* 2013).

A espermateca dos ácaros é composta por um ducto, o qual pode ser bastante longo, e uma extremidade distal, a qual seria o receptáculo seminal, a qual pode ser desenvolvida e apresentar uma forma característica. A forma da extremidade distal da espermateca (a que muitos autores se referem unicamente como “espermateca”) tem sido considerada importante na sistemática de vários grupos de ácaros plantícolas, como predadores da família Phytoseiidae (Chant & McMurtry 2007), e também fitófagos tetraniquídeos (Vacante 1983, 1984). Castagnoli (1974) foi a primeira autora a representar a espermateca para tenuipalpídeos, descrevendo essa estrutura para oito espécies, incluindo duas espécies de *Brevipalpus*: *B. californicus* e *B. olivicola* Pegazzano & Castagnoli 1972. Baker & Tuttle (1987) também descreveram a espermateca de algumas espécies de *Brevipalpus* do México. Em trabalhos recentes, Beard *et al.* (2012, 2013) apresentaram uma chave de identificação e informações taxonômicas foram disponibilizadas para 19 espécies de

*Brevipalpus*, incluindo como caráter taxonômico a presença (o desenvolvimento) e o formato da espermateca. Os estudos de taxonomia integrativa para *Brevipalpus* por Navia *et al.* (2013) evidenciaram que esse caráter é filogeneticamente informativo.

A partir de um detalhado estudo morfológico, utilizando microscopia óptica (contraste de interferência diferencial - DIC) e microscopia eletrônica de varredura (criovarredura), Beard *et al.* (2012, 2013) apresentaram a diferenciação de sete morfoespécies no grupo *phoenicis* e três morfoespécies do grupo *californicus*. Os autores informaram que a descrição das espécies está em elaboração. Beard *et al.* (2014) se referiam a essas espécies como pertencentes "aos complexos de espécies crípticas" de *B. phoenicis* e *B. californicus*, e informaram que algumas espécies descritas por Baker (1949) posteriormente consideradas sinônimas de *B. phoenicis*, serão revalidadas. Estudos de espécimes coletados em culturas agrícolas no estado de São Paulo também mostraram a presença de diferentes espécies dentro do fenótipo anteriormente considerado como *B. phoenicis* (Ochoa 2011).

### **1.2.7 Sistemática molecular de ácaros plantícolas**

A utilização de técnicas moleculares no estudo de ácaros plantícolas tem sido extremamente útil para o avanço na sistemática dos diversos grupos e estas técnicas podem ser utilizadas para a identificação de espécies (Navia *et al.* 2006; Ben-David *et al.* 2007; Okassa *et al.* 2011; Skoracka *et al.* 2012). Com a utilização de métodos moleculares pode-se realizar identificações a partir de um único indivíduo; podem ser utilizados indivíduos mortos, de qualquer gênero e qualquer estágio de desenvolvimento; e é possível a determinação de categorias subespecíficas e distinção de espécies crípticas (Gonzaga *et al.* 2014 in press). Informações sobre a variabilidade molecular permitem que a classificação taxonômica seja baseada nas relações filogenéticas entre os táxons (Hillis *et al.* 1996), o que é fundamental para a construção de uma sistemática consistente, baseada em grupos naturais.

Os trabalhos nos quais foram utilizados marcadores moleculares em estudos com ácaros começaram a ser publicados entre 1990 e 2000. Kaliszewski *et al.* (1992) utilizaram PCR ("Polymerase Chain Reaction" – Reação em Cadeia da Polimerase) para amplificar o DNA de 17 espécies de

ácaros de diferentes grupos. Para comparar os genomas destas 17 espécies os autores utilizaram um fragmento de 377 pb da região 18S do rRNA nuclear e um fragmento de 500 pb da região 16S do rRNA mitocondrial. O DNA destes fragmentos foi sequenciado. Seus dados indicaram que PCR poderia ser utilizado para obter informação de seqüências de ácaros de várias ordens, podendo auxiliar nos estudos filogenéticos. Neste trabalho também foram detalhados métodos para extração e amplificação de DNA de ácaros. Desde então os estudos tem se intensificado.

As famílias de ácaros de importância agrícola que tem sido foco de estudos com a aplicação de técnicas moleculares são, principalmente, Tetranychidae e Eriophyidae, dentre os fitófagos, e Phytoseiidae, dentre os predadores (Navajas & Fenton 2000; Navajas *et al.* 2000; Osakabe *et al.* 2002; Noronha *et al.* 2003; Tixier *et al.* 2006; Ben-David *et al.* 2007; Navajas & Navia 2010; Mendonça *et al.* 2011; Okassa *et al.* 2011; Tixier *et al.* 2011; Bowman & Hoy 2012; Skoracka *et al.* 2012; Tixier *et al.* 2012). Apesar da importância dos tenuipalpídeos, os trabalhos de sistemática molecular com essa família são bastante escassos quando comparados aos demais grupos de ácaros plantícolas (ver Rodrigues *et al.* 2003, Groot & Breeuwer 2006; Dowling *et al.* 2012; Navia *et al.* 2013).

As regiões mais utilizadas em sistemática molecular de diversos grupos de organismos, incluindo os ácaros são o DNA mitocondrial (*mtDNA*) e o DNA nuclear ribossomal (*rDNA*). Os fragmentos dessas regiões apresentam distintas propriedades, como taxas de evolução e formas de transmissão (maternal ou bi-parental, respectivamente). O *mtDNA* e o *rDNA* são utilizados principalmente para determinação de relações filogenéticas, identificação de espécies e análise de estruturas populacionais e genéticas (Navajas & Fenton 2000).

Deve-se considerar como as diferenças desses marcadores podem afetar suas habilidades na construção de filogenias (Navajas & Boursot 2003). Estudos filogenéticos baseados em resultados de um único marcador molecular são frágeis e podem conduzir a conclusões incorretas (Brower *et al.* 1996; Ross *et al.* 1999; Navajas & Boursot 2003). As filogenias, portanto, não devem ser construídas utilizando-se um único marcador, é importante comparar os resultados de marcadores com propriedades distintas para evitar

conclusões errôneas. Por exemplo, análises filogenéticas utilizando seqüências das regiões *COI* (Citocromo Oxidase I) do mtDNA e ITS2 (Internal transcriber space 2) do rDNA de duas espécies do gênero *Tetranychus* Dufour, *T. urticae* e *T. turkestanii* (Ugarov & Nikolskii, 1937), mostraram que estas espécies são polifiléticas para o mtDNA, mas monofiléticas para o rDNA. Os resultados indicam que, apesar da transmissão biparental e multiplicidade de cópias no genoma, o rDNA apresenta menor tamanho populacional efetivo que o mtDNA nessas espécies (Navajas & Boursot 2003). Os autores sugerem que a conjugação 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 seqüências da região *COI* do mtDNA, foram discordantes daquelas obtidas utilizando-se regiões do rDNA (Toda *et al.* 2000).

A região do DNA mitocondrial *COI* é muito variável, representando uma ótima ferramenta para os estudos evolutivos e têm sido utilizada no entendimento da estrutura de populações, fluxo gênico, hibridização, biogeografia e relações filogenéticas para os níveis taxonômicos de gênero e espécie (Lynch *et al.* 2006; Hebert *et al.* 2003; Avise *et al.* 1987). 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 que outras regiões são altamente conservadas, podendo diferentes regiões ser utilizadas em diferentes níveis taxonômicos. Em insetos, observa-se que a taxa de evolução dos genes mitocondriais é até duas vezes mais rápida que a dos genes nucleares (Hoy 1994). Folmer *et al.* (1994) desenharam um par de *primers* universal para a região *COI*, o qual possibilitou a amplificação de DNA de mais de 80 espécies de 11 diferentes filos de invertebrados, incluindo Arthropoda. Os *primers* desenvolvidos por Folmer *et al.* (1994) também foram utilizados com sucesso para ácaros, como no estudo de Dowling *et al.* (2012) no qual foi utilizado, juntamente com outros marcadores, com o intuito de solucionar dúvidas taxonômicas dentro do gênero *Raioella* (Tenuipalpidae).

Estudos filogenéticos baseados na região ITS do rDNA são indicados para distinção inter e intra específica, construção de filogenias e diagnóstico

molecular (Navajas *et al.* 1994, 1996, 2000, 2002; Hurtado *et al.* 2008; Mendonça *et al.* 2011; Skoracka *et al.* 2012). A região ITS2 é especialmente recomendada para a distinção entre espécies muito próximas em ácaros, incluindo os da superfamília Tetranychioidea, especialmente do gênero *Tetranychus* (Navajas *et al.* 1992, Ben-David *et al.* 2007).

Variabilidades intra- e interespecífica na família Tetranychidae têm sido estudadas utilizando-se sequências de ITS2 juntamente com sequências de *COI* do mtDNA (Navajas *et al.* 1994; Toda *et al.* 2000).

Além dessas regiões e marcadores, existem trabalhos de sistemática molecular de ácaros utilizando a região 28S (D1-D3) do rDNA. Essa região é muito conservada, portanto, esses genes são importantes para filogenia específica e de grupos superiores, e permitiram a definição de *primers* universais (Bae *et al.* 2008). O gene 28S é a maior região do rDNA; essa região é formada por cerca de 12 segmentos, conservados (“core”) ou hipervariáveis (“expansion”) (Hancock & Dover 1988). As sequências desses fragmentos podem ser usados para investigar relações filogenéticas entre espécies próximas (Dalbert 2006). Devido ao tamanho do gene, os estudos realizados focam em um ou vários desses segmentos, dependendo do grupo estudado e do objetivo do estudo. O fragmento D3 é um dos mais utilizados nos estudos do gene 28S de Acari. O seqüenciamento desse fragmento tem sido utilizado para definir a filogenia de outras ordens de quelicerados (Wheeler *et al.* 1998); para avaliar relações filogenéticas em ácaros oribatídeos (Maraun *et al.* 2003, 2004); e também para estabelecer a sistemática de complexos de espécies como no caso de *Acarus siro* Linnaeus, 1758 (Webster *et al.* 2004).

Informações sobre as subunidades do gene 28S têm sido utilizadas para ácaros juntamente com outros marcadores, como por exemplo: com a região *COI* do mtDNA para estudos de variabilidade do gênero *Raioella* sp. (Dowling *et al.* 2012).

### **1.2.8 Sistemática molecular de ácaros *Brevipalpus***

Até o momento os estudos filogenéticos para o gênero *Brevipalpus* foram baseados unicamente na região *COI* do mtDNA (Rodrigues *et al.* 2004; Groot & Breeuwer 2006; Navia *et al.* 2013). Estudos moleculares conduzidos

por Rodrigues *et al.* (2004) e Groot & Breeuwer (2006) utilizaram sequências da região *COI* do mtDNA para avaliar variabilidade genética e fazer inferências sobre a taxonomia de *Brevipalpus*. Em um estudo sobre a variabilidade genética de populações de *B. phoenicis* do Estado de São Paulo, Brasil e da Florida, EUA, Rodrigues *et al.* (2004) avaliaram marcadores RAPD e também sequências da região *COI*. As análises filogenéticas mostraram que as populações de São Paulo, Brasil, e da Florida, EUA, formam um grupo monofilético, e estão estruturadas de acordo com a origem geográfica. Groot & Breeuwer (2006) estudaram as relações filogenéticas entre populações do Brasil e da Holanda, incluindo representantes de populações que haviam sido previamente identificadas como *B. phoenicis*, *B. obovatus* e *B. californicus*. De acordo com esses autores, as deduções taxonômicas que poderiam ser feitas baseadas nas sequências de *COI* discordavam da taxonomia clássica, baseada na morfologia.

A região ITS2 tem sido extremamente promissora para a sistemática da família Tetranychidae (Navajas *et al.* 1992, 2000; Hurtado *et al.* 2008), podendo mesmo ser considerada a região *barcoding* para essa família, mas ainda não foi utilizada em estudos de sistemática molecular para os Tenuipalpidae.

As filogenias devem ser construídas a partir de informações de marcadores moleculares independentes, com propriedades distintas, de modo que a análise conjunta dos resultados conduza a um melhor entendimento das relações evolutivas entre as populações/táxons estudados (Navia *et al.* 2013).

### **1.2.9 Taxonomia integrativa**

A taxonomia integrativa busca evidências para separar ou agrupar espécies, unindo dados de diferentes áreas, como, por exemplo, a identificação morfológica e molecular, e visa a construção de  $\alpha$ -taxonomias consistentes. Portanto, trata-se de uma abordagem multidisciplinar (Bickford *et al.* 2007; Schlick-Steiner *et al.* 2010). A taxonomia integrativa não substitui a taxonomia tradicional, mas a inclui e a integra com outras informações, inclusive biológicas, possibilitando uma melhor identificação das espécies e compreensão de suas relações. Nos estudos com artrópodes as áreas mais exploradas são: morfologia (diferentes técnicas de microscopia), genética molecular (marcadores moleculares, como mt e rDNA; genoma completo),

ecologia, comportamento, biologia (compatibilidade reprodutiva, ciclo de vida), citogenética, química (ex. feromônios) (Schlick-Steiner *et al.* 2010).

No estudo de Heethoff *et al.* (2011) a abordagem integrativa, incluindo dados morfométricos, químicos e moleculares, foi utilizada para identificar diferentes linhagens dentro de um complexo de espécies de ácaros oribatídeos.

Estudos como o de Tixier *et al.* (2012), que utilizaram morfologia e genética molecular (mtDNA) para testar a existência de espécies crípticas no táxon de ácaros predadores fitoseídeos *Typhlodromus pyri* Scheuten, 1857 (Parasitiformes: Mesostigmata), ressaltaram a importância de uma abordagem integrativa para auxiliar na distinção e correta identificação de espécies dessa família.

Além de possibilitar diferenciação de espécies, a taxonomia integrativa também tem possibilitado o estabelecimento de sinonímias, como no trabalho de Tixier *et al.* (2011) com ácaros predadores fitoseídeos do gênero *Cydnodromus* (Parasitiformes: Mesostigmata).

A integração de dados moleculares (método de Pons para delimitação de espécies a partir de sequências da região *COI* do mtDNA) e de estudos morfológicos foi utilizada por Navia *et al.* (2013) para ácaros *Brevipalpus* de 29 populações do Brasil, Chile e EUA. Esse estudo possibilitou a compreensão de incongruências anteriormente apontadas por Groot & Breeuwer (2006); a determinação de caracteres diagnóstico adicionais para espécies de importância quarentenária; a identificação de espécies crípticas em *B. phoenicis*; e a descrição de uma nova espécie coletada em coqueiros no Brasil, nomeada como *B. incognitus*.

### 1.3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alberti, G. & Kitajima, E.W. (2014). *Anatomy and Fine Structure of Brevipalpus Mites (Tenuipalpidae) - Economically Important Plant-Virus Vectors*. Stuttgart: Schweizerbart Science Publishers (192p).
- 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.
- Bae, C.H., Szalanski, A.L. & Robbins, R.T. (2008). Molecular analysis of the lance nematode, *Hoplolaimus* spp., using the first Internal Transcribed Spacer and the D1 D3 expansion segments of 28S ribosomal DNA. *Journal of Nematology*, 40(3), 201-209.
- Baker, E.W. & Tuttle, D.M. (1987). The false spider mites of Mexico (Tenuipalpidae: Acari). *United States Department of Agriculture, Agricultural Research Service, Technical Bulletin*, 1706, 1-236.
- Baker, E.W. (1949). The genus *Brevipalpus* (Acarina: Pseudoleptidae). *The American Midland Naturalist*, 42(2), 350–402.
- Baker, E.W., D.M. Tuttle & M.J. Abatiello. (1975). The False spider mites of northwestern and north central Mexico (Acarina: Tenuipalpidae). *Smithsonian Contribution to Zoology*, 194, 1-23.
- Bastianel, M., Freitas-Astua, J., Kitajima, E.W. & Machado, M.A. (2006). The citrus leprosis pathosystem. *Summa Phytopathologica*, 32, 211-220.
- Beard, J. J., Ochoa, R., Redford, A. J., Trice, M.D., Walters, T. W. & Mitter, C. (2012). Flat mites of the World – Part I *Raoiella* and *Brevipalpus*.

- Identification Technology Program, CPHST, PPQ, APHIS, USDA; Fort Collins, CO, USA. 1<sup>o</sup> Ed. <http://idtools.org/id/mites/flatmites/>.
- Beard, J. J., Ochoa, R., Redford, A. J., Trice, M.D., Walters, T. W. & Mitter, C. (2013). Flat mites of the World – Part I *Raoiella* and *Brevipalpus*. Identification Technology Program, CPHST, PPQ, APHIS, USDA; Fort Collins, CO, USA. 2<sup>o</sup> Ed. <http://idtools.org/id/mites/flatmites/>.
- Beard, J.J., Ochoa, R., Bauchan, E.B. & Braswell, E. (2014). *Brevipalpus phoenicis* (Geijskes) species complex – resurrection of E.W. Baker's species (Acari: Tenuipalpidae). In *Abstract Book, XIV International Congress of Acarology, Kyoto, Japão, Julho 13-18, 2014*.
- 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.
- Bickford, D., Lohman, D. J., Sodhi, N. S., Ng, P. K. L., Meier, R., Winker, K., Ingram, K. K. & Das, I. (2007). Cryptic species as a window on diversity and conservation. *Trends in Ecology & Evolution*, 22, 148-155.
- Bowman, H.M. & Hoy, M.A., (2012). Molecular discrimination of phytoseiids associated with the red palm mite *Raoiella indica* (Acari: Tenuipalpidae) from Mauritius and south Florida. *Experimental and Applied Acarology*, 57, 395–407.
- 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.
- Castagnoli, M. (1974). La spermateca in alcune specie di Brevipalpini (Acarina, Tenuipalpidae). *Redia*, 55, 85–88.

- Chagas, C. M. (1973). A associação do ácaro *Brevipalpus phoenicis* (Geijskes) à mancha anular do cafeeiro. *O Biológico*, 39, 229-232.
- Chagas, C.M., Kitajima, E.W. & Rodrigues, J.C.V. (2003) Coffee ringspot virus vectored by *Brevipalpus phoenicis* (Acari: Tenuipalpidae) in coffee. *Experimental and Applied Acarology*, 30, 203–213.
- Chant, D.A. & McMurtry, J.A. (2007). *Illustrated keys and diagnoses for the genera and subgenera of the Phytoseiidae of the World* (Acari: Mesostigmata). West Bloomfield: Indira Publishing House (220p).
- Chiavegato, L.G. (1976). *Brevipalpus russulus* (Boisduval) Oudemans, 1938 (Acari: Tenuipalpidae) severa praga de cactáceas ornamentais. *Ciência e Cultura*, 28(3), 342-343.
- Childers, C.C. & Derrick, K.S. (2003). *Brevipalpus* mites as vectors of unassigned rhabdoviruses in various crops. *Experimental and Applied Acarology*, 30(1/3), 1-3.
- Childers, C.C., Rodrigues, J.C.V., Derrick, K.S., Achor, D.S., French, J.V., Welbourn, W.C., Ochoa, R. & Kitajima, E.W. (2003a). Citrus leprosis and its status in Florida and Texas: past and present. *Experimental and Applied Acarology*, 30, 181-202.
- Childers, C.C., Rodrigues, J.C.V. & Welbourn, W.C. (2003b). Host plants of *Brevipalpus californicus*, *B. obovatus* and *B. phoenicis* (Acari: Tenuipalpidae) and their potential involvement in the spread of one or more viruses. *Experimental and Applied Acarology*, 30(1/3), 29–105.
- Dalbert, M. (2006). DNA markers in the phylogenetics of the Acari. *Biological Lett*, 43(2), 97-107.

- De Castro, E. B. & Feres, R.J.F. (2013). New species of *Tenuipalpus* (Acari: Tenuipalpidae) from Semidecidual Forest remnants in the State of São Paulo, Brazil. *Zootaxa*, 3716(3), 475–493.
- Dowling, A.P.G., Ochoa, R., Beard, J.J., Welbourn, W.C. & Ueckermann, E.A. (2012). Phylogenetic investigation of the genus *Raoiella* (Prostigmata: Tenuipalpidae): diversity, distribution and world invasions. *Experimental and Applied Acarology*, 57(3-4), 257-69.
- Evans, G.A.; Cromroy, H.L.& Ochoa, R. (1993). The false spider mites of Honduras (Tenuipalpidae: ACARI). *Florida Entomology*, 76,126–155
- Fawcett, H. S. (1963) *Citrus diseases and their control*. New York: McGraw Hill (582p).
- Flechtmann, C.W. & Noronha, A.C.S. (2013). A new species of the genus *Tenuipalpus* (Prostigmata: Tenuipalpidae) with remarks on a conceivable ovipositor in flat mites. *Zootaxa*, 3681(4), 493–499.
- Folmer, O., Black, M., Hoeh, W., Lutz, R. & Vrijenhoek, R. (1994). DNA *primers* for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Molecular Marine Biology and Biotechnology*, 3(5), 294-299.
- Gonzaga, V., Benito, N. P., da Silva, M. L., Rocha, H. M. C., Navia, D. (2014). Quarentena Vegetal no Brasil. In: Vilela, E., Zucchi, R. A. (Eds.). *Pragas Introduzidas no Brasil – Insetos e Ácaros*. Piracicaba: Editora FEALQ, in press.
- Groot, T. V. M. & Breeuwer, J. A. J. (2006). *Cardinium* symbionts induce haploid thelytoky in most clones of three closely related *Brevipalpus* species. *Experimental and Applied Acarology*, 39, 257-271.

- Hancock J. M. & Dover G. A. (1988). Molecular coevolution among cryptically simple expansion segments of eukaryotic 26S/28S rRNAs. *Molecular Biology and Evolution*, 5, 377–391.
- Hebert, P. D. N., Ratnasingham. S. & De Waard, J. R. (2003). Barcoding animal life: cytochrome c oxidase subunit I divergences among closely related species. *Proceedings of the Royal Society of London Biological Sciences*, 270, S96-S99.
- Heethoff, M., Laumann, M., Weigmann, G. & Raspotnig, G. (2011). Integrative taxonomy: Combining morphological, molecular and chemical data for species delineation in the parthenogenetic *Trhypochthonius tectorum* complex (Acari, Oribatida, Trhypochthoniidae). *Frontiers in Zoology*, 8:2.
- Helle, W. & Sabelis, M.W. (1985). Spider mites: their biology, natural enemies and control. *World Crop Pests*. Vol. 1A & 1B, Elsevier Science Publishers, Amsterdam.
- Hillis, D.M., Moritz, G. & Mable, B.K. (1996). *Molecular Systematics*. Massachusetts, USA: Sinauer Associates (655p).
- Hoy, M. A. (1994). *Insect molecular genetics: an introduction to principles and applications*. San Diego: Academic Press (546p).
- Hoy, M. A. (2011). *Agricultural Acarology: Introduction to Integrated Mite Management*. CRC Press (114p).
- 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.

- Jeppson, L. R. 1989. Biology of citrus insects, mites and mollusks. In W. Reuther, E. C. Calavan, & G. E. Carman (eds.), *The citrus industry*, vol. 4. (pp. 1-81). The Regents of the University of California, Oakland, CA.
- Jeppson, L.R, Keifer, H.H. & Baker, E.W. (1975). *Mites Injurious to Economic Plants*. University of California Press: Berkeley (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.
- Keifer, H.H. (1952). The eriophyid mites of California. *Bull. Calif. Insect Survey* 2, No. 1. 123p.
- Kitajima, E.W., Chagas, C.M. & Rodrigues, J.C. (2003). *Brevipalpus*-transmitted plant virus and virus-like diseases: cytopathology and some recent cases. *Experimental and Applied Acarology*, 30(1/3), 135–160.
- Kitajima, E.W., Rezende, J.A.M., Rodrigues, J.C.V., Chiavegato, L.G., Piza Jr., C.T. & Morozini, W. (1997). Green spot of passion fruit, a possible viral disease associated with infestation by the mite *Brevipalpus phoenicis*. *Fitopatologia Brasileira*, 22, 555–559.
- Kitajima, E. W., Rodrigues, J. C. V. & Freitas-Astua, J. (2010). An annotated list of ornamentals naturally found infected by *Brevipalpus* mite-transmitted viruses. *Scientia Agricola*, 67(3), 348-371.
- Krantz G. W. & Walter, D. E. (2009). *A Manual of Acarology*. Texas Tech University Press, 3ª Edição (807p).
- Lindquist, E. E., Sabelis, M. W. & Bruin, J. (Editors). (1996). *Eriophyoid Mites: Their Biology, Natural Enemies and Control*. World Crop Pests, Vol. 6. Elsevier Science Publishers, Amsterdam. 790 p.

- Lynch, M., Koskella, B. & Schaack, S. (2006). Mutation pressure and the evolution of organelle genomic architecture. *Science*, 311, 1727-1730.
- Maeda, T., Kondo, H., Misuhata, K. & Tamada, T. (1998). Evidence that orchid fleck virus is efficiently transmitted in a persistent manner by the mite *Brevipalpus californicus*. In *International Congress of Plant Pathology*, 7., Edinburgh.
- Maraun M., Heethoff M., Scheu S., Norton R. A., Weigmann G. & Thomas R. H. (2003). Radiation in sexual and parthenogenetic oribatid mites (Oribatida, Acari) as indicated by genetic divergence of closely related species. *Experimental and Applied Acarology*, 29: 265–277.
- Maraun M., Heethoff M., Schneider K., Scheu S., Weigmann G., Cianciolo J., Thomas R. H. & Norton R. A. (2004). Molecular phylogeny of oribatid mites (Oribatida, Acari): evidence for multiple radiations of parthenogenetic lineages. *Experimental and Applied Acarology*, 33: 183–201.
- Mendonca, R.S., Navia, D., Diniz, I.R., Auger, P. & Navajas, M. (2011). A critical review on some closely related species of *Tetranychus* sensu stricto (Acari: Tetranychidae) in the public DNA sequences databases. *Experimental and Applied Acarology*, 55(1), 1-23.
- Mesa, N.C., Ochoa, R., Welbourne, W.C., Evans, G.A. & Moraes, G.J. (2009). A catalog of the Tenuipalpidae (Acari) of the world with a key to genera. *Zootaxa*, 2098, 1-185.
- Mesa, N. C. (2005). Ácaros Tenuipalpidae (Acari: Prostigmata) no Brasil, novos relatos para América do Sul e o Caribe e variabilidade morfológica e morfométrica de *Brevipalpus phoenicis* (Geijskes). Tese (Doutorado em Ciências/Entomologia). Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2005 (393 p.).

- Meyer, M.K.P. (1979). The Tenuipalpidae (Acari) of Africa with keys to the world fauna. *Entomology Memoir, Department of Agriculture Republic South Africa, Pretoria*, 50, 1–133.
- Miranda, L. C. 2008. Sistemática morfológica e molecular de ácaros fitófagos do gênero *Brevipalpus* Donnadieu de importância econômica e quarentenária para o Brasil. Dissertação (Mestrado em Agronomia)- Universidade de Brasília, Brasília, 2008 (154 p.).
- Moraes, G. J. & Flechtmann, C. H. W. (2008). *Manual de Acarologia – Acarologia Básica e Ácaros de Plantas Cultivadas no Brasil*. Holos Editora, Ribeirão Preto. 308p.
- Musumeci, M.R. & Rosseti, V. (1963). Transmissão dos sintomas da leprose dos citros pelo ácaro *Brevipalpus phoenicis*. *Ciência e Cultura*, 15(3), 228.
- 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. & 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., 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., 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., 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., 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.
- Navajas, M. & Navia, D. (2010). DNA-based methods for eriophyoid mite studies: review, critical aspects, prospects and challenges. *Experimental and Applied Acarology*, 51, 257–271.
- Navia, D., Mendonça, R.S., Ferragut, F., Miranda, L.C., Trincado, R.C., Michaux, J. & Navajas, M. (2013). Cryptic diversity in *Brevipalpus* mites (Tenuipalpidae). *Zoologica Scripta*, 42(4), 406-426.
- Navia, D., Moraes, G. J. & Flechtmann, C. H. W. (2006). Phytophagous mites as invasive alien species: quarantine procedures. In J. B. Morales-Malacara, V. Behan-Pelletier, E. Ueckermann, T. M. Pérez, E. Estrada, C. Gispert & M. Badii (Eds). *Proceedings of the XI International Congress of Acarology, Acarology XI*. (pp. 87-96). Mexico DF: UNAM/ Sociedad Latinoamericana de Acarología.

- 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.
- Ochoa, R. & Salas, L. (1989). The genus *Brevipalpus* in Costa Rica (Acari: Tenuipalpidae). *International Journal of Acarology*, 15(1),21–30.
- Ochoa, R., Aguilar, H. & Vargas, C. (1994). *Phytophagous Mites of Central America: an Illustrated Guide*. CATIE, Serie tecnica, manual tecnico no. 6 English ed. 234 p.
- Ochoa, R. (2011). *Brevipalpus phoenicis* no Brasil. Quem é? In: *Simpósio Brasileiro de Acarologia*, 3, Campinas, São Paulo.
- Okassa, M., Kreiter, S., Guichou, S. & Tixier M. S. (2011). Molecular and morphological boundaries of the predator *Neoseiulus californicus* McGregor (Acari: Phytoseiidae). *Biological Journal Linnean Society*,104, 393–406.
- 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*,1A (p.259-275). Amsterdam, The Netherlands: Elsevier Science Publisher.
- Omoto, C. (1999). Acaricide resistance management of leprosis mite (*Brevipalpus phoenicis*) in Brazilian citrus. *Pesticide Science*, 52, 189-198.
- Osakabe, M.H., 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.

- Quirós-González, M. J. (1985). A systematic and phylogenetic analysis of the world genera of Tenuipalpidae Berlese (Acari: Tetranychoida). PhD. Thesis. Maryland: University of Maryland. 429 pp.
- Rodrigues, J.C., Gall-Meagher, M., Ochoa, R., Childers, C.C. & Adams, B.J. (2004). Mitochondrial DNA and RAPD polymorphisms in the haploid mite *Brevipalpus phoenicis* (Acari: Tenuipalpidae). *Experimental and Applied of Acarology*, 34, 275–290.
- Rodrigues, J.C., Kitajima, E.W., Childers, C.C. & Chagas, C.M. (2003). Citrus leprosis virus vectored by *Brevipalpus phoenicis* (Acari: Tenuipalpidae) in citrus in Brazil. *Experimental and Applied of Acarology*, 30(1/3), 161–179.
- Rodrigues, J.C.V. & Nogueira, N.L. (1996). Ocorrência de *Brevipalpus phoenicis* G. (Acari: Tenuipalpidae) em *Ligustrum lucidum* (Oleaceae) associado à mancha anelar do ligustro. *Anais da Sociedade Entomológica do Brasil*, 25, 263-264.
- 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.
- Salva, R.A. & Massari, C.A. (1995). Situação do ácaro da leprose no Estado de São Paulo, levantamento – Fundecitrus, agosto 1995. In C.A.L. de Oliveira and L.C. Donadio (eds), pp. 13–18. Leprose dos citros. Jaboticabal, Funep., SP, Brazil.
- Schlick-Steiner, B. C., Steiner, F.M., Seifert, B., Stauffer, C., Christian, E. & Crozier, R. H. (2010). Integrative Taxonomy: A Multisource Approach to Exploring Biodiversity. *Annual Review of Entomology*, 55, 421-438.

- Skoracka, A., Kuczynski, L., Mendonca, R.S., Mirosława, D., Szydło, W., Knihinicki, D., Truol, G. & Navia, D. (2012) Cryptic species within the wheat curl mite *Aceria tosichella* (Keifer) (Acari: Eriophyoidea), revealed by mitochondrial, nuclear and morphometric data. *Invertebrate Systematics*, 26, 417–433.
- Slykhuis, J.T. (1963). Mite transmission of plant viruses. In J.A. Naegele (ed.), *Advances in Acarol*, vol. 1, pp. 326–340. Comstock Pub. Assoc., Cornell University Press, Ithaca. *Smithsonian Contributions to Zoology*, 194, 1–22.
- Tixier, M. S., Mireille, O. & Kreiter, S. (2012). An integrative morphological and molecular diagnostics for *Typhlodromus pyri* (Acari: Phytoseiidae). *Zoologica Scripta*, 41, 68-78.
- 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.
- Tixier, M.S., Tsolakis, H., Ragusa, S., Poinso, A., Ferrero, M., Okassa, M. & Kreiter, S. (2011). Integrative taxonomy demonstrates the unexpected synonymy between two predatory mite species: *Cydnodromus idaeus* and *C. picanus* (Acari : Phytoseiidae). *Invertebrate Systematics*, 25(4), 273-281.
- 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.
- Vacante, V. (1983). Prima raccolta di acari Tetranychidi in Sicilia. *Phytophaga*, 1, 41-132.
- Vacante, V. (1984). Note sul Briobiiniitaliani (Acari: Tetranychidae) I. *Frustula Entomologica*, 7 (8), 559-573.

- Van Leeuwen, T., Vontas, J., Tsagkarakou, A., Dermauw, W. & Tirry, L. (2010). Acaricide resistance mechanisms in the two-spotted spider mite *Tetranychus urticae* and other important Acari: A review. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 40, 563-572.
- Vasconcelos, G.J., Silva, F.R., Barbosa, D.G.F., Gondin Junior, M.G.C. & Moraes, G.J. (2005). Ocorrência de Eriophyoidea, Tenuipalpidae, Tarsonemidae e Tuketrellidae (Acari) em fruteiras no Estado de Pernambuco, Brasil. *Caatinga*, 18(2), 98-104.
- Walkey, D.G.A. (1991). *Applied Plant Virology*. Chapman & Hall, London. 338p.
- Walter D. E. & Proctor, H. C. (1999). *Mites: Ecology evolution and behaviour*. Wallingford, Oxon, UK: CAB International. 322p.
- Webster, L. M., Thomas, R. H. & McCormack, G. P. (2004). Molecular systematics of *Acarus siro* s. lat., a complex of stored food pests. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 32, 817–22.
- Welbourn, W.C., Ochoa, R., Kane, E.C. & Erbe, E.F. (2003). Morphological observations on *Brevipalpus phoenicis* (Acari: Tenuipalpidae) including comparisons with *B. californicus* and *B. obovatus*. *Experimental and Applied Acarology*, 30(1/3), 107–133.
- Wheeler, W. C., Ward, C., Hayashi, C. Y. & Cheryl, Y. (1998). The phylogeny of the extant chelicerate orders. *Cladistics*, 14, 173–192.

## CAPÍTULO 2

### SISTEMÁTICA MOLECULAR PARA ÁCAROS PLANOS DO GÊNERO *BREVIPALPUS* DONNADIEU (ACARI: TENUIPALPIDAE) – UTILIZAÇÃO DE MARCADORES MOLECULARES MITOCONDRIAIS E NUCLEARES

#### 2.1 INTRODUÇÃO

Os ácaros tenuipalpídeos (Prostigmata: Tenuipalpidae), também conhecidos como ácaros planos, devido à forma de seus corpos achatados dorso-ventralmente, estão entre os principais grupos de fitófagos (Jeppson *et al.* 1975; Moraes & Flechtmann 2008; Hoy 2011). *Brevipalpus* Donnadieu é um dos principais gêneros em Tenuipalpidae, tanto em número de espécies, com cerca de 280 espécies válidas (Mesa *et al.* 2009), quanto pela importância econômica de algumas de suas espécies (Jeppson *et al.* 1975; Jeppson 1989; Childers *et al.* 2003b; Welbourn *et al.* 2003; Kitajima *et al.* 2010; Moraes & Flechtmann 2008; Hoy 2011).

Os *Brevipalpus* podem causar danos diretos aos seus hospedeiros, devido à alimentação de colônias numerosas (Vasconcelos *et al.* 2005; Moraes & Flechtmann 2008). Entre as hospedeiras afetadas diretamente estão: mandioca, graviola, cajueiro, caquizeiro, goiabeira, mamoeiro, maracujazeiro, antúrio, azaléia e cactáceas (Moraes & Flechtmann 2008). Os sintomas mais comuns causados pelas infestações por *Brevipalpus* são folhas amarronzadas, podendo ocorrer queda prematura; bronzeamento dos frutos; manchas marrons alongadas nas regiões atacadas; e folhas pequenas que se tornam amareladas e secam prematuramente (Moraes & Flechtmann 2008). Entretanto os principais danos causados por esses ácaros são indiretos, devido à transmissão de fitovírus, conhecidos como VTBs (Vírus Transmitidos por *Brevipalpus*). Alguns VTBs afetam culturas importantes, como o citros, pelos *Citrus leprosis virus cytoplasmic type* (CiLV-C) e o *Citrus leprosis virus nuclear type* (CiLV-N) (Fawcett 1963; Chagas *et al.* 2003; Kitajima *et al.* 2003; Rodrigues *et al.* 2003); o café, pelo *Coffee ringspot virus* (CoRSV) (Chagas 1973); e o maracujá, pelo *Passion fruit green ringspot virus* (PFGSV) (Kitajima *et al.* 1997). O número de registros de VTBs vem crescendo e já são registradas infecções em quase 40 espécies de plantas, de 17 famílias de

mono e dicotiledôneas, incluindo um grande número de frutíferas, ornamentais e florestais (Kitajima *et al.* 2010).

As cinco espécies de *Brevipalpus* de maior importância econômica são: *Brevipalpus phoenicis* (Geijskes, 1939), *B. obovatus* (Donnadieu, 1875), *B. californicus* (Banks, 1904), *B. chilensis* Baker, 1949 e *B. lewisi* McGregor, 1949 (Childers *et al.* 2003b). As três primeiras espécies têm sido consideradas altamente polífagas, sendo listadas como suas hospedeiras 928 espécies de plantas, em 513 gêneros, distribuídos em 139 famílias (Childers *et al.* 2003a). Outras espécies são relatadas em um menor número de hospedeiros (Mesa *et al.* 2009).

Devido à sua importância como pragas, algumas espécies de *Brevipalpus* são regulamentadas por diversos países como quarentenárias. Dessa forma são estabelecidos requerimentos fitossanitários para o trânsito de material vegetal, incluindo o comércio internacional de frutos (Navia *et al.* 2006). Um exemplo é o ácaro *B. chilensis*, de distribuição ainda restrita ao Chile e Argentina, (Mesa *et al.* 2009; Beard *et al.* 2013) regulamentado por vários países na América do Sul (incluindo Brasil) e América do Norte, Europa e Ásia (Navia *et al.* 2006; Cheraghian 2013).

A taxonomia dos ácaros *Brevipalpus*, especialmente das espécies de importância econômica, tem representado um desafio para acarologistas. A grande variabilidade intraespecífica tem resultado em numerosas sinonímias (Mesa *et al.* 2009). Vários autores tem levantado hipóteses (Welbourn *et al.* 2003; Rodrigues *et al.* 2004; Groot & Breeuwer 2006) ou mesmo confirmado a ocorrência de espécies crípticas (Navia *et al.* 2013). A acurada identificação dos *Brevipalpus* é fundamental para compreensão do papel de cada espécie na transmissão dos VTBs; para a determinação dos hospedeiros de cada espécie; e para a definição de medidas de prevenção e controle.

A sistemática de *Brevipalpus* está em revisão. Estudos morfológicos detalhados, com a utilização de microscópio óptico com contraste de interferência diferencial (DIC) e de microscopia eletrônica de varredura têm possibilitado um imenso avanço na taxonomia do grupo. Caracteres morfológicos, como a forma da espermateca, representadas por alguns autores no passado (ver Castagnoli 1974; Baker & Tuttle 1987), e que não vinham sendo utilizados para a identificação específica (ver Welbourn *et al.* 2003), tem

se mostrado extremamente úteis (Beard *et al.* 2012, 2013) e filogeneticamente informativos (Navia *et al.* 2013). Detalhes da ornamentação dorsal e ventral, tamanho e forma das setas do opistossoma e das pernas têm ajudado na distinção das espécies (Beard *et al.* 2013; Navia *et al.* 2013). Morfoespécies que compõem complexos de espécies *B. phoenicis* e *B. californicus* estão sendo descritas. Além disso, espécies consideradas, no passado, sinônimos de *B. phoenicis* serão reavaliadas (Beard *et al.* 2013, 2014).

Em uma abordagem integrativa, além dos estudos morfológicos, será extremamente importante dispor de ferramentas adicionais para a construção da filogenia dos ácaros *Brevipalpus*, como dados moleculares e biológicos. Integrados aos estudos morfológicos, os dados moleculares possibilitarão um avanço na determinação de distâncias genéticas dentro e entre táxons (intra vs interespecífica), o que representa uma das maiores dificuldades na taxonomia de *Brevipalpus*. Além disso, as análises filogenéticas trarão informações sobre as relações evolutivas entre os táxons, subsidiando a construção de uma sistemática consistente para o grupo, baseada em grupos naturais.

Até o momento poucos trabalhos de sistemática molecular para ácaros *Brevipalpus* foram conduzidos (Rodrigues *et al.* 2004; Groot & Breeuwer 2006; Navia *et al.* 2013). Nesses trabalhos uma única região do genoma foi explorada, a Citocromo Oxidase I (COI), do DNA mitocondrial, amplificada com *primers* (oligonucleotídeos sintéticos iniciadores) utilizados por Navajas *et al.* (1998). A utilização de marcadores moleculares independentes, com distintas taxas de evolução e modos de hereditariedade, possibilitam um melhor entendimento das relações entre os táxons estudados e, conseqüentemente, proporcionam maior consistência para as filogenias (ver Navajas *et al.* 1994; Toda *et al.* 2000; Navajas & Boursot 2003; Dowling *et al.* 2012).

## OBJETIVOS

### OBJETIVOS GERAIS

Contribuir para o avanço da sistemática molecular de ácaros *Brevipalpus*. Serão desenvolvidos protocolos de extração e amplificação de DNA; e avaliadas e comparadas as filogenias obtidas a partir de sequências de diferentes regiões do genoma, incluindo marcadores mitocondriais e nucleares.

### OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1) Avaliar protocolos de extração de DNA, a partir de um único indivíduo;
- 2) Avaliar diferentes *primers* e aperfeiçoar protocolos para amplificação de quatro regiões do genoma de *Brevipalpus*. Duas regiões do DNA mitocondrial localizadas no gene *citocromo c oxidase I (COI)*: uma amplificada com os primers DNF & DNR e outra com os primers LCO & HCO na região do “barcoding”; e duas regiões do DNA ribossômico nuclear: a região intergênica, espaçador interno transcrito 2 (ITS2) e a subunidade D1-D3 do gene 28S (D1-D3);
- 3) Comparar filogenias obtidas a partir de sequências das regiões do genoma mitocondrial e ribossômico nuclear;
- 4) Determinar as distâncias genéticas intra e interespecíficas para as quatro regiões do genoma estudadas;
- 5) Integrar informações morfológicas e moleculares para identificação de espécies de três grupos de ácaros do gênero *Brevipalpus* e avaliar os caracteres morfológicos num contexto filogenético.

## 2.2 MATERIAIS E MÉTODOS

O projeto foi conduzido na Unidade de Diagnóstico Molecular do Laboratório de Quarentena Vegetal (LQV), da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília, Distrito Federal.

### 2.2.1 Amostras

Amostras de ácaros *Brevipalpus* foram coletadas por membros da equipe ou colaboradores nacionais e internacionais. A coleta de amostras no Brasil, pela Dra. Denise Návia, foi realizada com a Licença Permanente para Coleta de Material Zoológico (No. 20650-1), concedida pelo Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBio), Ministério do Meio Ambiente (MMA), para a coleta de ácaros da Ordem Trombidiformes. No caso dos colaboradores internacionais, os ácaros foram enviados mortos, preservados em álcool etílico, de modo que não representaram risco fitossanitário ao país. Foram recebidas amostras da Espanha, coletadas pelo Dr. Francisco Ferragut; da Argentina, de Israel, do Chile e de São Paulo, Brasil, coletadas pelo Dr. Elliot W. Kitajima & Msc. Aline Tassi; do Chile, coletadas pelo Dr. Roberto Trincado; de Pernambuco, coletadas pelo Dr. Manoel Guedes Correa Gondim Jr.; e de Minas Gerais, coletadas pela Dra. Rosa de Belém das Neves Alves.

Foram coletadas amostras de folhas e/ou ramos de plantas hospedeiras potenciais de ácaros *Brevipalpus*, em sua maioria frutíferas e ornamentais, utilizando uma lupa de mão (20x) para verificar a presença de ácaros tenuipalpídeos. A presença de sintomas de VTBs também foi observada para direcionar a coleta em hospedeiros afetados pelos mesmos. As amostras de folhas e/ou ramos foram coletadas com tesoura de poda e acondicionadas em sacos de papel ou plástico para o transporte até o laboratório. Em laboratório a inspeção das amostras de plantas foi realizada ao microscópio estereoscópico (aumento de 40X), observando-se as superfícies de folhas e ramos. Os ácaros *Brevipalpus* foram coletados com a utilização de um estilete fino ou pincel de cerda única. Os espécimes foram armazenados em álcool etílico absoluto (100%), a -20°C, para condução das análises moleculares; e em álcool etílico a

70%, para posterior preservação em preparações microscópicas e identificação morfológica.

Foram obtidas amostras de 25 populações de *Brevipalpus*, pertencentes a quatro grupos - *phoenicis*, *californicus*, *obovatus* e *cuneatus* (de acordo com Baker & Tuttle 1987) -, de cinco países (Argentina, Brasil, Chile, Espanha, e Israel). No Brasil as amostras foram provenientes de cinco Estados nas Regiões Norte, Nordeste, e Sudeste. As amostras foram coletadas em 22 plantas hospedeiras, de 18 famílias botânicas, incluindo mono e dicotiledôneas. Detalhes de coletas das populações estudadas nesse trabalho estão na Tabela 2.1.

### 2.2.2 Identificação Morfológica

De cada população, sempre que possível, foram preservados um mínimo de 25 espécimes para identificação morfológica, adultos e/ou imaturos. Os ácaros foram preservados em lâminas de microscopia, montados em posição dorso-ventral, em meio Hoyer e/ou Heinz PVA. Da mesma forma foram preservados os espécimes recuperados das colunas de extração de DNA após a finalização dos procedimentos.

A identificação dos táxons e/ou grupos de *Brevipalpus* foi realizada pelos membros da equipe Dr. Francisco Ferragut e pela Dra. Denise Navia.

A identificação foi realizada ao microscópio óptico de contraste de fase e de interferência diferencial (DIC) (Nikon Eclipse 80i) (40x e 100x), consultando-se a bibliografia pertinente, incluindo descrições originais e as chaves ilustradas Flat Mites of the World (Beard *et al.* 2012, 2013). A identificação dos grupos de *Brevipalpus* foi realizada de acordo com Baker & Tuttle (1987). Algumas espécies foram identificadas com a nomenclatura das morfoespécies identificadas por Beard *et al.* (2012, 2013).

Após a identificação foram tomadas imagens digitais de caracteres taxonômicos dos diferentes táxons. As fotos foram tiradas com câmera digital (Nikon DS-Ri1-U3, 12.6 megapixels) acoplada ao microscópio óptico e conectada a um computador onde está instalado o programa de captura de imagens.

Todo o material estudado foi depositado como espécimes *voucher* (isto é, espécimes testemunhas usados nas análises de DNA) na coleção de ácaros da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Embrapa, Brasília, Brasil.

**Tabela 2.1:** Dados de coleta (localidade, hospedeiros, coletores e datas) das amostras de ácaros *Brevipalpus* obtidas nesse estudo, número de lâminas e espécimes preservados, e identificação morfológica.

Código da Amostra	Hospedeiro	Localidade	Latitude, Longitude	Coletor	Data	Lâminas (No. espécimes)	Identificação Morfológica
BRRR Anmu	Graviola - <i>Annona muricata</i> (Annonaceae)	Bonfim, RR, Brasil	+03° 21' 36", -59° 49' 59"	Denise Navia	15.07.2009	8 (40)	<i>B. incognitus</i>
BRRR Conu	Coco - <i>Cocos nucifera</i> (Arecaceae)	Pacaraima, RR, Brasil	+04° 25' 52", -61° 08' 46"	Denise Navia	14.07.2009	4 (20)	<i>B. incognitus</i>
BRPE Hiro	Hibisco - <i>Hibiscus rosa-sinensis</i> (Malvaceae)	UFRPe, Recife, PE, Brasil	-8° 0' 53.14", -34° 56' 59.16"	Manoel G. C. Gondim Jr. & Denise Navia	27.07.2012	8 (40)	<i>B. yothersi</i> e <i>B. grupo californicus</i> sp.
BRMG Conu	Coco - <i>Cocos nucifera</i> (Arecaceae)	UNIMONTES, Janaúba, MG, Brasil	-15° 50' 18.60", -43° 24' 48.11"	Rosa de Belém das Neves Alves	09. 2012	10 (50)	<i>B. incognitus</i>
BRRO Cepa	Embaúba - <i>Cecropia pachystachya</i> (Cecropiaceae)	Guajará Mirim, RO, Brasil	-10° 24' 4.96", -65° 24' 51.94"	Denise Navia, Francisco Ferragut	09. 2012	1 (5)	<i>B. yothersi</i>
ES Cisi	Laranja - <i>Citrus sinensis</i> (Rutaceae)	Palma del Rio, Cordoba, Espanha	+37° 41' 58.72", -5° 16' 51.00"	Francisco Ferragut	10. 2011	1 (5)	<i>B. grupo californicus</i> espécie A
ES Teca	<i>Tecomaria capensis</i> (Bignoniaceae)	Valência, Espanha	+39° 30' 3.10", -0° 22' 15.66"	Francisco Ferragut, Denise Navia	1.10.2011	2 (10)	<i>B. grupo phoenicis</i> espécie F
ES Myla	<i>Myoporum laetum</i> (Scrophulariaceae)	Valência, Espanha	+39° 30' 3.10", -0° 22' 15.66"	Francisco Ferragut, Denise Navia	1.10.2011	2 (10)	<i>B. grupo phoenicis</i> espécie F
ES Pito	<i>Pittosporum tobira</i> (Pittosporaceae)	Valência, Espanha	+39° 30' 3.10", -0° 22' 15.66"	Francisco Ferragut, Denise Navia	1.10.2011	2 (10)	<i>B. grupo phoenicis</i> espécie F e <i>B. grupo californicus</i> espécie B
BRAL Ipba	Batata-doce - <i>Ipomoea batatas</i> (Convolvulaceae)	Arapiraca, AL, Brasil	-09° 45' 09", -36° 39' 40"	Denise Navia, Edmilson S. Silva	05. 2013	10 (50)	<i>B. yothersi</i>
BRSP Sovi	Solano-violeta - <i>Solanum violaeifolium</i> (Solanaceae)	Colônia na ESALQ, Piracicaba, SP, Brasil	-22° 43' 31", -47° 38' 57"	Elliot W. Kitajima	28.05.2013	2 (10)	<i>B. obovatus</i>
BRSP Phsp	Tamareira anã - <i>Phoenix sp.</i> (Arecaceae)	Av. Independência, Piracicaba. SP, Brasil	-22° 43' 31", -47° 38' 57"	Elliot W. Kitajima	31.05.2013	2 (10)	<i>B. yothersi</i> e <i>B. incognitus</i>
BRSP Dere	Flamboyant - <i>Delonix regia</i> (Fabaceae)	Campus ESALQ, Piracicaba, SP, Brasil	-22° 43' 31", -47° 38' 57"	Elliot W. Kitajima	02.06.2013	3 (15)	<i>B. yothersi</i>
ES Ersp	<i>Erica sp.</i> (Ericaceae)	Almedijar, Sierra de Espadan - Castellon - Espanha	+39° 55' 8.18", -0° 23' 37.22"	Denise Navia, Francisco Ferragut	09.07.2013	6 (30)	<i>B. grupo cuneatus</i> sp. 2
AR Cicl	Tangerina-Clementina - <i>Citrus clementina</i> (Rutaceae)	Bella Vista, Corrientes, Argentina	-34° 33' 49.34", -58° 41' 25.43"	Elliot W. Kitajima	26.11.2013	2 (10)	<i>B. yothersi</i>
AR Cisi	Laranja - <i>Citrus sinensis</i> (Rutaceae)	Bella Vista, Corrientes, Argentina	-34° 33' 49.34", -58° 41' 25.43"	Elliot W. Kitajima	26.11.2013	3 (15)	<i>B. yothersi</i> e <i>B. grupo ?</i> sp.
IS Paed	Maracujá - <i>Passiflora edulis</i> (Passifloraceae)	Israel		Tusila Ben David	26.11.2013	1 (5)	<i>B. yothersi</i>
ES Roof	Alecrim - <i>Rosmarinus officinalis</i> (Lamiaceae)	Úmbria de los Fresnos (Mijares), Valência, Espanha	+39° 28' 11.67", -0° 22' 34.64"	Denise Navia, Francisco Ferragut	12.10.2013	2 (10)	<i>B. grupo cuneatus</i> sp. 1
ES Hest	<i>Helichrysum stoechas</i> (Asteraceae)	El Saler, Valência, Espanha	+39° 22' 57.00", -0° 19' 57.00"	Denise Navia, Francisco Ferragut	13.10.2013	5 (25)	<i>B. obovatus</i>
ES Cobo	<i>Coniza bonariensis</i> (Asteraceae)	El Saler, Valência, Espanha	+39° 22' 57.00", -0° 19' 57.00"	Denise Navia, Francisco Ferragut	13.10.2013	6 (30)	<i>B. obovatus</i>
ES Oleu	Oliveira - <i>Olea europea</i> (Oleaceae)	Jardín del Real, Valência, Espanha	+39° 28' 50.74", -0° 22' 3.78"	Denise Navia, Francisco Ferragut	16.10.2013	1 (5)	<i>B. oleae</i>
CHT Mggr	<i>Magnolia grandiflora</i> (Magnoliaceae)	San Francisco de Mostazal, Cachapoal, Chile	-33° 54' 58.38", -70° 40' 31.22"	Roberto Trincado	18.02.2013	1 (5)	<i>B. chilensis</i>
CH Lisi	Ligustro - <i>Ligustrum sinensis</i> (Oleaceae)	Curacavi, Santiago, Chile	-33° 28' 9.80", -70° 43' 26.14"	Roberto Trincado	28.02.2013	1 (5)	<i>B. chilensis</i>
CH Mggr	<i>Magnolia grandiflora</i> (Magnoliaceae)	San Francisco de Mostazal, Cachapoal, Chile	-33° 54' 58.38", -70° 40' 31.22"	Elliot W. Kitajima	08.05.2014	1 (5)	<i>B. chilensis</i>
CH Ripu	<i>Ribes punctatum</i> (Grossulariaceae)	Parque Fray Jorge, Limarí, Chile	-33° 37' 6.21", -70° 42' 25.40"	Elliot W. Kitajima	08.05.2014	1 (5)	<i>B. chilensis</i>

### 2.2.3 Avaliação de protocolos de extração de DNA

A comparação de protocolos de extração de DNA de ácaros *Brevipalpus* teve como objetivo determinar se o rendimento (concentração de DNA obtido) do método não destrutivo, o qual permitiria a recuperação de espécimes íntegros para preservação e identificação morfológica seria similar ao do método parcialmente destrutivo, que permitiria apenas a recuperação de alguns espécimes, estes parcialmente danificados, para preservação e identificação morfológica.

Fêmeas adultas armazenadas para as análises moleculares foram selecionadas, considerando-se sua integridade, e individualizadas em microtubos estéreis do tipo *eppendorff* para a extração de DNA. Para cada extração teste foram utilizados 12 indivíduos colocados em microtubos individuais. Os indivíduos utilizados nos testes de extração foram provenientes de uma colônia de isofêmeas de *Brevipalpus yothersi* Baker, 1949, mantida em frutos de laranja, na Unidade de Acarologia do Laboratório de Quarentena Vegetal da Embrapa Cenargen. Os ácaros foram armazenados em álcool 100% em freezer -20°C.

O DNA das amostras de ácaros *Brevipalpus* foi extraído utilizando o kit de extração *Dneasy Blood & Tissue Kit* (Qiagen®) – Protocolo para cultura de células animais adaptado à extração de DNA total de pequenos artrópodes, com os ajustes incorporados a partir do protocolo descrito por Dowling *et al.* (2012). Foram testados dois protocolos de extração: 1) parcialmente destrutivo; 2) não destrutivo. Assim, foram realizadas 24 extrações teste, das quais 12 foram feitas seguindo o protocolo 1 e 12 foram feitas seguindo o protocolo 2. Os protocolos de extração estão descritos passo a passo, abaixo:

#### **Protocolo 1 – Parcialmente destrutivo**

1.1) Todo o álcool usado para preservar os ácaros foi removido antes da extração, com uma pipeta P100 e ponteiros estéreis. Primeiramente foram adicionados 30 µL de mix (90 µL de Buffer ATL + 10 µL de Proteinase K) nos microtubos contendo ácaros individualizados e os mesmos foram pressionados com um pistilo de plástico para que houvesse a ruptura do tegumento. A seguir os tubos foram completados com 70 µL do mix e colocados em banho-maria a

uma temperatura de 56°C por um período de incubação que variou de 16 a 24 horas.

### **Protocolo 2 – Não destrutivo**

1.2) Todo o álcool usado para preservar os ácaros foi removido antes da extração. Foram adicionados 100 µL de MIX (90 µL de Buffer ATL + 10 µL de Proteinase K) aos microtubos contendo ácaros individualizados. Os tubos foram colocados no banho-maria a uma temperatura de 56°C por um período de incubação que variou de 16 a 24 horas.

As etapas seguintes foram realizadas da mesma maneira para os dois protocolos:

- 1) Os tubos foram homogeneizados em vortex e centrifugados por 1 min a 8.000 rpm (rotações por minuto).
- 2) Foram adicionados 100 µL de buffer AL aos microtubos que foram homogeneizados em vortex novamente e colocados mais uma vez em banho-maria, dessa vez por 10 min na temperatura de 70°C.
- 3) Os tubos foram centrifugados a 8000 rpm durante 1 min.
- 4) A seguir, foram adicionados 100 µL de álcool absoluto e cada amostra foi homogeneizada novamente em vortex e centrifugada a 8000 rpm por 1 min.
- 5) Toda a mistura obtida até o passo 4 foi recolhida com o auxílio de pipeta P1000 e foi depositada no centro da coluna DNeasy adaptada a um tubo coletor de 2 mL (fornecido no kit).
- 6) O tubo coletor acoplado à coluna foi centrifugado a 8000 rpm por 1 min. O líquido coletado (sobrenadante) foi descartado, transferindo-se a coluna para um novo tubo coletor.
- 7) Foram adicionados 250 µL de buffer AW1 na coluna, sendo o tubo e a coluna novamente centrifugados e o tubo descartado, transferindo-se a coluna para outro tubo coletor de 2 mL.
- 8) Foram adicionados 250 µL de buffer AW2, o tubo foi centrifugado a 13000 rpm por 3 min para secar a membrana da coluna. O tubo com o sobrenadante foi descartado e a coluna transferida para um microtubo estéril de 1,5 mL.

- 9) Foram depositados então 50 µL de água ultra pura sobre a membrana da coluna, que permaneceu incubada no gelo por 10 min. Em seguida, procedeu-se uma centrifugação a 8.000 rpm por 1 min.
- 10) Após a última centrifugação, o tubo contendo o DNA molde foi armazenado em freezer -20°C.

Após as extrações, o DNA foi quantificado e avaliado quanto a pureza e qualidade com a utilização do espectrofotômetro NanoDrop 2000. A comparação dos protocolos de extração foi realizada com a intenção de obter DNA de melhor qualidade para que fosse possível utilizar menor quantidade de DNA para cada reação de PCR.

#### **2.2.4 Avaliação de *primers* e otimização de protocolos de amplificação de DNA**

Nos trabalhos de sistemática molecular de *Brevipalpus* (Rodrigues *et al.* 2004, Groot & Breeuwer 2006, Navia *et al.* 2013) foram testados *primers* iniciadores e apresentados protocolos de amplificação de DNA, através de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), para um fragmento da região *COI* (mtDNA). Para que outras regiões do genoma possam ser exploradas em estudos de sistemática molecular de *Brevipalpus*, é importante a avaliação de marcadores localizados em diferentes regiões do genoma, bem como a otimização de protocolos para as reações de PCR, definindo-se concentrações de reagentes, número de ciclos, temperaturas nas etapas de desnaturação, anelamento e extensão. A otimização das condições de PCR para cada região do genoma a ser explorada (incluindo o fragmento da região *COI* já estudado) possibilitaria a amplificação de diferentes fragmentos a partir de menores quantidades de DNA e, conseqüentemente, a obtenção de sequências de DNA dos quatro fragmentos de um mesmo espécime. Essa situação foi considerada ideal devido à frequente ocorrência de mais de uma espécie de *Brevipalpus* em um mesmo hospedeiro/localidade (ver Tabela 2.1).

A amplificação de dois fragmentos do gene *COI* foi testada. O primeiro fragmento, já explorado em outros estudos de sistemática molecular de *Brevipalpus* (Rodrigues *et al.* 2004, Groot & Breeuwer 2006, Navia *et al.* 2013), foi amplificado com os *primers* DNF & DNR (Navajas *et al.* 1998), os quais amplificam aproximadamente 400 pb. Para a amplificação do segundo

fragmento do gene *COI*, considerado como o fragmento “*barcoding*” (Folmer *et al.* 1994; Herbert *et al.* 2003) ou fragmento de Folmer (Ros & Breeuwer 2007), foram testados os *primers* LCO1490 & HCO2198 (Folmer *et al.*, 1994). Esses *primers* foram utilizados com sucesso para ácaros tenuipalpeados do gênero *Raoiella* por Dowling *et al.* (2012).

Para a região ITS2 foram testados *primers* desenhados pela equipe do LQV, a partir de sequências parciais que vinham sendo obtidas com *primers* utilizados para amplificação dessa mesma região para espécies de Tetranychidae (Mendonça *et al.* 2011). Os *primers* foram designados como Bph1Rev & 28SC. O programa utilizado para o desenho de *primers* foi *Primer 3* (<http://primer3.sourceforge.net/releases.php>). A especificidade do conjunto de *primers* (Bph1-R & 28SC) foi analisada através do programa NCBI Blast (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>).

Para a amplificação da região D1-D3 foram testados os *primers* utilizados por Dowling *et al.* (2012) com sucesso para as espécies do gênero *Raoiella*, designados como D23F & D6R (Park & Foighil 2000). Um resumo das características de cada par de *primers* encontra-se na Tabela 2.2.

**Tabela 2.2:** Fragmentos amplificados e *primers* utilizados nas reações de PCR e no seqüenciamento do DNA dos espécimens de ácaros *Brevipalpus*.

Região do DNA	<i>Primers</i>	Sequência	Amplifica (pb)	Referência
ITS (Nuclear)	Bph1Rev	5' ACC CTC GAC GAT ACT GTG TGC C 3'	~500pb	Neste estudo
	28SC	5' ATA TCG TTA AAT TCA GCG GG 3'		Mendonça <i>et al.</i> (2011)
	DNF	5' TAC AGC TCC TAT AGA TAA AAC 3'	~400pb	Navajas <i>et al.</i> (1998)
<i>COI</i> (Mitochondrial)	DNR	5' TGA TTT TTT GGT CAC CCA GAA G 3'	~650pb	Folmer <i>et al.</i> (1994)
	LCO1490	5' GGT CAA CAA ATC ATA AAG ATA TTG G 3'		
	HCO2198	5' TAA ACT TCA GGG TGA CCA AAA AAT CA 3'		
D1-D3 (gene 28S)	D23F	5' GAG AGT TCA AGA GTA CGT G 3'	~1000pb	Park & Foighil (2000)
	D6R	5' CCA GCT ATC CTG AGG GAA ACT TCG 3'		

As reações de amplificação para os quatro fragmentos foram conduzidas em um mix de 25 µL contendo quantidades específicas de Tp10X, Taq polimerase (Qiagen), DNTP, *primers*, MgCl<sub>2</sub>, BSA, H<sub>2</sub>O MilliQ, Trealose 10% e DNA molde.

1) *COI primers* DNF & DNR

Foram testadas cinco reações de PCR, com variações nas concentrações de componentes da reação e nas condições de PCR (temperatura e duração do anelamento). Diferentes quantidades dos seguintes reagentes foram avaliadas: enzima *Taq* polimerase (0,2, 0,25 e 0,13  $\mu$ L); dNTP (2,5 e 1,2  $\mu$ L), *primers* (1,25 e 0,75  $\mu$ L),  $MgCl_2$  (2,5 e 1,5  $\mu$ L) e DNA molde (2 e 4  $\mu$ L). Também foram avaliadas reações com inclusão ou não de BSA (Bovine Serum Albumin) e de Solução Q (Qiagen).

Para as reações com esse par de *primers* não foi utilizada trealose.

Foram efetuadas alterações nas condições de PCR para a temperatura (48°C - 50°C) e tempo de anelamento (1 min – 1,5 min).

As reações avaliadas estão resumidas na Tabela 2.3.

**Tabela 2.3:** Reações de PCR testadas para a amplificação do fragmento *COI*, *primers* DNF & DNR. Os blocos sombreados indicam as alterações feitas de uma reação para a outra.

Componentes e Condições de PCR	Reações				
	1ª	2ª	3ª	4ª	5ª
DNA Molde	4	4	4	2	2
Tp10x	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5
MgCl <sub>2</sub> (25 mM)	2,5	2,5	1,5	1,5	1,5
dNTP (10mM)	2,5	2,5	1,2	1,2	1,2
Primer DNF	1,25	1,25	0,75	0,75	0,75
Primer DNR	1,25	1,25	0,75	0,75	0,75
BSA (10mg/ml)	0	0,2	0,4	0,4	0,4
Taq 5 uni/uL	0,2	0,25	0,13	0,13	0,13
Solução Q	5	0	0	0	0
H <sub>2</sub> O	5,8	10,55	13,77	15,77	15,77
Número de ciclos	35	35	35	35	35
Temperatura de anelamento	50°C	50°C	48°C	48°C	48°C
Duração do anelamento	1 min	1 min	1 min	1 min	1,5 min

2) *COI primers* LCO & HCO

Foram testadas três reações de PCR, com variações nas concentrações de componentes da reação. Diferentes quantidades dos seguintes reagentes da reação foram avaliados: enzima *Taq* polimerase (0,125 e 0,12  $\mu$ L); *primers* (0,25 e 0,175  $\mu$ L),  $MgCl_2$  (1,25 e 2,5  $\mu$ L) e DNA

molde (2 e 4  $\mu$ L). Também se avaliou a inclusão ou não de BSA (Bovine Serum Albumin) na reação.

As reações avaliadas estão resumidas na Tabela 2.4:

**Tabela 2.4:** Reações de PCR testadas para a amplificação do fragmento *COI*, primers LCO1490 & HCO2198. Os blocos sombreados indicam as alterações feitas de uma reação para a outra.

Componentes	Reações		
	1 <sup>a</sup>	2 <sup>a</sup>	3 <sup>a</sup>
DNA Molde	4	2	2
Tp10x	2,5	2,5	2,5
MgCl <sub>2</sub> (25 mM)	1,25	2,5	2,5
dNTP (2,5mM)	0,125	0,125	0,125
Primer DNF	0,25	0,25	0,175
Primer DNR	0,25	0,25	0,175
BSA (10mg/ml)	0	0,1	0,1
Taq 5 uni/uL	0,125	0,12	0,12
Solução Q	12,5	12,5	12,5
H <sub>2</sub> O	4	4,655	4,805

### 3) ITS primers Bph1Rev & 28SC

Foram testadas duas reações de PCR, com variações nas quantidades de DNA molde (2 e 4  $\mu$ L).

As reações avaliadas estão resumidas na Tabela 2.5:

**Tabela 2.5:** Reações de PCR testadas para a amplificação da região ITS2, primers Bph1Rev & 28SC. Os blocos sombreados indicam as alterações feitas de uma reação para a outra.

Componentes	Reações	
	1 <sup>a</sup>	2 <sup>a</sup>
DNA Molde	4	2
Tp10x	2,5	2,5
MgCl <sub>2</sub> (25 mM)	1,5	1,5
dNTP (10mM)	0,5	0,5
Primer DNF	0,175	0,175
Primer DNR	0,175	0,175
BSA (10mg/ml)	0	0
Taq 5 uni/uL	0,2	0,2
Solução Q	12,5	12,5
H <sub>2</sub> O	3,45	5,45

## 4) D1-D3 primers D23F-D6R

Foram testadas três reações de PCR, com variações nas concentrações de componentes da reação e nas condições de PCR (duração do anelamento e número de ciclos). Diferentes quantidades dos seguintes reagentes da reação: enzima *Taq* polimerase (0,125 e 0,12  $\mu$ L) e de DNA molde (2 e 4  $\mu$ L).

Nas avaliações das condições de PCR foram modificados o tempo de anelamento (30 s – 1,5 min) e o número de ciclos (30 e 35 ciclos).

As reações avaliadas estão resumidas na Tabela 2.6:

**Tabela 2.6:** Reações de PCR testadas para a amplificação da subunidade D1-D3 do gene 28S primers D23F D6R. Os blocos sombreados indicam as alterações feitas de uma reação para a outra.

Componentes e Condições de PCR	Reações		
	1 <sup>a</sup>	2 <sup>a</sup>	3 <sup>a</sup>
DNA Molde	4	4	2
Tp10x	2,5	2,5	2,5
MgCl <sub>2</sub> (25 mM)	1,25	1,25	1,25
dNTP (10mM)	0,125	0,125	0,125
Primer DNF	0,25	0,25	0,25
Primer DNR	0,25	0,25	0,25
BSA (10mg/ml)	0	0,1	0,1
Taq 5 uni/uL	0,125	0,12	0,12
Solução Q	12,5	12,5	12,5
H <sub>2</sub> O	4	3,905	5,905
Número de ciclos	35	35	30
Temperatura de anelamento	50°C	50°C	50°C
Duração do anelamento	30 s	30 s	1,5 min

Todos os fragmentos foram submetidos a uma extensão final a 72°C por dez minutos.

Os produtos de PCR foram visualizados e fotografados em gel de agarose corados em GelRed<sup>®</sup> (Biotium) com o auxílio de um transiluminador (BioRad).

A seguir as amostras de DNA amplificadas foram enviadas para sequenciamento direto pelo método “BigDyeTerminator” por seqüenciamento capilar em seqüenciador de DNA automatizado pela Plataforma ABI PRISM 3730 XL (Macrogen Korea).

### 2.2.5 Análises e edição das sequências

O programa BioEdit versão 7.0.4 (Hall, 1999) foi utilizado para a análise dos eletroferogramas e das sequências brutas. A edição da sequência consenso foi realizada com o auxílio do programa Staden Package versão 1.6.0 (Staden *et al.* 1998). O alinhamento das sequências obtidas para os quatro fragmentos estudados, foi conduzido pelo método de alinhamento múltiplo CLUSTAL W (Thompson *et al.* 1994) implementado no programa BioEdit. Não foram necessários ajustes manuais para o alinhamento das sequências. A distribuição e a frequência das sequências variantes - haplótipos (COI) e genótipos (ITS2 e D1-D3) - para as espécies de *Brevipalpus* incluídas no estudo foram inferidas para os quatro fragmentos estudados e estimados pelo programa DnaSP versão 5.10.1 (Librado & Rozas 2009).

### 2.2.6 Análises Filogenéticas

A análise das relações filogenéticas e moleculares das sequências obtidas para os quatro fragmentos estudados foram conduzidas usando o programa MEGA versão 6 (Tamura *et al.* 2013), jModeltest versão 3.7 (Darriba *et al.* 2012) e PhyML versão 3.0 (Guidon *et al.* 2010). Primeiramente, foi selecionado o melhor modelo de substituição de nucleotídeos para cada um dos respectivos fragmentos com o auxílio dos programas jModeltest versão 3.7 (Darriba *et al.* 2012) e MEGA v. 6.0 (Tamura *et al.* 2013). Uma vez definido o melhor modelo, os arquivos de sequências foram submetidos separadamente para análise filogenética à versão online do algoritmo PhyML (Guidon *et al.* 2010). As árvores filogenéticas foram estimadas por máxima verossimilhança (Maximum-Likelihood estimation - ML) e a construção e edição foi executada no MEGA versão 6 (Tamura *et al.* 2013) utilizando o arquivo gerado pelo algoritmo PhyML v. 3.0. (Guindon *et al.* 2010). Para a determinação dos limites de confiança nas ramificações geradas durante a construção das filogenias, os dados foram submetidos ao teste de bootstrap (Felsenstein 1985) para 1000 replicações e os valores estão apresentados em porcentagem próximos aos ramos das árvores filogenéticas. Nas árvores os cladogramas com suporte bootstrap inferior a 50% não foram apresentados. Para a edição da árvore uma sequência representante de cada amostra foi incluída no alinhamento. Se a

amostra apresentou diferentes haplótipo/genótipos, eles também foram incluídos na análise separadamente. Quando sequências idênticas foram encontradas, tanto no Genbank quanto nas obtidas nesse estudo, apenas uma foi incluída nos alinhamentos e o número de vezes que essas sequências se repetiram foi anotado, entre parênteses, ao lado da sequência selecionada. Esse número indica quantas sequências idênticas foram encontradas no conjunto de dados para cada uma das amostras analisadas.

### **2.2.7 Distância genética**

O programa MEGA versão 6.0 (Tamura *et al.* 2013) foi utilizado para estimar a distribuição e a frequência da distancia genética entre os pares ordenados de nucleotídeos para os quatro fragmentos sequenciados para todas as espécies de *Brevipalpus* desse estudo.

### **2.2.8 Conjunto de dados**

Além das sequências obtidas nesse estudo, foram incluídas no conjunto de dados sequências de *Brevipalpus* do fragmento *COI* (mtDNA) (400 pb), amplificado com os *primers* DNF & DNR, recuperadas do Genbank. As sequências do fragmento *COI* correspondente a região “*barcoding*” (Folmer *et al.* 1994), da região ITS2 e da subunidade D1-D3 do gene 28S são inéditas para as espécies de *Brevipalpus* e não possuem acesso depositados no GenBank.

*Tetranychus urticae* Koch foi escolhido como grupo externo nas análises filogenéticas dos quatro fragmentos estudados. Sequências de Tenuipalpidae do fragmento *COI* de Folmer *et al.* (1994), de *Raoiella indica* Hirst e *R. macfarlanei* Pritchard & Baker; da subunidade D1-D3 (28S) de *R. indica* e; de *COI* (DNF e DNR) de *Cenopalpus pulcher* (Canestrini & Fanzago) foram incluídas nas análises como grupos próximos de *Brevipalpus*. Os grupos de Tenuipalpidae foram selecionados no GenBank conforme a disponibilidade de sequências depositadas.

As sequências do GenBank utilizadas nas análises filogenéticas, os respectivos números de acesso, a identificação específica, tamanho do fragmento, informações sobre a planta hospedeira, localidade da amostra e as referências foram anotadas no Anexo 1.

O termo linhagem foi utilizado para identificar as populações de *Brevipalpus* que formaram agrupamentos geneticamente isolados nas árvores filogenéticas e cujas distâncias foram correspondentes aos valores de divergência interespecífica observados para os táxons reconhecidos (ex. *B. chilensis* & *B. obovatus*). Portanto são agrupamentos que representam espécies potenciais. Para definir se essas linhagens apresentam espécies diferentes são necessárias observações morfológicas detalhadas e de um grande número de indivíduos.

## 2.3 RESULTADOS

### 2.3.1 Avaliação de protocolos de extração de DNA

A quantidade média de DNA obtida para os indivíduos inteiros foi de 1,86 ng/ $\mu$ L (variando entre 1,2 e 2,7 ng/ $\mu$ L) e para indivíduos pressionados foi de 2,2 ng/ $\mu$ L (variando entre 0,6 e 8,9 ng/ $\mu$ L). Com relação a pureza do DNA, 67% dos indivíduos inteiros ficaram na faixa dos valores ótimos enquanto 17% dos indivíduos pressionados ficaram nesta faixa. A análise dessas mesmas amostras em gel de agarose após a realização da PCR mostrou que o DNA extraído de indivíduos pressionados amplificou melhor. As extrações de indivíduos cujo corpo foi parcialmente pressionado com o pistilo (Protocolo 1 – Parcialmente Destrutivo) foram mais eficazes e foram escolhidas para serem realizadas com todas as populações que fizeram parte desse estudo. A avaliação do melhor protocolo de extração baseou-se na quantidade de DNA estimada pelo espectrofotômetro NanoDrop 2000 (ThermoScientific Spectrophotometer) e pela intensidade da banda amplificada com padrão único visualizada em gel de agarose 1%. A quantidade de DNA presente na amostra (ng/ $\mu$ L) e o índice de absorbância (qualidade/ pureza do DNA), cujos valores ótimos variam entre 1,8 e 2,2 foram os parâmetros avaliados.

Após as extrações foi possível recuperar alguns dos indivíduos e montá-los em lâminas de microscopia para observação de caracteres morfológicos como ornamentação dorsal e, algumas vezes, até a espermateca.

Com relação as extrações de *pool* (conjunto com quatro e 10 indivíduos) e individuais a quantidade e qualidade do DNA, assim como as ampliações, não variaram de um método para o outro. Optou-se então pela extração de um único indivíduo, o que confere maior confiabilidade aos resultados uma vez que as amostras podem ser mistas.

### 2.3.2 Avaliação de *primers* e otimização de protocolos de amplificação de DNA

As reações e programas foram otimizados para cada um dos pares de *primers* e todos foram amplificados com 2 $\mu$ L de DNA de modo que foram

obtidas sequências dos quatros pares de *primers* para uma mesma extração. Para os pares de *primers* LCO & HCO e D23F & D6R foram testadas 2 reações/programas anteriores à final utilizada no trabalho, para o par Bph1Rev & 28S foi realizada apenas uma reação antes da final, já para o par DNF & DNR foram necessários quatro reações/programas diferentes para conseguirmos amplificar o fragmento utilizando 2 $\mu$ L de DNA.

Para os primers DNF & DNR a reação utilizada para a produção de DNA de todas as amostras desse trabalho foi a 5ª reação descrita na Tabela 2.3; para os primers LCO & HCO e D23F & D6R a reação utilizada foi a 3ª reação, descrita na Tabela 2.4 e Tabela 2.6, respectivamente; e para os primers Bph1Rev & 28SC a 2ª reação, descrita na Tabela 2.5.

### **2.3.3 Análises filogenéticas e estatística descritiva**

Foram obtidas no total sequências de 123 espécimes (Tabela 2.7). A obtenção de sequências dos quatro fragmentos a partir de DNA de um mesmo espécime foi possível para 21 espécimes (17%). Para os demais espécimes foram obtidas sequências de 3 fragmentos para 39 espécimes (32%), 2 para 37 espécimes (30%) e 1 para 26 espécimes (21%).

**Tabela 2.7:** Quantidade e descrição das sequências obtidas nesse estudo. Número dos espécimes para os quais sequências do fragmento foram obtidas entre parênteses, e espécimes recuperados após extração de DNA em negrito. Composição de siglas das amostras: País/Estado AR (Argentina); BR (Brasil)/ RR (Roraima) PE (Pernambuco) MG (Minas Gerais) RO (Roraima) SP (São Paulo) AL (Alagoas); CH (Chile); ES (Espanha); IS (Israel). Hospedeiros: *Anmu* (*Annona muricata*); *Cepa* (*Cecropia pachystachya*); *Cicl* (*Citrus clementina*); *Cisi* (*Citrus sinensis*); *Cobo* (*Coniza bonariensis*); *Conu* (*Cocos nucifera*); *Dere* (*Delonix regia*); *Ers* (*Erica* sp.); *Hest* (*Helichrysum stoechas*); *Hiro* (*Hibiscus rosa-sinensis*); *Ipba* (*Ipomoea batatas*); *Lisi* (*Ligustrum sinensis*); *Mggr* (*Magnolia grandiflora*); *Myla* (*Myoporium laetum*); *Oleu* (*Olea europea*); *Paed* (*Passiflora edulis*); *Phsp* (*Phoenix* sp.); *Pito* (*Pittosporum tobira*); *Ripu* (*Ribes punctatum*); *Roof* (*Rosmarinus officinalis*); *Sovi* (*Solanum violaeifolium*); *Teca* (*Tecomaria capensis*).

Código Amostra	Espécimes enviados para Sequenciamento	No. de sequências Obtidas (espécimes sequenciados)			
		COI/ DNF DNR	COI/ LCO HCO	ITS2	D1-D3
BRRR <i>Anmu</i>	Bgr 1; 2; 4; 5; 6	2 (1; 2)	4 (1; 2; 4; 6)	4 (1; 4; 5; 6)	4 (2; 4; 5; 6)
BRRR <i>Conu</i>	Bcp 1; 2; 3; 6	0	4 (1; 2; 3; 6)	4 (1; 2; 3; 6)	0
BRPE <i>Hiro</i>	Bhi 2; 4; 5; 6; 8; 10; 11; 12; 13; 14; 17)	6 (8; 10; 11; 12; 13; 14)	7 (2; 4; 5; 6; 8; 12; 13)	2 (10; 11)	5 (10; 12; 13; 14; 17)
BRMG <i>Conu</i>	Bja 14; 16; 17; 20	2 (14; 17)	3 (14; 17; 20)	4 (14; 16; 17; 20)	4 (14; 16; 17; 20)
BRRO <i>Cepa</i>	Bem 2; 3; 4	3 (2; 3; 4)	3 (2; 3; 4)	3 (2; 3; 4)	1 (4)
ES <i>Cisi</i>	Bce 1; 3; 8; 13; 14	4 (1; 3; 8; 13)	0	1 (14)	2 (3; 14)
ES <i>Teca</i>	Bte 1; 2; 3; 4; 5; 6	4 (1; 2; 3; 4)	3 (1; 5; 6)	4 (2; 3; 5; 6)	3 (1; 2; 3)
ES <i>Myla</i>	Bmy 1; 2; 5; 6; 8; 12; 14	7 (1; 2; 5; 6; 8; 12; 14)	4 (1; 2; 5; 6)	5 (1; 2; 8; 12; 14)	3 (5; 6; 8)
ES <i>Pito</i>	Bpi 5; 6; 7; 8; 10; 13	6 (5; 6; 7; 8; 10; 13)	4 (5; 6; 10; 13)	4 (7; 8; 10; 13)	4 (5; 6; 7; 8)
BRAL <i>Ipba</i>	Bbd 1; 2; 3; 4; 6; 7; 8; 9	7 (1; 2; 3; 4; 6; 8; 9)	8 (1; 2; 3; 4; 6; 7; 8; 9)	8 (1; 2; 3; 4; 6; 7; 8; 9)	8 (1; 2; 3; 4; 6; 7; 8; 9)
BRSP <i>Sovi</i>	BobB 5; 6; 9; 10	3 (5; 6; 9)	0	0	2 (5; 10)
BRSP <i>Phsp</i>	BphD 1; 2; 4; 5	4 (1; 2; 4; 5)	4 (1; 2; 4; 5)	4 (1; 2; 4; 5)	4 (1; 2; 4; 5)
BRSP <i>Dere</i>	BflA 1; 3; 4; 5	3 (1; 4; 5)	4 (1; 3; 4; 5)	1 (4)	4 (1; 3; 4; 5)
ES <i>Ers</i>	Beri 1; 3; 4; 6	4 (1; 3; 4; 6)	0	1 (3)	0
AR <i>Cicl</i>	Barb 4; 9; 11; 15; 16; 18	5 (4; 11; 15; 16; 18)	0	2 (15; 16)	4 (4; 11; 15; 18)
AR <i>Cisi</i>	Bar 1; 3; 4; 5; 6; 7; 9; 10	6 (3; 4; 5; 6; 7; 9)	4 (3; 4; 5; 6)	8 (1; 3; 4; 5; 6; 7; 9; 10)	7 (3; 4; 5; 6; 7; 9; 10)
IS <i>Paed</i>	Bis 1; 3; 9; 10	2 (1; 3)	0	4 (1; 3; 9; 10)	2 (1; 3)
ES <i>Roof</i>	Bale1; 3; 4; 5	4 (1; 3; 4; 5)	2 (3; 4)	4 (1; 3; 4; 5)	3 (1; 4; 3)
ES <i>Hest</i>	Bhe 1; 2; 3; 4; 5	2 (1; 5)	0	3 (2; 3; 4)	2 (1; 4)
ES <i>Cobo</i>	Bco 2; 5; 8; 9; 12	5 (2; 5; 8; 9; 12)	2 (9; 12)	4 (2; 5; 8; 9)	1 (2)
ES <i>Oleu</i>	Boli 1; 2; 3	3 (1; 2; 3)	1 (1)	0	3 (1; 2; 3)
CHT <i>Mggr</i>	BChB 3; 5; 6	0	3 (3; 5; 6)	0	1 (3)
CH <i>Lisi</i>	BchC 9; 12; 13; 14; 15	4 (9; 12; 14; 15)	1 (13)	4 (9; 12; 14; 15)	0
CH <i>Mggr</i>	Bma 1; 2; 3; 4; 5; 6	0	2 (5; 6)	1 (6)	0
CH <i>Ripu</i>	Bfr 1; 2; 3; 6	4 (1; 2; 3; 6)	1 (2)	2 (3; 6)	4 (1; 2; 3; 6)

### 2.3.3.1 *COI primers DNF & DNR*

O fragmento da região *COI* amplificado com os *primers* DNR & DNF foi de 373pb. O alinhamento final foi composto por 190 sequências de *Brevipalpus* (92 obtidas nesse estudo, 98 recuperadas do GenBank) e 2 sequências de grupos externos. As sequências de *Brevipalpus* foram divididas em 89 haplótipos (Tabela 2.8). A árvore filogenética foi construída com o critério de máxima verossimilhança (ML) e modelo TN93 + G (Tamura & Nei. 1993).

Todas as amostras de *Brevipalpus* formaram um grupo monofilético. Os haplótipos foram agrupados em 19 linhagens (13 cladogramas e 5 ramos isolados) (Figura 1). Informações sobre as populações que compuseram cada haplótipo e linhagem encontram-se na Tabela 2.8. As distâncias intra e inter linhagens (comparação entre pares de nucleotídeos) são apresentadas na Tabela 2.9. As distâncias intra linhagens alcançaram o valor de 1,39% e inter linhagens variou de 2,6 a 19,2%. A filogenia demonstrou que a maioria das linhagens foram bem suportadas, com valores de bootstrap variando de 79 a 99 (próximas ou superiores a 80%); entretanto os ramos basais suportando as linhagens 1, 9 e 18 exibiram baixo valor de bootstrap (23-67%) (Figura 1).

**Tabela 2.8:** Identificação das linhagens e haplótipos obtidos a partir das sequências do fragmento *COI* (*primers* DNF DNR).

Linhagem	Espécie	Identificação do Haplótipo	Identificação da sequência	País	Planta hospedeira
		7 (x2)	BRALIpba 4, 8	Brasil	<i>Ipomoea batatas</i> (Convolvulaceae)
			BRALIpba 1, 2, 3, 9	Brasil	<i>Ipomoea batatas</i> (Convolvulaceae)
			BRSPphsp 1	Brasil	<i>Phoenix</i> sp. (Arecaceae)
		8 (x44)	KF955008, KF955006, KF955005, KF955004, KF955003, KF955002, KF955001, KF955000, KF955000, KF954999, KF954998, KF954997, KF954996, KF954995, KF954994, KF954993, KF954991, KF954990, KF954988, KF954987, KF954985, KF954983, KF954982, KF954981, KF954980, KF954979, KF954978, KF954977, KF954976, KF954975, KF954974, KF954972, KF954960, KF954965	Brasil e México	<i>Citrus sinensis</i> (Rutaceae)
			BRROCEpa 2, 3, 4	Brasil	<i>Cecropia pachystachya</i> (Cecropiaceae)
			BRPEHiro 10	Brasil	<i>Hibiscus rosa-sinensis</i> (Malvaceae)
		9	BRALIpba6	Brasil	<i>Ipomoea batatas</i> (Convolvulaceae)
		12	BRSPDere5	Brasil	<i>Delonix regia</i> (Fabaceae)
		13 (x2)	BRSPPhsp 2, 4	Brasil	<i>Phoenix</i> sp. (Arecaceae)
		13 (x2)	ARCicl 15, 18	Argentina	<i>Citrus clementina</i> (Rutaceae)
		15	KC291366	Brasil	<i>Ligustrum</i> sp. (Oleaceae)
		16	KC291367	Brasil	<i>Ligustrum</i> sp. (Oleaceae)
1	<i>B. yothersi</i>	18	KC291370	Brasil	<i>Citrus</i> sp. (Rutaceae)
		19	KC291371	Brasil	<i>Hibiscus</i> sp. (Malvaceae)
		20	KC291372	Brasil	<i>Coffea arabica</i> (Rubiaceae)
		21	KC291373	Brasil	<i>Malpighia glabra</i> (Malpighiaceae)
		22	KC291374	Brasil	<i>Citrus</i> sp. (Rutaceae)
		23 (x3)	KC291375	Brasil	<i>Hibiscus</i> sp. (Malvaceae)
			ISPaed 1, 3	Israel	<i>Passiflora edulis</i> (Passifloraceae)
		24	BRVi318 1	Brasil	<i>Vitis vinifera</i> (Vitaceae)
		25	KC291377	Brasil	<i>Hibiscus</i> sp. (Malvaceae)
		26	KC291378	Brasil	<i>Spondias purpurea</i> (Anacardiaceae)
		27	KC291379	Brasil	<i>Citrus</i> sp. (Rutaceae)
		28	KC291380	Brasil	<i>Malvaviscus arboreus</i> (Malvaceae)
		29	KC291381	Brasil	<i>Malvaviscus arboreus</i> (Malvaceae)
		48	AY320014	Estados Unidos	<i>Hibiscus</i> sp. (Malvaceae)
		49	KC291382	Estados Unidos	<i>Citrus</i> sp. (Rutaceae)
		51	DQ789582	Brasil	<i>Citrus</i> sp. (Rutaceae)
		56	KF955007	México	<i>Citrus sinensis</i> (Rutaceae)
		57	KF954992	México	<i>Citrus sinensis</i> (Rutaceae)
		58	KF954984	México	<i>Citrus sinensis</i> (Rutaceae)
		59	KF954971	Brasil	<i>Citrus sinensis</i> (Rutaceae)
		60	KF954970	Brasil	<i>Citrus sinensis</i> (Rutaceae)
		61	KF954969	Brasil	<i>Citrus sinensis</i> (Rutaceae)
		62	KF954968	Brasil	<i>Citrus sinensis</i> (Rutaceae)

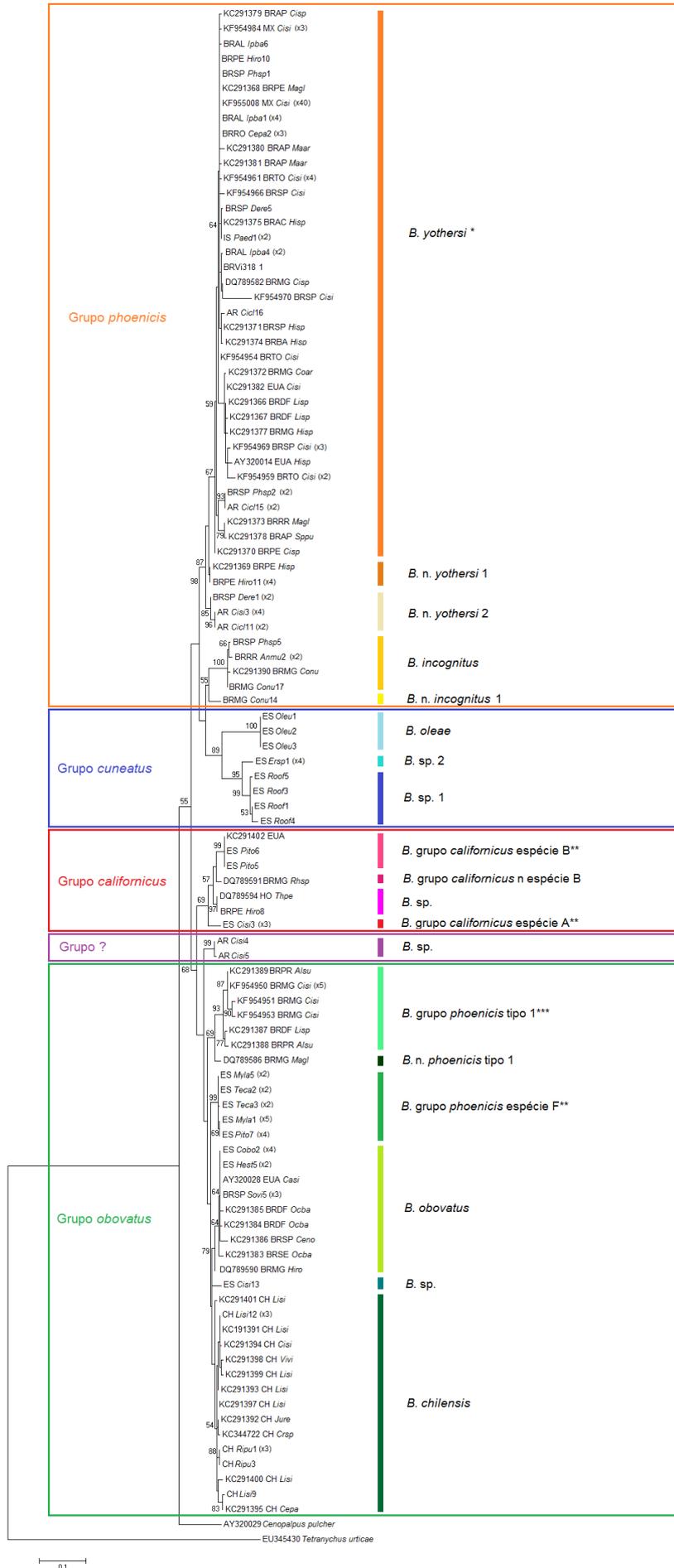
**Tabela 2.8:** Identificação das linhagens e haplótipos obtidos a partir das sequências do fragmento COI (*primers* DNF DNR).

Linhagem	Espécie	Identificação do Haplótipo	Identificação da sequência	País	Planta hospedeira	
1	<i>B. yothersi</i>	63	KF954967	Brasil	<i>Citrus sinensis</i> (Rutaceae)	
		66 (x2)	KF954954, KF954955	Brasil	<i>Citrus sinensis</i> (Rutaceae)	
		67	KF954958	Brasil	<i>Citrus sinensis</i> (Rutaceae)	
		68	KF954959	Brasil	<i>Citrus sinensis</i> (Rutaceae)	
		69	KF954961	Brasil	<i>Citrus sinensis</i> (Rutaceae)	
		70	KF954962	Brasil	<i>Citrus sinensis</i> (Rutaceae)	
		71	KF954963	Brasil	<i>Citrus sinensis</i> (Rutaceae)	
		72	KF954964	Brasil	<i>Citrus sinensis</i> (Rutaceae)	
		73	KF954966	Brasil	<i>Citrus sinensis</i> (Rutaceae)	
		80	ARCicl 16	Argentina	<i>Citrus clementina</i> (Rutaceae)	
2	<i>B. n. yothersi</i> 1	17 (x5)	KC291369 BRHi 256 1	Brasil	<i>Hibiscus</i> sp. (Malvaceae)	
			BRPE Hiro 11, 12, 13, 14	Brasil	<i>Hibiscus rosa-sinensis</i> (Malvaceae)	
3	<i>B. n. yothersi</i> 2	1 (x6)	ARCisi 3, 6, 7, 9	Argentina	<i>Citrus sinensis</i> (Rutaceae)	
			ARCicl 4, 11	Argentina	<i>Citrus clementina</i> (Rutaceae)	
		11 (x2)	BRSPDere 1, 4	Brasil	<i>Delonix regia</i> (Fabaceae)	
4	<i>B. incognitus</i>	14	BRSPPhsp 5	Brasil	<i>Phoenix</i> sp. (Arecaceae)	
			37	KC291390	Brasil	<i>Cocos nucifera</i> (Arecaceae)
			84 (x2)	BRRRAnmu 1, 2	Brasil	<i>Annona muricata</i> (Annonaceae)
			85	BRMGConu 17	Brasil	<i>Cocos nucifera</i> (Arecaceae)
5	<i>B. n. incognitus</i> 1	75	BRMGConu 14	Brasil	<i>Cocos nucifera</i> (Arecaceae)	
6	<i>B. oleae</i>	87 (x3)	ES Oleu 1, 2, 3	Espanha	<i>Olea europea</i> (Oleaceae)	
7	<i>B. grupo cuneatus</i> sp. 2	10 (x4)	ESErsp 1, 3, 4, 6	Espanha	<i>Erica</i> sp. (Ericaceae)	
8	<i>B. grupo cuneatus</i> sp. 1	74	ESRoof 3	Espanha	<i>Rosmarinus officinalis</i> (Lamiaceae)	
			77	ESRoof 1	Espanha	<i>Rosmarinus officinalis</i> (Lamiaceae)
			78	ESRoof 4	Espanha	<i>Rosmarinus officinalis</i> (Lamiaceae)
			79	ESRoof 5	Espanha	<i>Rosmarinus officinalis</i> (Lamiaceae)
9	<i>B. grupo californicus</i> espécie B	50 (x2)	KC291402	Estados Unidos	?	
			ESPito 5, 6	Espanha	<i>Pittosporum tobira</i> (Pittosporaceae)	
10	<i>B. grupo californicus</i> n espécie B	54	DQ789591	Brasil	<i>Rhododendron</i> sp. (Ericaceae)	
11	<i>B. grupo californicus</i> sp.	55 (x2)	DQ789594	Holanda	<i>Thevetia peruviana</i> (Apocynaceae)	
			BRPEHiro 8	Brasil	<i>Hibiscus rosa-sinensis</i> (Malvaceae)	
12	<i>B. grupo californicus</i> espécie A	81 (x3)	ESCisi 1, 3, 8	Espanha	<i>Citrus sinensis</i> (Rutaceae)	
13	<i>B. sp. grupo ?</i>	2	ARCisi 4	Argentina	<i>Citrus sinensis</i> (Rutaceae)	
			3	ARCisi 5	Argentina	<i>Citrus sinensis</i> (Rutaceae)
14	<i>B. grupo phoenicis</i> tipo 1	36 (x5)	30	KC291387	Brasil	<i>Ligustrum</i> sp. (Oleaceae)
			35	KC291388	Brasil	<i>Alnus subcordata</i> (Betulaceae)
				KC291389	Brasil	<i>Alnus subcordata</i> (Betulaceae)
				KF954950, KF954952, KF954956, KF954957	Brasil	<i>Citrus sinensis</i> (Rutaceae)
			64	KF954951	Brasil	<i>Citrus sinensis</i> (Rutaceae)
			65	KF954953	Brasil	<i>Citrus sinensis</i> (Rutaceae)
15	<i>B. n grupo phoenicis</i> tipo 1	52	DQ789586	Brasil	<i>Malpighia glabra</i> (Malpighiaceae)	
16	<i>B. grupo phoenicis</i> especie F	76 (x2)	ES Teca 1, 2	Espanha	<i>Tecomaria capensis</i> (Bignoniaceae)	

**Tabela 2.8:** Identificação das linhagens e haplótipos obtidos a partir das sequências do fragmento COI (*primers* DNF DNR).

Linhagem	Espécie	Identificação do Haplótipo	Identificação da sequência	País	Planta hospedeira		
16	<i>B. grupo phoenicis</i> especie F	76 (x2)	ESMya 5, 6	Espanha	<i>Myoporum laetum</i> (Scrophulariaceae)		
		86 (x9)	ESMya 1, 2, 8, 12, 14	Espanha	<i>Myoporum laetum</i> (Scrophulariaceae)		
			ESPito 7, 8, 10, 13	Espanha	<i>Pittosporum tobira</i> (Pittosporaceae)		
		89 (X2)	ESTeca 3, 4	Espanha	<i>Tecomaria capensis</i> (Bignoniaceae)		
17	<i>B. obovatus</i>	6 (x10)	BRSPSovi 5, 6, 9	Brasil	<i>Solanum violaeifolium</i> (Solanaceae)		
			AY320028	Estados Unidos	<i>Camellia sinensis</i> (Theaceae)		
			ESCobo 2, 5, 8, 12	Espanha	<i>Coniza bonariensis</i> (Asteraceae)		
		31	ESHest 1, 5	Espanha	<i>Helichrysum stoechas</i> (Asteraceae)		
			KC291383	Brasil	<i>Ocimum basilicum</i> (Lamiaceae)		
			KC291384	Brasil	<i>Ocimum basilicum</i> (Lamiaceae)		
			KC291385	Brasil	<i>Ocimum basilicum</i> (Lamiaceae)		
			KC291386	Brasil	<i>Cestrum nocturnum</i> (Solanaceae)		
53	DQ789590	Brasil	<i>Hibiscus rosa-sinensis</i> (Malvaceae)				
18	<i>B. sp. grupo obovatus</i>	82	ESCisi 13	Espanha	<i>Citrus sinensis</i> (Rutaceae)		
		4	CHLisi 9	Chile	<i>Ligustrum sinensis</i> (Oleaceae)		
			5 (x4)	CHLisi 12, 14, 15	Chile	<i>Ligustrum sinensis</i> (Oleaceae)	
				KC191391	Chile	<i>Ligustrum sinensis</i> (Oleaceae)	
			38	KC291392	Chile	<i>Juglans regia</i> (Juglandaceae)	
		39	KC291393	Chile	<i>Ligustrum sinensis</i> (Oleaceae)		
		40	KC291394	Chile	<i>Citrus</i> sp. (Rutaceae)		
		19	<i>B. chilensis</i>	41	KC291395	Chile	<i>Cestrum parqui</i> (Solanaceae)
				42	KC344722	Chile	<i>Crataegus</i> sp. (Rosaceae)
				43	KC291397	Chile	<i>Ligustrum sinensis</i> (Oleaceae)
				44	KC291398	Chile	<i>Vitis vinifera</i> (Vitaceae)
				45	KC291399	Chile	<i>Ligustrum sinensis</i> (Oleaceae)
				46	KC291400	Chile	<i>Ligustrum sinensis</i> (Oleaceae)
				47	KC291401	Chile	<i>Ligustrum sinensis</i> (Oleaceae)
		88 (X4)	CHRipu 1, 2, 3, 6	Chile	<i>Ribes punctatum</i> (Grossulariaceae)		
83	ESCobo 9*	Espanha	<i>Coniza bonariensis</i> (Asteraceae)				

\*A sequência não foi utilizada na análise



**Figura 1:** Árvore filogenética ML (TN93 + G) inferida a partir de sequências de *COI* (primers DNF DNR) de *Brevipalpus* recuperadas do Genbank e obtidas nesse estudo. Informações sobre a composição dos haplótipos na tabela 2.8 e informações sobre as sequências provenientes do Genbank no anexo 1. O número de vezes que cada haplótipo foi encontrado nas amostras está entre parênteses. Os valores de bootstrap estão localizados sobre os ramos. A identificação de espécies e linhagens encontra-se a direita e a dos grupos, a esquerda. \*Comunicação pessoal, R. Ochoa, USDA, 2014. \*\*Nomenclatura de acordo com Beard *et al.* (2013). \*\*\*Nomenclatura de acordo com Beard *et al.* (2012).

**Tabela 2.9:** Matriz de distância entre as linhagens de ácaros *Brevipalpus* usando a correção Tamura-Nei (93), baseada nas sequências do fragmento COI (mtDNA) (primers DNF DNR).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
1 <i>B. yothersi</i>	1,25%																			
2 <i>B. n. yothersi</i> 1	2,71%	0,00%																		
3 <i>B. n. yothersi</i> 2	3,48%	2,73%	0,42%																	
4 <i>B. incognitus</i>	10,18%	8,97%	8,75%	0,98%																
5 <i>B. n. incognitus</i> 1	7,29%	6,44%	6,69%	6,81%	n/c															
6 <i>B. grupo californicus</i> espécie B	9,83%	8,60%	8,87%	10,38%	10,08%	0,00%														
7 <i>B. grupo californicus</i> sp.	9,51%	8,23%	7,77%	10,29%	9,69%	3,34%	0,00%													
8 <i>B. grupo californicus</i> n. espécie B	9,48%	8,96%	8,50%	9,92%	8,22%	2,65%	2,64%	n/c												
9 <i>B. grupo californicus</i> espécie A	10,56%	10,45%	10,72%	11,28%	8,22%	6,11%	4,33%	3,31%	0,00%											
10 <i>B. grupo phoenicis</i> tipo 1	10,77%	9,46%	9,33%	11,14%	8,90%	10,40%	8,55%	8,92%	10,17%	1,39%										
11 <i>B. grupo phoenicis</i> n. tipo 1	11,39%	10,47%	9,98%	11,59%	8,60%	10,13%	7,51%	8,59%	8,98%	3,96%	n/c									
12 <i>B. sp. grupo ?</i>	10,08%	9,16%	9,05%	10,67%	9,15%	8,44%	6,98%	7,32%	8,79%	7,29%	5,20%	0,32%								
13 <i>B. grupo phoenicis</i> espécie F	11,34%	10,42%	10,28%	11,53%	8,14%	9,70%	7,83%	7,43%	6,75%	6,95%	5,31%	5,49%	0,25%							
14 <i>B. obovatus</i>	10,38%	9,51%	9,40%	9,10%	6,62%	7,98%	7,63%	5,86%	6,64%	5,41%	4,48%	5,62%	3,76%	0,57%						
15 <i>B. grupo obovatus</i> sp.	10,19%	9,33%	9,23%	10,30%	7,14%	7,20%	5,38%	5,03%	3,66%	6,95%	5,73%	5,55%	4,30%	3,49%	n/c					
16 <i>B. chilensis</i>	11,05%	10,18%	10,05%	10,09%	7,69%	8,77%	7,56%	6,54%	6,59%	6,67%	4,54%	5,59%	3,61%	2,95%	2,82%	1,16%				
17 <i>B. grupo cuneatus</i> sp. 1	13,35%	12,47%	12,71%	13,55%	11,24%	15,24%	13,94%	13,95%	13,98%	14,43%	15,17%	14,17%	15,14%	13,32%	12,79%	14,17%	0,00%			
18 <i>B. grupo cuneatus</i> sp. 2	12,39%	11,79%	12,03%	14,78%	12,88%	14,52%	13,25%	12,49%	13,29%	14,03%	16,05%	15,04%	15,16%	14,18%	13,65%	14,90%	4,45%	1,03%		
19 <i>B. oleae</i>	14,66%	13,54%	13,82%	15,19%	12,73%	18,82%	17,56%	17,99%	19,27%	14,05%	15,51%	16,12%	17,46%	17,26%	17,57%	18,02%	12,77%	14,08%	0,00%	
20 <i>Cenopalpus pulcher</i>	15,32%	14,36%	14,04%	19,69%	17,18%	18,46%	16,36%	17,59%	18,47%	16,03%	14,71%	14,13%	16,29%	16,07%	16,35%	15,37%	19,75%	19,84%	21,43%	n/c

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

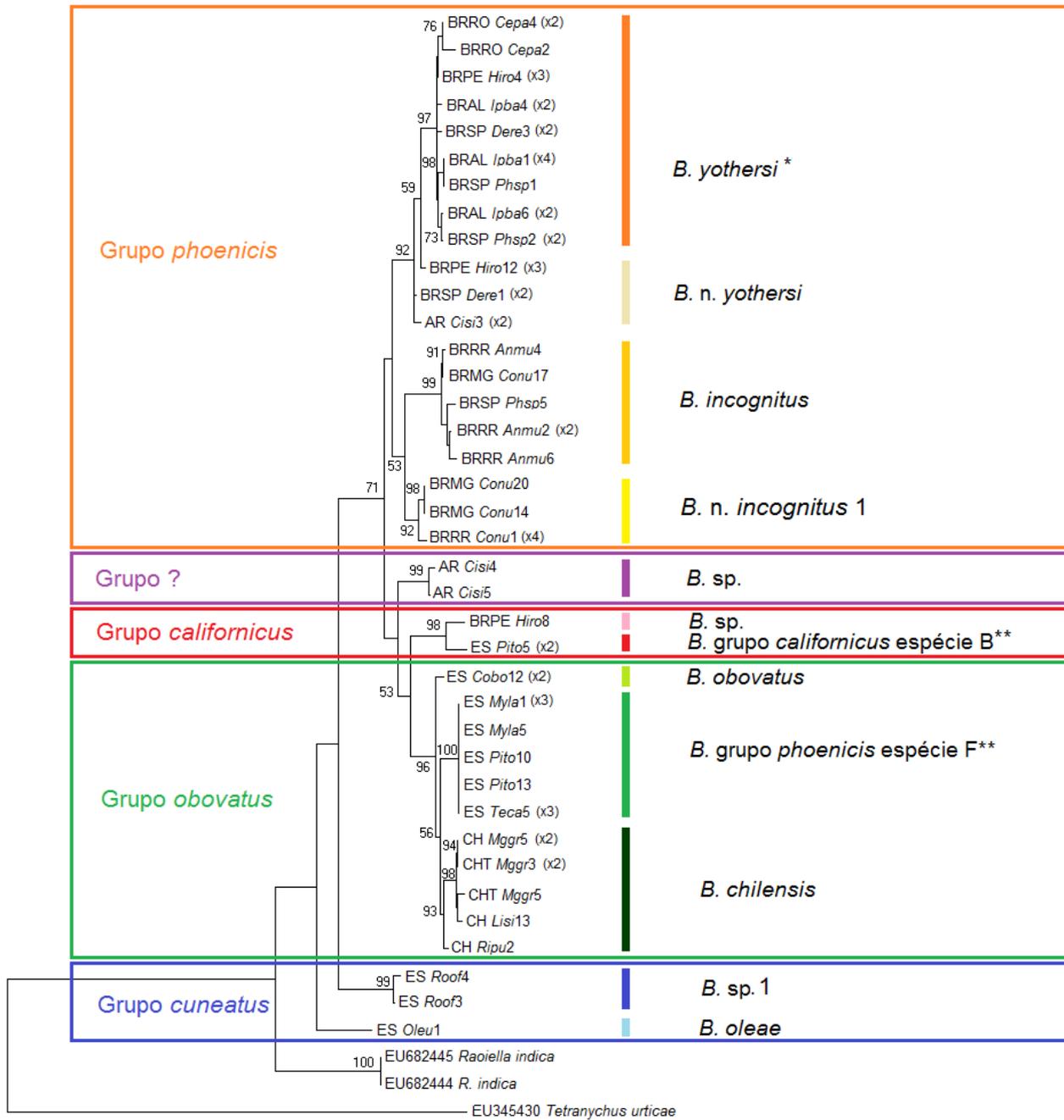
### 2.3.3.2 *COI primers LCO & HCO*

O fragmento da região *COI* amplificado com os *primers* LCO e HCO foi de 650pb. O alinhamento final foi composto por 64 sequências de *Brevipalpus*, todas obtidas nesse estudo e 3 sequências do Genbank como grupo externo. As sequências de *Brevipalpus* foram classificadas em 31 haplótipos (Tabela 2.10). A filogenia construída pelo critério ML baseou-se no modelo de distância Kimura 2-Parâmetros (K2P) (Kimura 1980).

Todas as amostras de *Brevipalpus* formaram um grupo monofilético. Os haplótipos foram agrupados em 12 linhagens (11 clados e 1 ramo isolado) (Figura 2). Informações sobre as populações que compuseram cada haplótipo e linhagem encontram-se na Tabela 2.10. As distâncias intra e inter linhagens são apresentadas na Tabela 2.11. As distâncias intra linhagens foram de até 1,95% e inter linhagens variou de 3,3 a 19,5%. A filogenia demonstrou que a maioria das linhagens foram bem suportadas, com valores de bootstrap superiores a 90%; entretanto os ramos basais suportando as linhagens *B. yothersi* e *B. incognitus* e as espécies do grupo *obovatus* exibiram valores de bootstrap de 53 e 56%, respectivamente (Figura 2).

**Tabela 2.10:** Identificação das linhagens e haplótipos obtidos a partir das sequências do fragmento *COI* (primers LCO HCO)

Linhagem	Espécie	Identificação do Haplótipo	Identificação da sequência	País	Planta hospedeira
1	<i>B. yothersi</i>	4 (x2)	BRROCEpa 3, 4	Brasil	<i>Cecropia pachystachya</i> (Cecropiaceae)
		22 (x5)	BRALIpba 1, 2, 3, 9	Brasil	<i>Ipoema batatas</i> (Convolvulaceae)
			BRSPPhsp 1	Brasil	<i>Phoenix</i> sp. (Arecaceae)
		23 (x2)	BRALIpba 4, 8	Brasil	<i>Ipoema batatas</i> (Convolvulaceae)
		24 (x2)	BRALIpba 6, 7	Brasil	<i>Ipoema batatas</i> (Convolvulaceae)
		26 (x2)	BRSPDere 3, 5	Brasil	<i>Delonix regia</i> (Fabaceae)
		27 (x3)	BRPEHiro 4, 5, 6	Brasil	<i>Hibiscus rosa-sinensis</i> (Malvaceae)
		28 (x2)	BRSPPhsp 2, 4	Brasil	<i>Phoenix</i> sp. (Arecaceae)
		31	BRROCEpa 2	Brasil	<i>Cecropia pachystachya</i> (Cecropiaceae)
2	<i>B. n. yothersi</i>	25 (x2)	BRSPDere 1, 4	Brasil	<i>Delonix regia</i> (Fabaceae)
		9 (x3)	BRPEHiro 2, 12, 13	Brasil	<i>Hibiscus rosa-sinensis</i> (Malvaceae)
		17 (X2)	ARCisi 3, 6	Argentina	<i>Citrus sinensis</i> (Rutaceae)
3	<i>B. incognitus</i>	5 (x2)	BRRRAnmu 1, 2	Brasil	<i>Annona muricata</i> (Annonaceae)
		6	BRRRAnmu 4	Brasil	<i>Annona muricata</i> (Annonaceae)
		7	BRRRAnmu 6	Brasil	<i>Annona muricata</i> (Annonaceae)
		10	BRMGConu 17	Brasil	<i>Cocos nucifera</i> (Arecaceae)
		29	BRSPPhsp 5	Brasil	<i>Phoenix</i> sp. (Arecaceae)
4	<i>B. n. incognitus 1</i>	2 (x4)	BRRRConu 1, 2, 3, 6	Brasil	<i>Cocos nucifera</i> (Arecaceae)
		11 (x2)	BRMGConu 14, 20	Brasil	<i>Cocos nucifera</i> (Arecaceae)
5	<i>B. sp. grupo ?</i>	18	ARCisi 4	Argentina	<i>Citrus sinensis</i> (Rutaceae)
		19	ARCisi 5	Argentina	<i>Citrus sinensis</i> (Rutaceae)
6	<i>B. sp. grupo californicus</i>	8	BRPEHiro 8	Brasil	<i>Hibiscus rosa-sinensis</i> (Malvaceae)
7	<i>B. grupo californicus espécie B</i>	15 (x2)	ESPito 5, 6	Espanha	<i>Pittosporum tobira</i> (Pittosporaceae)
8	<i>B. obovatus</i>	3 (x2)	ESCobo 9, 12	Espanha	<i>Coniza bonariensis</i> (Asteraceae)
9	<i>B. grupo phoenicis espécie F</i>		ESMya 1, 2, 5, 6	Espanha	<i>Myoporum laetum</i> (Scrophulariaceae)
		13 (x9)	ESPito 10, 13	Espanha	<i>Pittosporum tobira</i> (Pittosporaceae)
			ESTeca 1, 5, 6	Espanha	<i>Tecomaria capensis</i> (Bignoniaceae)
10	<i>B. chilensis</i>	12 (x4)	CHMggr 5, 6	Chile	<i>Magnolia grandiflora</i> (Magnoliaceae)
			CHTMggr 3, 6	Chile	<i>Magnolia grandiflora</i> (Magnoliaceae)
		16	CHRipu 2	Chile	<i>Ribes punctatum</i> (Grossulariaceae)
		20	CHTMggr 5	Chile	<i>Magnolia grandiflora</i> (Magnoliaceae)
		21	CHLisi 13	Chile	<i>Ligustrum sinensis</i> (Oleaceae)
11	<i>B. grupo cuneatus sp. 1</i>	1	ESRoof 4	Espanha	<i>Rosmarinus officinalis</i> (Lamiaceae)
		30	ESRoof 3	Espanha	<i>Rosmarinus officinalis</i> (Lamiaceae)
12	<i>B. oleae</i>	14	ESOleu 1	Espanha	<i>Olea europea</i> (Oleaceae)



**Figura 2:** Árvore filogenética ML (modelo K2P) inferida a partir de sequências de *COI* (primers LCO HCO) de *Brevipalpus* obtidas nesse estudo. Informações sobre a composição dos haplótipos na Tabela 2.10. O número de vezes que cada haplótipo foi encontrado nas amostras está entre parênteses. Os valores de bootstrap estão localizados sobre os ramos. A identificação de espécies e linhagens encontra-se a direita e a dos grupos, a esquerda. \*Comunicação pessoal, R. Ochoa, USDA, 2014. \*\*Nomenclatura de acordo com Beard *et al.* 2013.

**Tabela 2.11:** Matriz de distância entre as linhagens de ácaros *Brevipalpus* usando a correção Kimura 2-Parâmetros (K2P), baseada nas sequências do fragmento *COI* (mtDNA) (*primers* LCO & HCO).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
1 <i>B. yothersi</i>	1,25%												
2 <i>B. n. yothersi</i>	3,54%	1,95%											
3 <i>B. n. incognitus</i>	8,81%	8,48%	1,04%										
4 <i>B. incognitus</i>	11,16%	10,88%	7,76%	1,53%									
5 <i>B. grupo californicus</i> sp.	11,65%	11,09%	10,75%	13,04%	n/c								
6 <i>B. grupo californicus</i> especie B	11,67%	11,08%	10,85%	13,57%	4,66%	0,00%							
7 <i>B. grupo ?</i> sp.	12,06%	11,49%	11,54%	13,04%	11,12%	11,29%	0,97%						
8 <i>B. grupo phoenicis</i> especie F	9,67%	9,70%	9,80%	9,22%	11,39%	11,57%	8,79%	0,00%					
9 <i>B. obovatus</i>	12,12%	11,10%	10,87%	12,41%	10,58%	10,17%	4,00%	8,98%	0,00%				
10 <i>B. chilensis</i>	12,74%	11,88%	11,68%	13,19%	11,40%	11,37%	3,30%	8,66%	4,08%	1,12%			
11 <i>B. grupo cuneatus</i> sp. 1	16,36%	15,52%	15,86%	16,75%	17,18%	18,01%	16,88%	16,38%	16,93%	17,75%	0,81%		
12 <i>B. oleae</i>	18,39%	17,45%	18,18%	19,00%	18,45%	19,51%	18,91%	19,32%	18,96%	19,42%	15,01%	n/c	
13 <i>Raioella indica</i>	24,81%	24,57%	23,78%	25,22%	25,62%	24,94%	23,23%	24,12%	23,25%	23,87%	22,40%	24,41%	0,00%

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

### 2.3.3.3 ITS 2

O fragmento da região ITS2 amplificado com os *primers* Bph1Rev e 28SC foi de 500pb. O alinhamento final foi composto por 109 sequências de *Brevipalpus* (108 obtidas nesse estudo, uma recuperada do GenBank) e uma sequência do grupo externo. As sequências de *Brevipalpus* foram classificadas em 43 genótipos (Tabela 2.12). O Modelo GTR + G (General Time Reversible) (Tavaré 1986) e o critério de máxima verossimilhança (ML) foram selecionados para a construção da árvore filogenética.

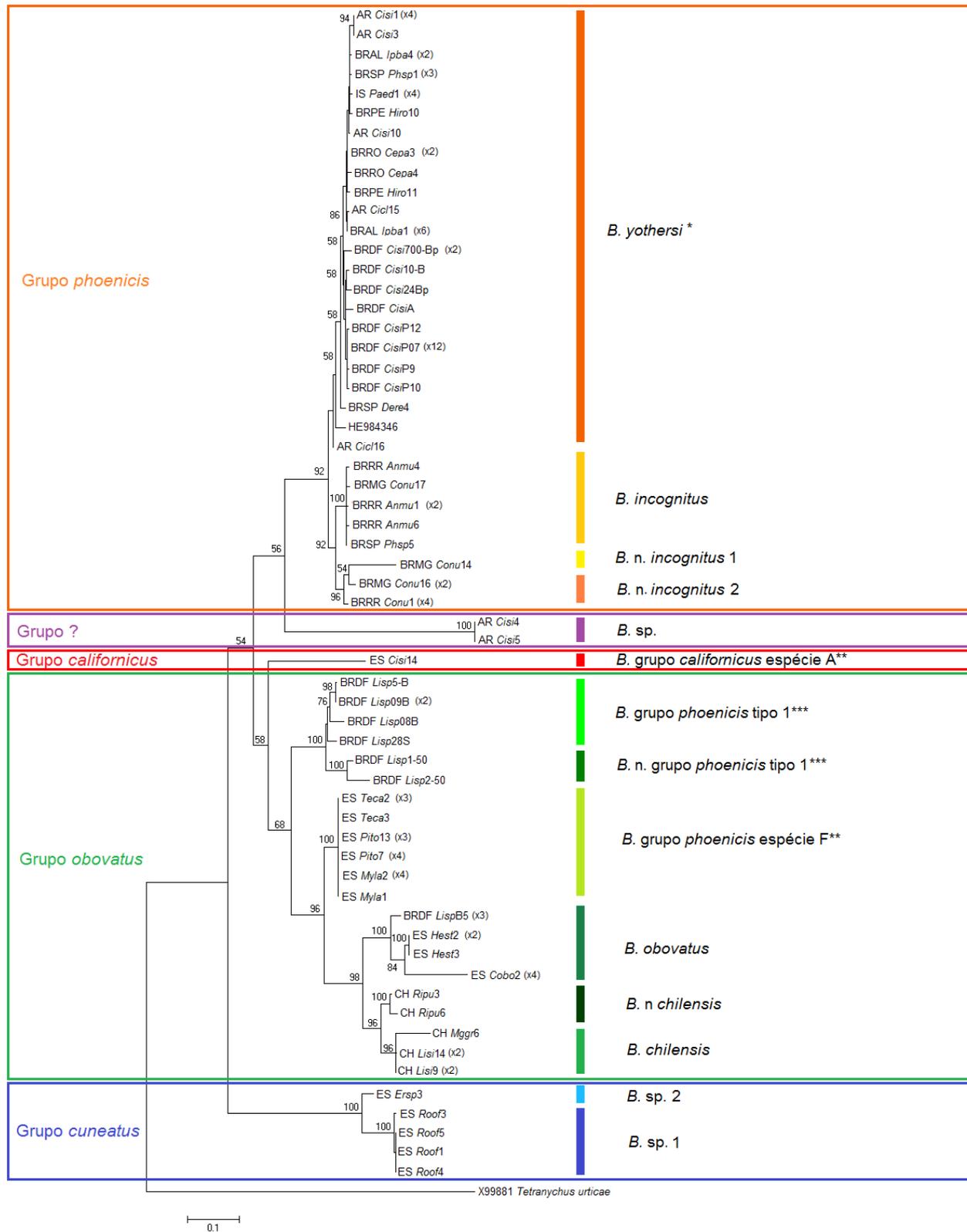
Todas as amostras de *Brevipalpus* formaram um grupo monofilético. Os genótipos foram agrupados em 14 linhagens (11 clados e 3 ramos isolados) (Figura 3). Informações sobre as populações que compuseram cada genótipo e linhagem encontram-se na Tabela 2.12. As distâncias intra e inter linhagens são apresentadas na Tabela 2.13. As distâncias intra linhagens foram de até 2,78% e inter linhagens variou de 5 a 55,81%. A filogenia demonstrou que a maioria das linhagens foram bem suportadas, com valores de bootstrap próximos a 90% (Figura 3).

Tabela 2.12: Identificação das linhagens e genótipos obtidos a partir das sequências do fragmento ITS2.

Linhagem	Espécie	Identificação do Genótipo	Identificação da sequência	País	Planta hospedeira		
1	<i>B. yothersi</i>	1	HE984346				
		2	ARCic15	Argentina	<i>Citrus clementina</i> (Rutaceae)		
		2 (x6)	BRALIpba 1, 2, 3, 6, 7, 9	Brasil	<i>Ipoema batatas</i> (Convolvulaceae)		
		3	ARCic16	Argentina	<i>Citrus clementina</i> (Rutaceae)		
			BRROCEpa 2, 3	Brasil	<i>Cecropia pachystachya</i> (Cecropiaceae)		
			ISPaed 1, 3, 9, 10	Israel	<i>Passiflora eduli</i> (Passifloraceae)		
		6 (x11)	ARCisi10	Argentina	<i>Citrus sinensis</i> (Rutaceae)		
			BRSPPhsp 1, 2, 4	Brasil	<i>Phoenix sp.</i> (Arecaceae)		
			BRPEHiro10	Brasil	<i>Hibiscus rosa-sinensis</i> (Malvaceae)		
		7	BRROCEpa4	Brasil	<i>Cecropia pachystachya</i> (Cecropiaceae)		
		11	BRPEHiro11	Brasil	<i>Hibiscus rosa-sinensis</i> (Malvaceae)		
		14 (x6)	ARCisi 1, 10, 3, 6, 7, 9	Argentina	<i>Citrus sinensis</i> (Rutaceae)		
		18 (x2)	BRALIpba 4, 8	Brasil	<i>Ipoema batatas</i> (Convolvulaceae)		
		20	BRSPDere4	Brasil	<i>Delonix regia</i> (Fabaceae)		
		21 (x12)	BRDFCisi P07, P13, P14, P15, P18, P11, P16, 07-B, 700-07, 50, 29Bp, 5Bp	Brasil	<i>Citrus sinensis</i> (Rutaceae)		
		23	BRDFCisiP9	Brasil	<i>Citrus sinensis</i> (Rutaceae)		
		24	BRDFCisiP10	Brasil	<i>Citrus sinensis</i> (Rutaceae)		
		25	BRDFCisiP12	Brasil	<i>Citrus sinensis</i> (Rutaceae)		
		26	BRDFCisi10-B	Brasil	<i>Citrus sinensis</i> (Rutaceae)		
		27	BRDFCisiA	Brasil	<i>Citrus sinensis</i> (Rutaceae)		
		28 (x2)	BRDFCisi 700-Bp, 1Bp	Brasil	<i>Citrus sinensis</i> (Rutaceae)		
		29	BRDFCisi24Bp	Brasil	<i>Citrus sinensis</i> (Rutaceae)		
		2	<i>B. incognitus</i>		BRRRAnmu 1, 5	Brasil	<i>Annona muricata</i> (Annonaceae)
				8 (x4)	BRMGConu17	Brasil	<i>Cocos nucifera</i> (Arecaceae)
					BRSPPhsp5	Brasil	<i>Phoenix sp.</i> (Arecaceae)
				9	BRRRAnmu4	Brasil	<i>Annona muricata</i> (Annonaceae)
				10	BRRRAnmu6	Brasil	<i>Annona muricata</i> (Annonaceae)
		3	<i>B. sp. grupo phoenicis</i>	38	BRMGConu14	Brasil	<i>Cocos nucifera</i> (Arecaceae)
		4	<i>B. n incognitus</i>	5 (4)	BRRRConu 1, 2, 3, 6	Brasil	<i>Cocos nucifera</i> (Arecaceae)
42 (x2)	BRMGConu 16, 20			Brasil	<i>Cocos nucifera</i> (Arecaceae)		
5	<i>B. sp. grupo ?</i>	15 (x2)	ARCisi 4, 5	Argentina	<i>Citrus sinensis</i> (Rutaceae)		
6	<i>B. grupo californicus espécie A</i>	4	ESCisi14	Espanha	<i>Citrus sinensis</i> (Rutaceae)		
7	<i>B. grupo phoenicis tipo 1</i>	31	BRDFLisp5-B	Brasil	<i>Ligustrum sp.</i> (Oleaceae)		
		32	BRDFLisp08B	Brasil	<i>Ligustrum sp.</i> (Oleaceae)		
		33 (x2)	BRDFLisp 09B, B-B	Brasil	<i>Ligustrum sp.</i> (Oleaceae)		
		34	BRDFLisp28S	Brasil	<i>Ligustrum sp.</i> (Oleaceae)		
8	<i>B. sp. grupo obovatus</i>	35	BRDFLisp1-50	Brasil	<i>Ligustrum sp.</i> (Oleaceae)		
		36	BRDFLisp2-50	Brasil	<i>Ligustrum sp.</i> (Oleaceae)		
9	<i>B. grupo phoenicis espécie F</i>	12 (x13)	ESMya 1, 2, 8, 12, 14	Espanha	<i>Myoporum laetum</i> (Scrophulariaceae)		
			ESPto 7, 8, 10, 13	Espanha	<i>Pittosporum tobira</i> (Pittosporaceae)		
			ESTeca 2, 3, 5, 6	Espanha	<i>Tecomaria capensis</i> (Bignoniaceae)		

**Tabela 2.12:** Identificação das linhagens e genótipos obtidos a partir das sequências do fragmento ITS2.

Linhagem	Espécie	Identificação do Genótipos	Identificação da sequência	País	Planta hospedeira
10	<i>B. obovatus</i>	30 (x3)	BRDFLisp B5, B6, B9	Brasil	<i>Ligustrum</i> sp. (Oleaceae)
		40 (x3)	ESHest 2, 3, 4	Espanha	<i>Helichrysum stoechas</i> (Asteraceae)
		41 (x4)	ESCobo 2, 5, 8, 9	Espanha	<i>Coniza bonariensis</i> (Asteraceae)
11	<i>B. n chilensis</i>	13	CHRipu3	Chile	<i>Ribes punctatum</i> (Grossulariaceae)
		43	CHRipu6	Chile	<i>Ribes punctatum</i> (Grossulariaceae)
12	<i>B. chilensis</i>	16 (x2)	CHLisi 14, 15	Chile	<i>Ligustrum sinensis</i> (Oleaceae)
		17 (x2)	CHLisi 9, 12	Chile	<i>Ligustrum sinensis</i> (Oleaceae)
		22	CHMggr6	Chile	<i>Magnolia grandiflora</i> (Magnoliaceae)
13	<i>B. grupo cuneatus</i> sp. 2	19	ESErsp3	Espanha	<i>Erica</i> sp. (Ericaceae)
14	<i>B. grupo cuneatus</i> sp. 1	37	ESRoof3	Espanha	<i>Rosmarinus officinalis</i> (Lamiaceae)
		39 (x3)	ESRoof 1, 4, 5	Espanha	<i>Rosmarinus officinalis</i> (Lamiaceae)



**Figura 3:** Árvore filogenética ML (GTR + G) inferida a partir de seqüências de ITS2 de *Brevipalpus* recuperadas do Genbank e obtidas nesse estudo. Informações sobre a composição dos genótipos na Tabela 2.12 e informações sobre as seqüências provenientes do Genbank no anexo 1. O número de vezes que cada genótipo foi encontrado nas amostras está entre parênteses. Os valores de bootstrap estão localizados sobre os ramos. A identificação de espécies e linhagens encontra-se a direita e a dos grupos, a esquerda. \*Comunicação pessoal, R. Ochoa, USDA, 2014. \*\*Nomenclatura de acordo com Beard *et al.* (2013). \*\*\*Nomenclatura de acordo com Beard *et al.* (2012).

**Tabela 2.13:** Matriz de distância entre as linhagens de ácaros *Brevipalpus* usando a correção Kimura 2-Parâmetros (K2P), baseada nas sequências da região ITS2 (rDNA).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
1 <i>B. yothersi</i>	1,65%													
2 <i>B. incognitus</i>	6,34%	0,64%												
3 <i>B. n. incognitus</i> 2	6,82%	5,00%	1,43%											
4 <i>B. n. incognitus</i> 1	14,56%	12,85%	9,89%	n/c										
5 <i>B. grupo phoenicis</i> tipo 1	23,65%	25,85%	27,37%	33,48%	2,09%									
6 <i>B. grupo ? sp.</i>	39,04%	40,70%	41,60%	47,19%	37,03%	0,00%								
7 <i>B. grupo californicus</i> espécie A	31,74%	31,75%	34,22%	42,43%	28,83%	51,36%	n/c							
8 <i>B. grupo phoenicis</i> espécie F	24,55%	24,96%	27,09%	35,19%	15,94%	45,09%	25,56%	0,00%						
9 <i>B. n. grupo phoenicis</i> tipo 1	30,79%	32,37%	34,30%	39,64%	20,12%	40,56%	27,49%	12,79%	2,12%					
10 <i>B. n. chilensis</i>	32,65%	32,66%	36,27%	42,16%	17,73%	40,90%	33,49%	13,73%	9,77%	1,61%				
11 <i>B. obovatus</i>	39,42%	41,71%	44,11%	48,57%	24,78%	49,20%	38,20%	23,91%	12,62%	20,25%	0,00%			
12 <i>B. chilensis</i>	32,46%	32,49%	35,28%	41,08%	17,32%	39,04%	34,83%	13,20%	11,53%	5,74%	20,74%	2,78%		
13 <i>B. grupo cuneatus</i> sp. 1	36,93%	38,75%	40,39%	49,95%	42,39%	54,80%	43,98%	39,11%	46,10%	51,63%	55,81%	49,99%	0,26%	
14 <i>B. grupo cuneatus</i> sp. 2	40,32%	42,30%	42,67%	50,35%	44,01%	54,57%	43,09%	39,58%	42,43%	50,40%	53,49%	49,02%	6,69%	n/c

Blocos sombreados = valores intraspecíficos; blocos brancos = valores interspecíficos

#### 2.3.3.4 Subunidade D1-D3 (28S)

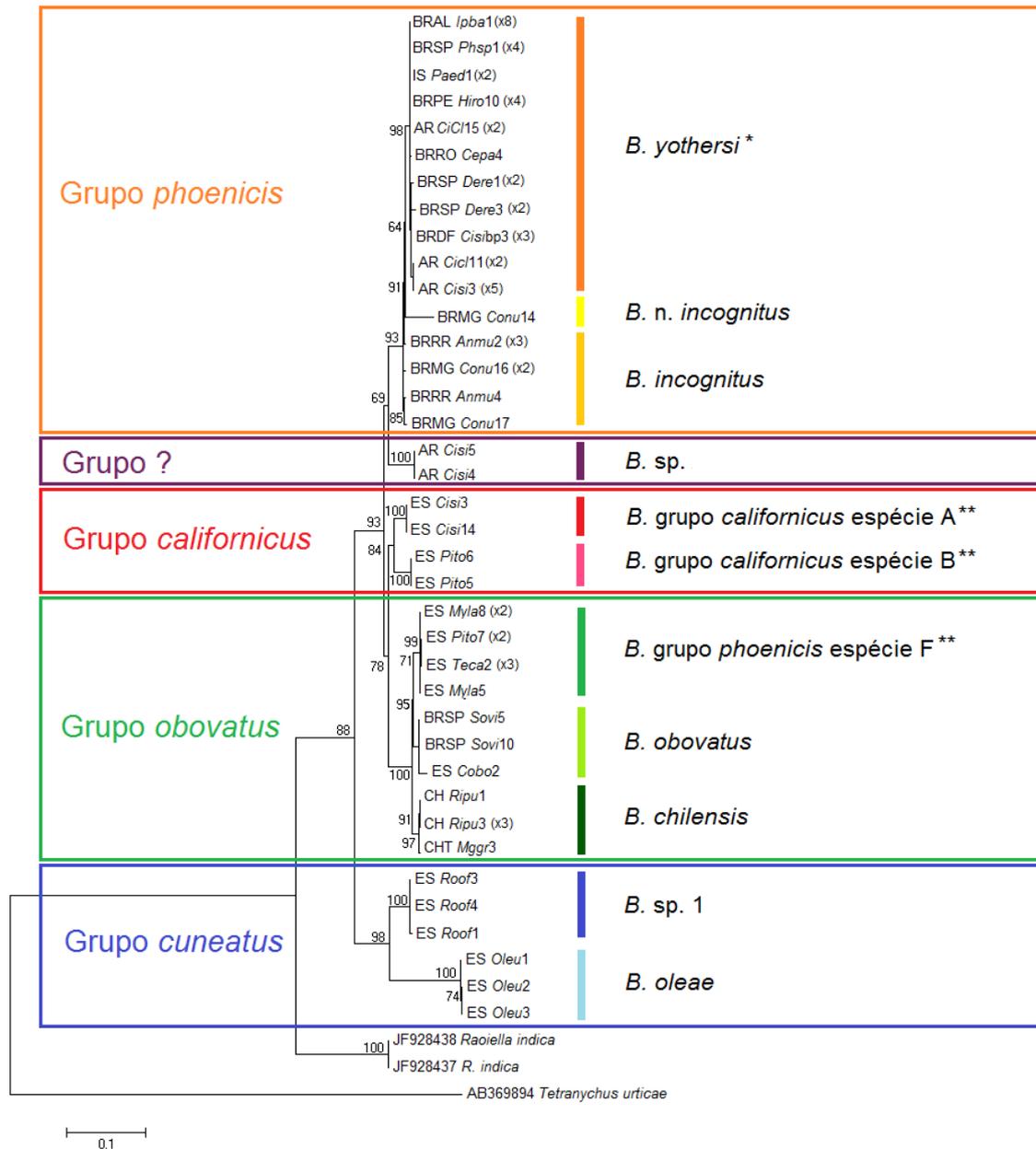
O fragmento da subunidade D1-D3 (28S) foi de 900pb. O alinhamento final foi composto por 74 sequências de *Brevipalpus*, todas obtidas nesse estudo, e 2 de grupos externos. As sequências de *Brevipalpus* foram classificadas em 28 genótipos (Tabela 2.14). A filogenia construída pelo critério ML baseou-se no modelo de distância Tamura 3-Parâmetros (T92) (Tamura 1992).

Todas as amostras de *Brevipalpus* formaram um grupo monofilético. As sequências variantes foram agrupadas em 11 linhagens distribuídas em 10 clados e um ramo isolado (Figura 4). Informações sobre as populações que compuseram cada variante e linhagem encontram-se na Tabela 2.14. As distâncias intra e inter linhagens são apresentadas na Tabela 2.15. As distâncias intra linhagens foram de até 0,63% e inter linhagens variou de 1,17 a 19,7%. A filogenia demonstrou que a maioria das linhagens foram bem suportadas, com valores de bootstrap variando de 93 a 100 % (Figura 4).

Tabela 2.14: Identificação das linhagens e genótipos obtidos a partir das sequências da subunidade D1-D3 (28S)

Linhagem	Espécie	Identificação do Genótipo	Identificação da sequência	País	Planta hospedeira
1	<i>B. yothersi</i>	3 (x2)	ARCicl 4, 11	Argentina	<i>Citrus clementina</i> (Rutaceae)
		3 (x4)	ARCisi 3, 6, 7, 9	Argentina	<i>Citrus sinensis</i> (Rutaceae)
			ARCicl 15, 18	Argentina	<i>Citrus clementina</i> (Rutaceae)
			ARCisi 10	Argentina	<i>Citrus sinensis</i> (Rutaceae)
			BRPEHiro 10, 12, 13, 14	Brasil	<i>Hibiscus rosa-sinensis</i> (Malvaceae)
		4 (x20)	ISPaed 1, 3	Israel	<i>Passiflora edulis</i> (Passifloraceae)
			BRALIpba 1, 2, 3, 4, 6, 7, 8, 9	Brasil	<i>Ipomoea batatas</i> (Convolvulaceae)
		BRSPPHsp 1, 2, 4	Brasil	<i>Phoenix</i> sp. (Arecaceae)	
			12	BRROCepa 4	Brasil
		23 (x2)	BRSPDere 1, 4	Brasil	<i>Delonix regia</i> (Fabaceae)
		24	BRSPDere 3	Brasil	<i>Delonix regia</i> (Fabaceae)
		25	BRSPDere 5	Brasil	<i>Delonix regia</i> (Fabaceae)
		26	BRSPPHsp 5	Brasil	<i>Phoenix</i> sp. (Arecaceae)
		28 (x3)	BRDFCisiBp 2, 3	Brasil	<i>Citrus sinensis</i> (Rutaceae)
BRDFCisiset 7	Brasil		<i>Citrus sinensis</i> (Rutaceae)		
2	<i>B. sp. grupo phoenicis</i>	27	BRMGConu 14	Brasil	<i>Cocos nucifera</i> (Arecaceae)
3	<i>B. incognitus</i>	6 (x3)	BRRR Anmu 2, 5, 6	Brasil	<i>Annona muricata</i> (Annonaceae)
		7	BRRR Anmu 4	Brasil	<i>Annona muricata</i> (Annonaceae)
		8	BRMG Conu 17	Brasil	<i>Cocos nucifera</i> (Arecaceae)
		15 (x2)	BRMGConu 16, 20	Brasil	<i>Cocos nucifera</i> (Arecaceae)
4	<i>B. sp. grupo ?</i>	20 (x2)	ARCisi 4, 5	Argentina	<i>Citrus sinensis</i> (Rutaceae)
5	<i>B. grupo californicus</i> espécie A	5 (x2)	ESCisi 3, 14	Espanha	<i>Citrus sinensis</i> (Rutaceae)
6	<i>B. grupo californicus</i> espécie B	10 (x2)	ESPito 5, 6	Espanha	<i>Pittosporum tobira</i> (Pittosporaceae)
7	<i>B. grupo phoenicis</i> especie F	9 (x3)	ESMya 5, 6, 8	Espanha	<i>Myoporum laetum</i> (Scrophulariaceae)
		16 (x5)	ESPito 7, 8	Espanha	<i>Pittosporum tobira</i> (Pittosporaceae)
			ESTeca 1, 2, 3	Espanha	<i>Tecomaria capensis</i> (Bignoniaceae)
8	<i>B. obovatus</i>	17	ESCobo 2	Espanha	<i>Coniza bonariensis</i> (Asteraceae)
		22 (x2)	BRSPSovi 5, 10	Brasil	<i>Solanum violaeifolium</i> (Solanaceae)
9	<i>B. chilensis</i>	11 (x4)	CHRipu 1, 2, 3, 6	Chile	<i>Ribes punctatum</i> (Grossulariaceae)
		21	CHTMgr 3	Chile	<i>Magnolia grandiflora</i> (Magnoliaceae)
10	<i>B. sp. 1 grupo cuneatus</i>	1	ESRoof 1	Espanha	<i>Rosmarinus officinalis</i> (Lamiaceae)
		2 (x2)	ESRoof 3, 4	Espanha	<i>Rosmarinus officinalis</i> (Lamiaceae)
11	<i>B. oleae</i>	18	ESOleu 1	Espanha	<i>Olea europea</i> (Oleaceae)
		19 (x2)	ESOleu 2, 3	Espanha	<i>Olea europea</i> (Oleaceae)
			13	ESHest 1*	Espanha
		14	ESHest 4*	Espanha	<i>Helichrysum stoechas</i> (Asteraceae)

\*As sequências não foram utilizadas na análise



**Figura 4:** Árvore filogenética ML (T92) inferida a partir de sequências da subunidade D1-D3 (28S) de *Brevipalpus* obtidas nesse estudo. Informações sobre a composição dos genótipos na Tabela 2.14. O número de vezes que cada genótipo foi encontrado nas amostras está entre parênteses. Os valores de bootstrap estão localizados sobre os ramos. A identificação de espécies e linhagens encontra-se a direita e a dos grupos, a esquerda. \*Comunicação pessoal, R. Ochoa, USDA, 2014.\*\*Nomenclatura de acordo com Beard *et al.* 2013.

**Tabela 2.15:** Matriz de distância entre as linhagens de ácaros *Brevipalpus* usando a correção Tamura 3-Parâmetros (T92), baseada nas sequências da subunidade D1-D3 do gene 28S (rDNA).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1 <i>B. yothersi</i>	0,37%											
2 <i>B. incognitus</i>	1,17%	0,43%										
3 <i>B. n. incognitus</i> 1	3,84%	3,38%	n/c									
4 <i>B. grupo ? sp.</i>	5,89%	5,48%	7,42%	0,00%								
5 <i>B. grupo californicus</i> espécie A	5,33%	4,87%	7,67%	6,00%	0,00%							
6 <i>B. grupo californicus</i> espécie B	5,05%	4,77%	7,53%	6,42%	2,42%	0,00%						
7 <i>B. grupo phoenicis</i> espécie F	6,67%	6,50%	8,90%	7,48%	5,69%	5,83%	0,07%					
8 <i>B. obovatus</i>	7,05%	6,95%	9,52%	7,54%	6,28%	6,53%	2,09%	0,63%				
9 <i>B. chilensis</i>	6,70%	6,45%	8,80%	7,33%	6,42%	6,51%	2,15%	2,30%	0,20%			
10 <i>B. grupo cuneatus</i> sp. 1	11,44%	11,39%	13,31%	12,99%	11,45%	11,16%	12,02%	12,13%	11,49%	0,08%		
11 <i>B. oleae</i>	17,23%	17,23%	19,70%	17,68%	17,03%	17,50%	19,05%	19,36%	18,49%	11,06%	0,08%	
12 <i>Raioella indica</i>	22,01%	21,99%	23,42%	22,09%	23,29%	23,10%	24,31%	25,22%	24,07%	23,26%	26,57%	0,00%

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

As distâncias genéticas intra e interespecíficas, máximas e mínimas, para cada região do genoma estudada, considerando-se unicamente as linhagens genéticas que constituem táxons, confirmados através de consistência das filogenias e presença de caracteres morfológicos diagnósticos, encontram-se na Tabela 2.16. Observa-se que as distâncias intra ou interespecífica obtidas para ambos fragmentos da região *COI* (*primers* DNR & DNF, HCO & LCO) são similares. Entretanto, as distâncias obtidas para os dois fragmentos ribossomais nucleares são bastante diferentes, sendo as distâncias da subunidade D1-D3 (28S) baixas (comparáveis às do DNA mitocondrial) e as da região ITS2 são bastante elevadas.

**Tabela 2.16:** Distâncias genéticas intra e interespecíficas para ácaros *Brevipalpus* para as quatro regiões do genoma avaliadas.

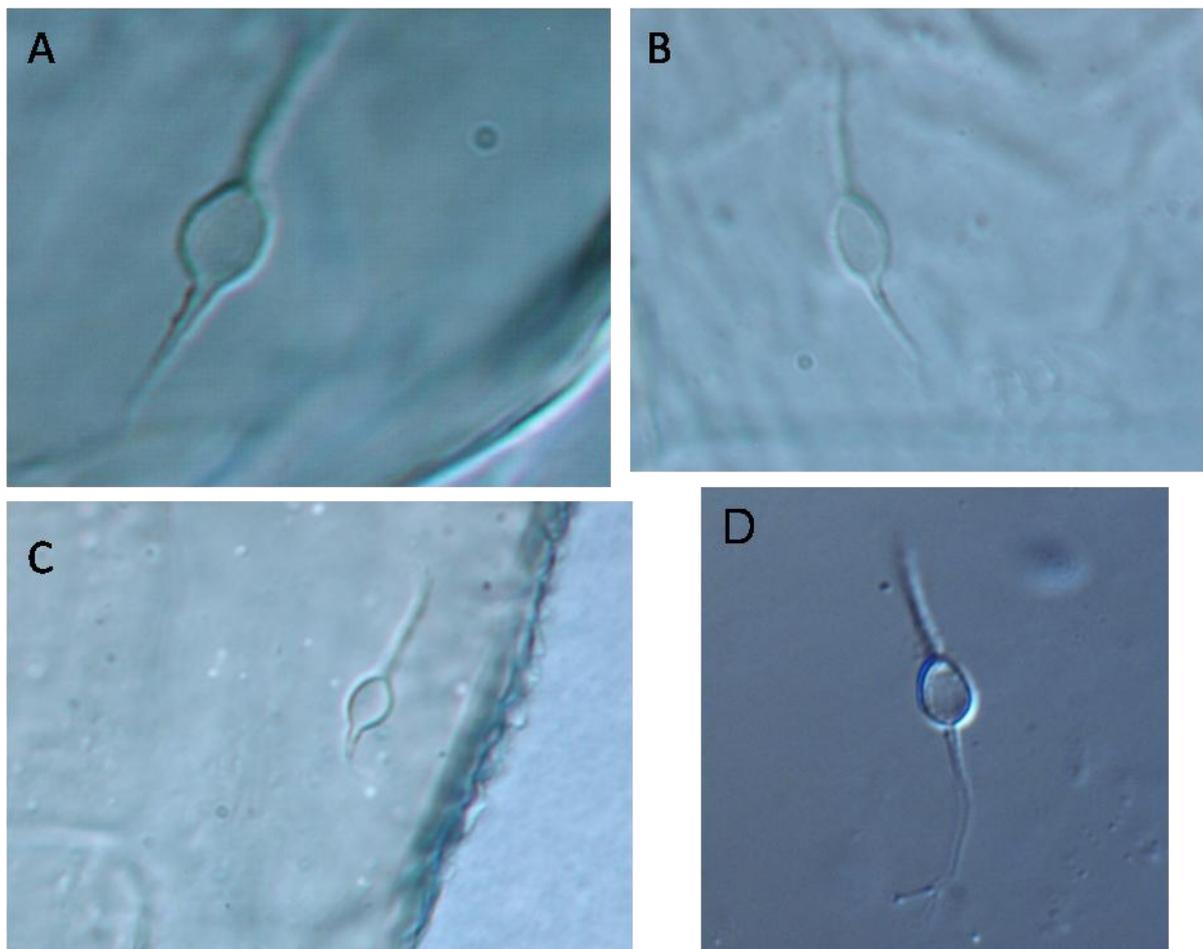
	<i>COI</i> (DNF DNR)	<i>COI</i> (LCO HCO)	ITS2	D1-D3
<b>Intraespecífica mínima</b> (≠ de 0)	0,25 ( <i>B. grupo phoenicis</i> espécie F)	0,81 ( <i>B. grupo cuneatus</i> sp. 1)	0,26 ( <i>B. grupo cuneatus</i> sp. 1)	0,07 ( <i>B. grupo phoenicis</i> espécie F)
<b>Intraespecífica máxima</b>	1,39 ( <i>B. grupo phoenicis</i> tipo 1)	1,53 ( <i>B. incognitus</i> )	2,78 ( <i>B. chilensis</i> )	0,63 ( <i>B. obovatus</i> )
<b>Interespecífica mínima</b> (≠ de 0)	2,95 ( <i>B. chilensis</i> & <i>B. obovatus</i> )	3,30 ( <i>B. chilensis</i> & <i>B. grupo ? sp.</i> )	6,34 ( <i>B. incognitus</i> & <i>B. yothersi</i> )	1,17 ( <i>B. incognitus</i> & <i>B. yothersi</i> )
<b>Interespecífica máxima</b>	19,27 ( <i>B. oleae</i> & <i>B. grupo californicus</i> espécie A)	19,51 ( <i>B. oleae</i> & <i>B. grupo californicus</i> espécie B)	55,81 ( <i>B. grupo cuneatus</i> sp. 1 & <i>B. obovatus</i> )	19,36 ( <i>B. oleae</i> & <i>B. obovatus</i> )
<b>C/ grupos externos</b> (mínimo - máximo)	<i>c/ Cenopalpus pulcher</i> (14,04 – 21,43)	<i>c/ Raoiella indica</i> (22,40 – 25,62)	<i>c/ Tetranychus urticae</i> (não calculado)	<i>c/ Raoiella indica</i> (21,99 – 26,57)

### 2.3.4 Integração de dados moleculares e morfológicos

Com base nos caracteres morfológicos considerados por Baker & Tuttle (1987) foram identificadas cinco espécies pertencentes ao grupo *phoenicis* – *B. yothersi*, *B. n yothersi*, *B. incognitus*, *B. grupo phoenicis* espécie F e *B. grupo phoenicis* tipo 1. Nas análises filogenéticas essas espécies foram polifiléticas. Três delas foram agrupadas entre si e separadas das demais, e outras duas foram agrupadas com *B. obovatus*.

No clado composto exclusivamente por espécies com características do grupo *phoenicis* (denominado "grupo *phoenicis*" no presente trabalho) pode-se identificar dois táxons: 1. *B. yothersi* Baker, 1949 (anteriormente considerado uma sinônimo de *B. phoenicis* e recentemente reconsiderado como táxon válido por Ochoa (comunicação pessoal 2014) foi o mais frequente nas amostras estudadas, coletado em um grande número de hospedeiros e

localidades/países; 2. *B. incognitus* Ferragut & Navia, 2013, descrita de coqueiros do norte de Minas Gerais, Brasil. Outra espécie do agrupamento, coletada de hibisco de Pernambuco, Brasil, não pode ser nomeada, mas corresponde ao fenótipo B2 apresentado em Navia *et al.* (2013). Naquela publicação, os autores apontaram diferenças morfológicas que o distinguiam de *B.* grupo *phoenicis* tipo 2 (atualmente *B. yothersi*), mas levantaram a necessidade de estudos mais detalhados para averiguar se realmente constitui um táxon distinto ou se as diferenças consistiam em variabilidade intraespecífica de *B. yothersi*. No presente trabalho essa linhagem foi nomeada como *B. n. yothersi*. Espécimes dessas três linhagens apresentam semelhança na forma da espermateca, a qual é oval longitudinalmente, com uma projeção distal em forma de pedúnculo (Figura 5) e se distinguem principalmente pelo padrão de ornamentação dorsal e na forma e tamanho das setas dorsais. No agrupamento do grupo *phoenicis*, além daquelas três táxons/linhagens, as árvores filogenéticas indicaram a presença de até três linhagens distintas, dependendo da região analisada. Essas linhagens foram constituídas por espécimes coletados em coqueiros em Minas Gerais, Brasil, nomeadas *B. n. incognitus* sp. 1 e 2; ou em citros na Argentina, linhagem nomeada *B. n. yothersi* 2. O estudo morfológico com microscopia óptica, com contraste de interferência diferencial (DIC), não permitiu a distinção dessas linhagens de *B. incognitus* e de *B. yothersi*, respectivamente.



**Figura 5:** Espermateca de ácaros *Brevipalpus* do grupo *phoenicis*, micrografias em contraste de interferência diferencial (DIC) (objetiva 100x). **A.** *Brevipalpus yothersi*, colônias mantidas sobre frutos de laranja, Brasília, DF; **B.** *Brevipalpus n. yothersi*, coletado em hibiscus de Pernambuco, Brasil; **C.** *Brevipalpus incognitus*, coletado em coqueiro, Minas Gerais, Brasil; **D.** *Brevipalpus yothersi*, coletado em laranjeiras, Bella Vista, Corrientes, Argentina. (Fotos: D. Navia, Embrapa Cenargen, Brasil & F. Ferragut, UPV, Espanha).

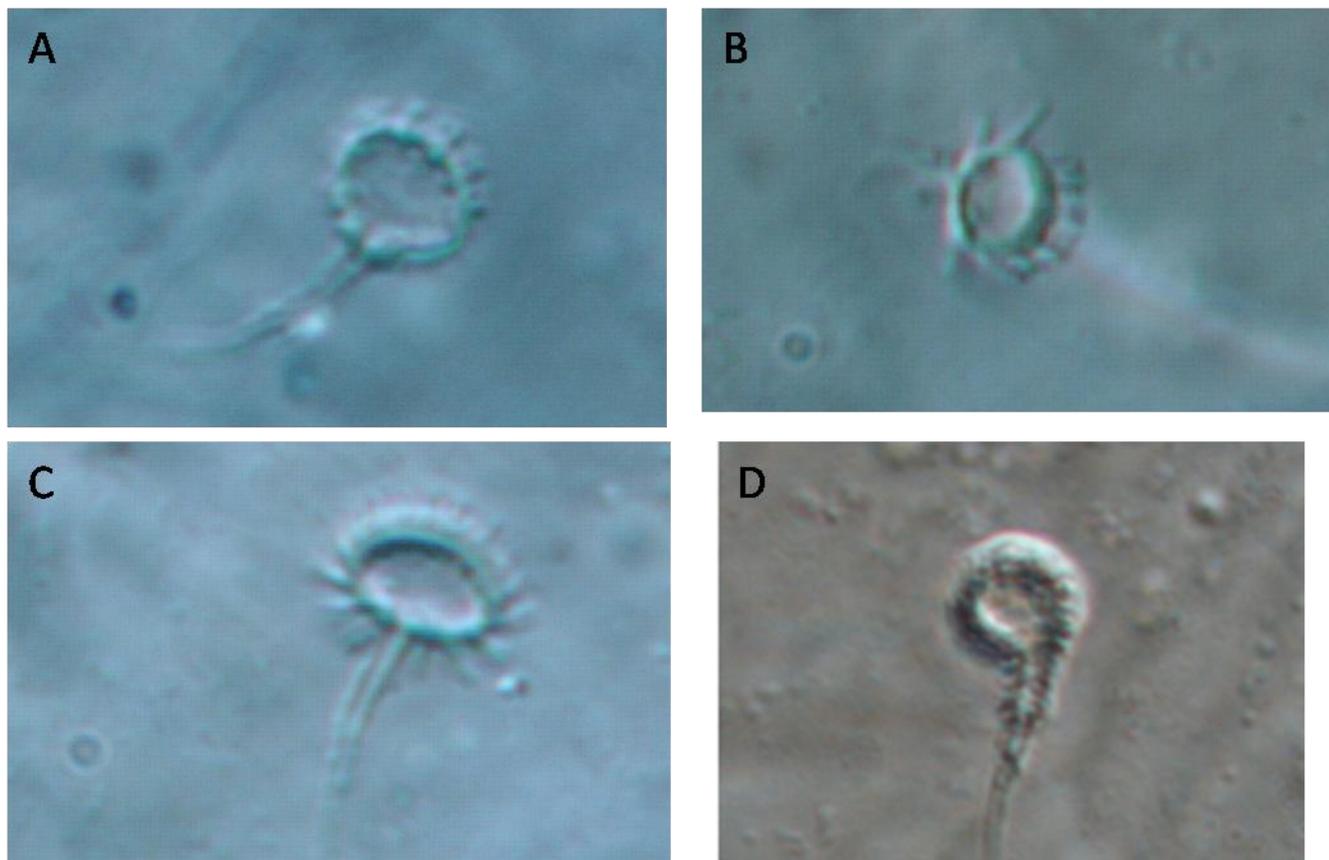
As outras duas linhagens morfológicamente identificadas como pertencentes ao grupo *phoenicis* correspondem àquelas provisoriamente designadas como *B. grupo phoenicis* tipo 1 por Beard *et al.* (2012) e *B. grupo phoenicis* espécie F por Beard *et al.* (2013). Nas árvores filogenéticas essas espécies foram agrupadas com *B. obovatus* e *B. chilensis* (Figuras de 1 a 4), em um clado designado nesse trabalho como "grupo *obovatus*". Apesar dessas espécies apresentarem dois solenídios no tarso II (o que as fez serem identificadas como pertencentes ao grupo *phoenicis*), a forma da espermateca é similar às das espécies do grupo *obovatus*.

Todas as linhagens/táxons que formaram o clado "grupo *obovatus*" apresentam a espermateca arredondada (ou ligeiramente elíptica), em sua maioria com projeções em forma de dedos, as quais podem ser proximais (base), ou estar presentes também na região distal (formando uma coroa) (Figura 6). De acordo com Beard *et al.* (2013) *B. grupo phoenicis* espécie F, coletada da planta ornamental *Myoporum laetum* G. Forst (Scrophulariaceae) na Espanha, apresenta a espermateca terminando em um bulbo membranoso alongado. Entretanto, nesse estudo, com a observação de mais de 40 espécimes dessa população, foi possível encontrar uma fêmea com a espermateca desenvolvida (Figura 6-D), a qual apresentou a forma geral das espermatecas de outras espécies/linhagens do grupo *obovatus*.

Na filogenia da região *COI* amplificada com os *primers* DNR & DNF, além das quatro espécies identificadas morfológicamente (*B. obovatus*, *B. chilensis*, *B. grupo phoenicis* tipo 1 e *B. grupo phoenicis* espécie F), observou-se a presença de uma linhagem distinta, coletada em citros na Espanha (ES Cisi 13). Nas preparações de microscopia dessa amostra não foram encontrados espécimes do grupo *obovatus*. Não foi possível recuperar o exoesqueleto desse espécime após a extração de DNA. As únicas espécies comumente encontradas em citros na Espanha são *B. californicus* e *B. lewisi* (Ferragut, comunicação pessoal 2014). Será necessário realizar novas coletas de ácaros *Brevipalpus* dessa população para averiguar a presença de espécimes do grupo *obovatus*. Também na filogenia obtida a partir desse fragmento, uma outra linhagem foi diferenciada, composta por uma sequência depositada no GenBank (Groot & Breeuwer 2006), a partir de espécime

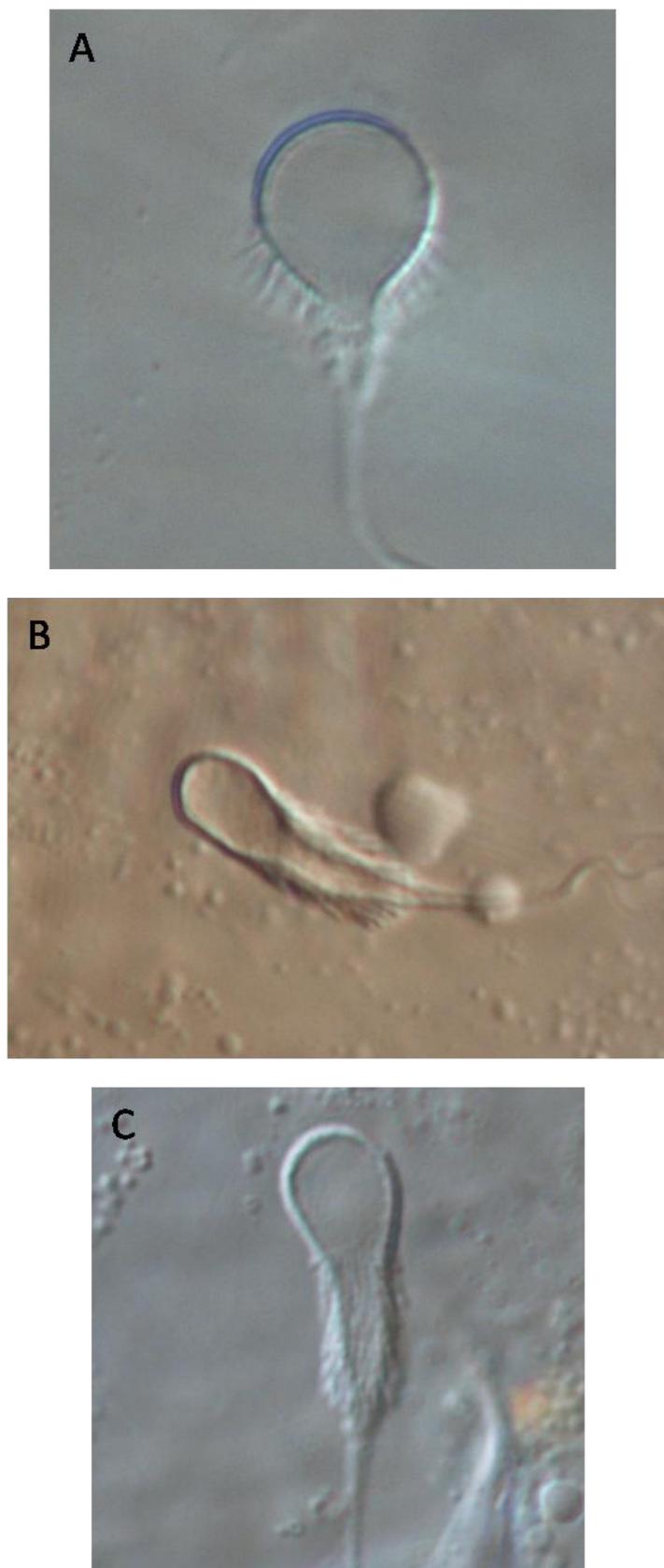
coletado em acerola em Minas Gerais; não se teve acesso aos espécimes *voucher* dessa população para estudo morfológico.

No clado do grupo *obovatus*, na filogenia obtida a partir de sequências da região ITS2, a população de *Ribes punctatum* Ruiz, Pav. (Grossulariaceae) espécie nativa coletada em área natural no Chile, formou uma linhagem distinta, próxima a *B. chilensis*. Nas filogenias obtidas a partir dos demais fragmentos, essa população se diferenciava, mas as distâncias genéticas com as demais populações de *B. chilensis* sugeriam tratar-se de variabilidade intraespecífica. Espécimes dessa população apresentam ornamentação dorsal um pouco distinta das demais populações de *B. chilensis* estudadas. Nessa filogenia também se observou a presença de uma linhagem próxima a *B. obovatus* constituída por espécimes de *ligustrum* de Brasília, DF e de *Helichrysum stoechas* Korbblütler (Asteraceae) de Valencia, Espanha. A principal diferença morfológica observada em espécimes dessas populações foi a forma da espermateca, com ausência de projeções na região distal (sem coroa, apenas projeções basais).



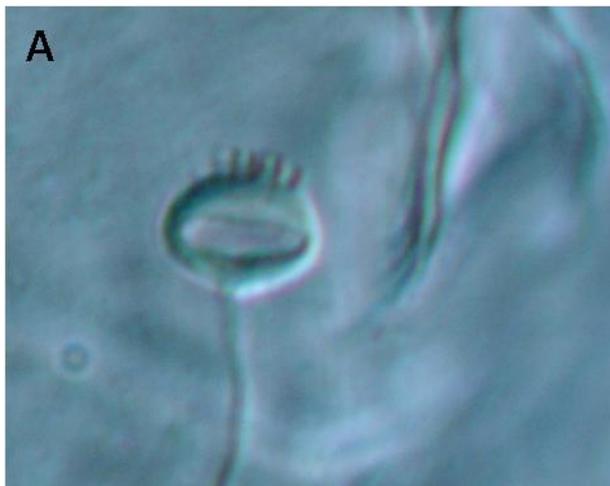
**Figura 6:** Espermateca de ácaros *Brevipalpus* do grupo *obovatus*, micrografias em contraste de interferência diferencial (DIC) (objetiva 100x). **A.** *Brevipalpus* grupo *phoenicis* Tipo 1, coletado em *Alnus subcordata*, Colombo, Paraná; **B.** *Brevipalpus obovatus*, coletado em manjeriço, em Aracaju, Sergipe, Brasil; **C.** *Brevipalpus chilensis*, coletado em videiras, Chile; **D.** *Brevipalpus* grupo *phoenicis* espécie F. (Fotos: F. Ferragut, UPV, Espanha & D. Navia, Embrapa Cenargen, Brasil).

Entre as amostras contendo espécimes identificados morfológicamente como pertencentes ao grupo *cuneatus* de acordo com Baker & Tuttle (1987) foi possível distinguir três táxons - *B. oleae* e mais duas espécies, as quais se distinguem de todas as demais espécies que compõem o grupo, pela ornamentação ventral e dorsal. É possível que esses dois táxons, coletados em alecrim e erica, plantas nativas na região mediterrânea da Espanha, sejam novos para a ciência. As populações do grupo *cuneatus* foram monofiléticas para todos os marcadores, e formaram um clado exclusivo. Além das características morfológicas apresentadas por Baker & Tuttle (1987) para o grupo *cuneatus*, essas espécies apresentam semelhança na forma da espermateca, as quais são em forma de foguete, com a região distal arredondada (*B. oleae*) ou elíptica (as demais espécies), e a base cônica; projeções em forma de finos espinhos ou semelhante a densa pilosidade na metade proximal da espermateca, extendendo-se desde a região basal cônica (Figura 7). As espécies de alecrim e erica também apresentam similaridade na ornamentação dorsal.



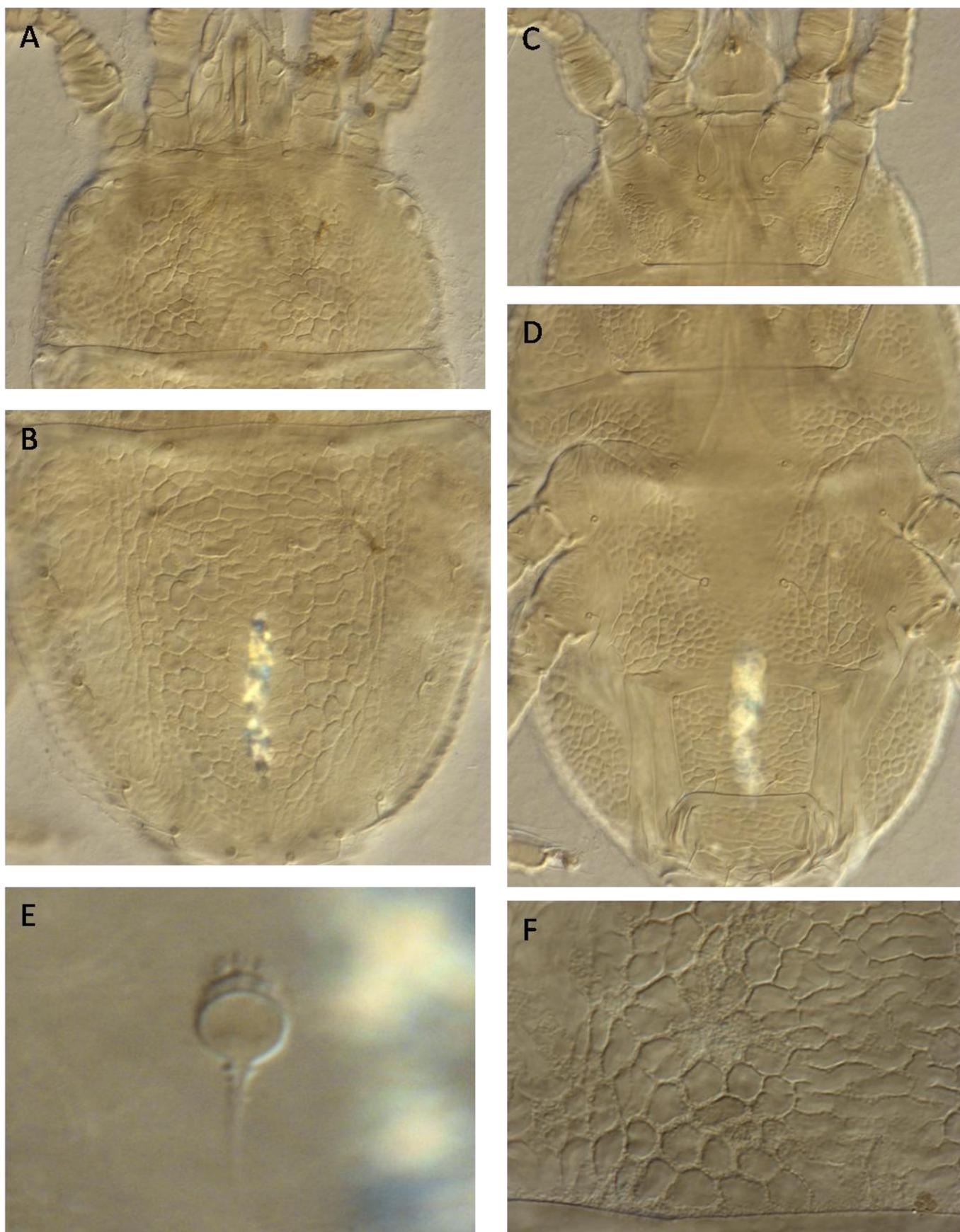
**Figura 7:** Espermateca de ácaros *Brevipalpus* do grupo *cuneatus*, micrografias em contraste de interferência diferencial (DIC) (objetiva 100x). **A.** *Brevipalpus oleae*, coletado em oliveira, Valencia, Espanha; **B.** *Brevipalpus* grupo *cuneatus* sp. 1, coletado em alecrim, Valencia, Espanha; **C.** *Brevipalpus* grupo *cuneatus* sp. 2, coletado em *Erica* sp., Castellón, Espanha. (Fotos: F. Ferragut, UPV, Espanha).

Com base nos caracteres morfológicos foram identificadas três espécies do grupo *californicus* segundo Baker & Tuttle (1987) nas amostras estudadas. Duas delas, coletadas em *Citrus sinensis* e em *Pittosporum tobira*, na Espanha, correspondem, respectivamente, às espécies do grupo provisoriamente classificadas como A e B por Beard *et al.* (2013). A outra espécie do grupo, coletada em hibisco em Pernambuco, Brasil, não foi reconhecida quando comparada às espécies do grupo *californicus* até então descritas. Assim como no grupo *cuneatus*, as espécies identificadas como sendo do grupo *californicus* foram monofiléticas e formaram um agrupamento exclusivo, para todas as regiões do genoma estudadas. Além dos caracteres que as identificam como pertencentes ao grupo *californicus*, as três espécies apresentam como característica comum a forma da espermateca, a qual é elíptica, com as paredes espessas (especialmente a área distal), com projeções na área distal, em forma de dedos curtos, de comprimento uniforme (Figura 8). As principais diferenças entre as espécies do grupo *californicus* foram observadas no padrão da ornamentação dorsal. Além dos táxons do grupo *californicus* encontrados nas amostras estudadas, na filogenia da região *COI* amplificada com os *primers* DNR & DNF observou-se a presença de uma linhagem adicional, a qual corresponde a uma sequência depositada no GenBank, coletada em *Rhododendron* sp. e, Minas Gerais, Brasil publicada por Groot & Brewer (2006), a qual não pôde ser estudada morfológicamente.



**Figura 8:** Espermateca de um ácaro *Brevipalpus* do grupo *californicus*, micrografia em contraste de interferência diferencial (DIC) (objetiva 100x). **A.** *Brevipalpus* grupo *californicus* espécie B, coletado em citros nos EUA (Fotos: F. Ferragut, UPV, Espanha & D. Navia, Embrapa Cenargen, Brasil).

Nas filogenias de todos os fragmentos observou-se a presença de uma linhagem composta unicamente por espécimes coletados em citros na Argentina. As distâncias genéticas dessa linhagem com os demais clados e sua posição filogenética sugerem que a mesma pertença a um grupo distinto de *phoenicis*, *obovatus*, *cuneatus* e *californicus*. Nessa amostra, além de espécimes identificados como *B. yothersi*, foram encontrados espécimes que, de acordo com Baker & Tuttle (1987), seriam classificados como pertencentes ao grupo *obovatus* (seis pares de setas histerossomais, um solenídio no tarso II, três setas no palpo). Entretanto, esses espécimes apresentaram a ornamentação dorsal diferente das espécies do grupo *obovatus*; a espermateca de forma distinta, arredondada, com uma extensão membranosa e três projeções em forma de dedos levemente espatulados na região distal; poros propodossomais e opistossomais extremamente pronunciados (Figura 9). Essa espécie não se assemelha a nenhuma das espécies descritas no grupo *obovatus*.



**Figura 9:** *Brevipalpus* sp. coletado em *Citrus sinensis*, Bella Vista, Corrientes, Argentina, micrografias em contraste de interferência diferencial (DIC). A. propodosoma dorsal; B. opistossoma dorsal; C. propodossoma ventral; D. opistossoma ventral (objetiva 40x); E. espermateca (objetiva 100x); F. superfície do poro do propodossoma (objetiva 100x). (Fotos F. Ferragut, UPV, Espanha)

## 2.4 DISCUSSÃO

### 2.4.1 Avaliação de protocolos de extração de DNA

A avaliação dos protocolos de extração de DNA mostrou que a amplificação do DNA foi inferior para o método não destrutivo (indivíduos inteiros). A utilização desse método não permitiria a obtenção de sequências dos diversos fragmentos a partir de um único espécime, o que seria essencial nessa fase de avaliação de *primers* e de variabilidade das diferentes regiões do genoma. Por outro lado, a utilização do método de extração de DNA com rompimento do tegumento (parcialmente destrutivo) apresentou como ponto negativo a impossibilidade de recuperação de todos os espécimes, o que é indesejável considerando a comum ocorrência de amostras contendo mais de uma espécie. Com o avanço dos estudos de sistemática molecular de ácaros *Brevipalpus* e, conseqüentemente, o conhecimento das informações obtidas a partir de cada região do genoma, os trabalhos futuros não precisarão explorar as quatro regiões avaliadas nesse trabalho, apenas as que se mostraram filogeneticamente mais informativas ou que trouxeram informações complementares. Nesse caso, talvez fosse adequada a utilização do método não destrutivo de extração de DNA.

### 2.4.2 Avaliação de primers e protocolos de amplificação de DNA

Os *primers* iniciadores e os protocolos de amplificação de DNA estabelecidos permitiram a obtenção de sequências de excelente qualidade das quatro regiões do genoma estudadas. Entretanto para algumas amostras não foi possível a obtenção de sequências de uma ou duas regiões. Isso é um problema comum nos estudos de sistemática molecular de ácaros, quando se trabalha com um único espécime, portanto, com quantidades muito baixas de DNA, quase que no limite inferior para amplificação através de reações de PCR. Alguns fatores que também podem influenciar nas dificuldades de amplificação do DNA são a pureza do álcool etílico e temperaturas em que as amostras foram coletadas e armazenadas. Além disso, a utilização de *primers* universais (com baixa especificidade) para algumas espécies, que apresentem polimorfismos nas regiões de anelamento, pode impedir a amplificação.

### 2.4.3 Análises filogenéticas

De forma geral, as topologias das árvores filogenéticas obtidas a partir de sequências das quatro regiões do genoma foram consistentes. Apesar de não ter sido possível obter sequências dos quatro fragmentos para todos os espécimes (Tabela 2.7) foi possível fazer a correspondência entre os clados das diferentes árvores a partir das informações sobre as amostras/espécimes sequenciados. Em todas as árvores foi possível distinguir os clados correspondentes aos quatro grupos de *Brevipalpus* – *phoenicis*, *californicus*, *obovatus*, *cuneatus* – e também do clado composto pela população de citrus da Argentina, a qual provavelmente consiste em um grupo distinto. Entretanto, entre as árvores das diferentes regiões do genoma, foram observadas algumas incongruências na divisão de linhagens dentro dos grupos *phoenicis* e *obovatus*.

No clado do grupo *phoenicis*, as filogenias obtidas a partir de sequências da região *COI* indicaram a separação de linhagens não diferenciadas de *B. yothersi* nas filogenias das regiões nucleares ribossômicas. Na filogenia da região *COI* (*primers* DNF & DNR), observou-se a presença de duas linhagens adicionais: *B. n. yothersi* 1, composta por espécimes de hibisco de Pernambuco, Brasil; e *B. n. yothersi* 2, composta por espécimes de flamboyant de São Paulo, Brasil e de citros da Argentina. Na filogenia da região *COI* (*primers* LCO & HCO), observou-se a presença de uma linhagem adicional, nomeada *B. n. yothersi*, composta pelos espécimes de hibisco de Pernambuco, de flamboyant de São Paulo, e de citros da Argentina. Portanto, observa-se que as filogenias mitocondriais evidenciaram um distanciamento genético nessas populações que não foi detectado nas filogenias nucleares. Diferenças na separação de linhagens também foram observadas entre a filogenia da região ITS2 e as demais regiões estudadas para linhagens próximas a *B. incognitus*. Nas filogenias da região *COI* (de ambos os *primers*) e subunidade D1-D3 (28S) observou-se a distinção da linhagem nomeada como *B. n. incognitus*, composta por espécimes de coqueiros de Minas Gerais e Roraima; entretanto na filogenia ITS2 essa linhagem foi subdividida em duas, uma com espécimes de Minas Gerais (*B. n. incognitus* 1) e outra com espécimes de Roraima (*B. n. incognitus* 2).

No clado do grupo *obovatus* observaram-se diferenças na divisão de linhagens relacionadas a *B. chilensis* e a *B.* grupo *phoenicis* tipo 1. Nas filogenias das regiões COI e D1-D3 espécimes de *Ribes punctatum* do Chile formaram um clado em *B. chilensis*; já na filogenia da região ITS2 esses espécimes constituíram uma linhagem distinta.

É necessário integrar dados biológicos e estudos morfológicos mais detalhados (diferentes técnicas de microscopia) às informações moleculares para esclarecer se essas linhagens próximas a *B. yothersi*, *B. incognitus*, *B. chilensis* constituem ou não outros táxons, isto é, se ocorreu especiação ou apenas o início de um distanciamento genético.

Sequências de *B.* grupo *phoenicis* tipo 1 foram obtidas unicamente para as regiões COI (*primers* DNF & DNR) e ITS2. Nas filogenias dessas duas regiões, além dessa linhagem observou-se a presença de uma linhagem próxima, a qual foi nomeada *B. n.* grupo *phoenicis* tipo 1. Na filogenia da região COI (*primers* DNF & DNR) essa linhagem adicional foi constituída por uma sequência recuperada do GenBank, coletada de acerola de Minas Gerais e na da região ITS2 essa linhagem foi constituída por espécimes de ligustro do Distrito Federal. Não é possível determinar se essas linhagens são correspondentes pois não se teve acesso aos espécimes *voucher* que geraram a sequência recuperada do GenBank.

Nos cladogramas do grupo *californicus* e *cuneatus* não foram observadas incongruências na divisão de linhagens. As diferenças nas topologias ocorreram devido à diferente composição das mesmas, pois não foram obtidas sequências de todas as amostras que continham espécimes do grupo para todas as regiões do genoma.

A principal diferença na topologia das árvores filogenéticas, no que se refere às relações entre os grupos de *Brevipalpus*, foi a posição do clado do grupo *cuneatus*. Nas filogenias das regiões ITS2 e D1-D3 o grupo *cuneatus* formou um clado separado dos demais grupos, os quais estavam reunidos em um único clado. Entretanto, na filogenia da região COI (*primers* DNF & DNR) o grupo *cuneatus* foi posicionado junto ao grupo *phoenicis*, e esses dois grupos foram separados dos demais, os quais formaram outro clado. Na filogenia da região COI (*primers* LCO & HCO), o grupo *cuneatus* apresentou-se polifilético;

*Brevipalpus oleae* foi separado das demais espécies do grupo *cuneatus*, bem como de todos os demais grupos/clados.

Observou-se, portanto, que as filogenias obtidas dos fragmentos *COI*, para ambos os *primers*, e da região ITS2 proporcionaram uma maior subdivisão de linhagens em relação à subunidade D1-D3 (28S). A detecção de uma maior variabilidade genética nessas regiões pode estar relacionada à taxa de evolução dos fragmentos estudados e ao modo de herança. Outras razões para explicar a divergência entre os valores de distância de marcadores nucleares e mitocondriais podem estar relacionadas à hibridização ou a presença de parasitas reprodutivos (e.g., Breeuwer & Jacobs 1996) que já foram relatados para *Brevipalpus* (Groot & Breeuwer 2006) e podem provocar pressões seletivas no mtDNA (Hurst & Jiggins 2005). Para a construção de uma sistemática consistente de um grupo de organismos, bem como para a definição de métodos diagnósticos, as regiões do genoma que apresentam baixa variabilidade intraespecífica e alta variabilidade interespecífica são mais interessantes.

#### 2.4.4 Distâncias genéticas

O fragmento do gene *COI* correspondente a região “*barcoding*” (Folmer *et al.* 1994) gerou valores estimados de distância para as espécies de *Brevipalpus* similares àsquelas encontrados para o gênero *Raoiella* observados a partir de sequências obtidas por Dowling *et al.* (2012) . A distância entre *B. yothersi* e *B. incognitus* foi de 8,81% e entre *B. chilensis* e *B. obovatus* 4,08%. A maior distância registrada foi de 19,51%, observada entre *B. oleae* e *B. grupo californicus* espécie B. Entre as espécies de *Raoiella* apresentadas por Dowling *et al.* (2012) a menor distância foi de 6,42 %, entre *R. sp.* e *R. sp.3*. A maior distancia foi de 28,61% entre *R. indica* e *R. macfarnei*.

A região ITS 2 é conhecida por apresentar um bom desempenho para delinear espécies do gênero *Tetranychus* (Navajas *et al.*, 1998;. Navajas & Boursot 2003; Ben-David *et al.* 2007; Hurtado *et al.* 2008). A distância entre espécies desse gênero variou de 5.37% a 11.74%, exceção aos grupos formados por espécies intimamente relacionadas como as espécies do grupo 9

*Tetranychus sensu stricto* segundo Flechtmann e Knihinicki (2002) que variou de 1,1 (*T. urticae* e *T. turkestanii*) a 2,2% (*T. urticae* e *T. truncatus*). Outro grupo muito próximo cujos valores de distância foram baixos foi *T. pacificus* McGregor e *T. mcdanielii* McGregor (1.75%).

Em Phytoseiidae foram encontrados os seguintes valores de distância medidos pelo ITS2, *Amblyseius herbicolus* e *A. largoensis* (5,89%), *Neoseiulus californicus* e *N. picanus* (4,17%) e *Tiphlodromus phialatus* e *T. exhilaratus* (4,75%) (Navia *et al.* 2014). A distância média entre esses três gêneros variou de 12,09 a 33.38%.

Para as espécies de *Brevipalpus* valores interespecíficos semelhantes aos observados em Tetranychidae e Phytoseiidae foram encontrados entre *B. yothersi* e *B. incognitus* (6,34%), *B. chilensis* e *B. n. chilensis* (CH Ripu) (5,74%) e para as duas espécies do grupo *cuneatus* (6,69%). O valor de distância estimado entre *B. chilensis* e *B. obovatus* (20,74%), sugere mais de uma linhagem presente no clado que os agrupa. Estudos morfológicos aprofundados podem indicar a existência de uma ou mais linhagens em *B. chilensis* (o qual apresentou maior variabilidade intraespecífica) e auxiliar na delimitação dos grupos com a obtenção de novos valores de distâncias.

#### **2.4.5 Caracteres taxonômicos em um contexto filogenético**

Até o momento, a sistemática dos ácaros *Brevipalpus* foi construída baseada unicamente em caracteres morfológicos. A obtenção de informações sobre as relações filogenéticas entre as espécies permite determinar os caracteres morfológicos que refletem suas relações de parentesco e, portanto, que deveriam ter maior valor para a taxonomia do grupo. Considerações sobre esse assunto apresentadas por Navia *et al.* (2013) podem ser reforçadas com os resultados do presente estudo, o qual inclui um maior número de táxons e de grupos diferentes, assim como informações sobre um maior número de regiões do genoma. A classificação dos grupos de *Brevipalpus* por Baker & Tuttle (1987) deve ser revisada considerando os caracteres morfológicos dos táxons que compõem os agrupamentos genéticos.

Um caráter que tem sido utilizado na taxonomia de *Brevipalpus* é o número de solenídios  $\omega$  (*omega*) no tarso da perna II. Observa-se que esse

caráter pode ser utilizado para identificação específica, mas não reflete relações filogenéticas entre os táxons. Por exemplo, no clado do grupo *obovatus*, as espécies *B. grupo phoenicis* tipo 1 e *B. grupo phoenicis* espécie F (nomenclatura provisória de acordo com Beard *et al.* 2012, 2013) apresentam dois solenídios tarso II, enquanto que *B. obovatus* e *B. chilensis* apresentam um único solenídio. Da mesma forma, no clado do grupo *phoenicis*, alguns haplótipos de *B. yothersi* ou *B. n. yothersi* (hibisco de Pernambuco) apresentam número variável de solenídios no tarso II.

O número de setas opistossomais laterais tem sido o mesmo no interior dos clados – seis para os grupos *phoenicis* e *obovatus*, sete para os grupos *californicus* e *cuneatus*. Entretanto os clados de grupos que apresentam o mesmo número de setas histerossomais não são os mais próximos. Por exemplo, considerando as distâncias genéticas entre os táxons (Tabelas 2.9, 2.11, 2.13, 2.15) e também as árvores filogenéticas (Figuras 1, 3, 4), observa-se que o grupo mais próximo de *californicus* (sete setas histerossomais) é *obovatus* (seis setas histerossomais), e não *cuneatus* (sete setas histerossomais) como seria esperado se esse caráter refletisse as relações filogenéticas entre os grupos.

A forma da espermateca em *Brevipalpus* pode ser considerada um caráter “redescoberto”. Castagnoli (1974) foi a primeira autora a explorar a presença da espermateca em Tenuipalpidae e descreveu a estrutura em oito espécies da família, incluindo duas espécies de *Brevipalpus* - *B. californicus* e *B. olivicola* Pegazzano & Castagnoli. Baker & Tuttle (1987) também apresentaram desenhos da espermateca de algumas espécies de *Brevipalpus* do México. Posteriormente, diversos trabalhos de referência para a identificação de espécies de *Brevipalpus* de importância econômica não utilizaram essa estrutura. Recentemente Beard *et al.* (2012, 2013), em uma chave ilustrada incluindo 20 espécies do gênero exploraram essa estrutura como caráter taxonômico. Navia *et al.* (2013) consideraram que a forma geral da espermateca é de grande valor filogenético, pois espécies próximas apresentam a estrutura com a mesma forma ou bastante semelhantes. No presente estudo, em que foram incluídos táxons do grupo *cuneatus*, confirmou-se a proximidade genética entre táxons com similaridade na forma da espermateca – *B. oleae*, *B. grupo cuneatus* sp. 1 e 2 (Figura 7). Além disso, o

táxon composto por espécimes coletados em citros na Argentina (*B.* grupo ? sp.), que apresentam a espermateca de forma bastante peculiar (Figura 9), formou um clado distinto em todas as árvores filogenéticas, apesar de apresentar caracteres que os classificariam no grupo *obovatus*. Além de informação sobre o grupo ao qual a espécie pertence, a espermateca pode ser utilizada, dentro de alguns grupos, para identificação específica; no grupo *obovatus* observaram-se pequenas diferenças na distribuição e comprimento de projeções da espermateca que possibilitaram a separação de espécies (Figura 6).

A forma da espermateca tem se mostrado um caráter estável nos táxons, entretanto, como observado nesse estudo para *B.* grupo *phoenicis* espécie F, pode ocorrer da maioria dos espécimes de uma população apresentar a espermateca não desenvolvida, terminando em um bulbo alongado, sendo necessário o exame de um grande número de espécimes para encontrar uma fêmea com a espermateca desenvolvida.

#### **2.4.6 Informações biológicas obtidas através da identificação acurada de *Brevipalpus***

No presente estudo, além de subsídios para o avanço na sistemática molecular de ácaros do gênero *Brevipalpus*, a identificação acurada de amostras de diferentes localidades e hospedeiros resultou em informações importantes sobre aspectos biológicos desses ácaros, como por exemplo hospedeiros, e também sobre localidades de ocorrência.

Com a revisão taxonômica dos ácaros *Brevipalpus*, muitas dúvidas tem sido levantadas sobre os hospedeiros do principal vetor do vírus da leprose dos citros nas Américas, *B. yothersi* (anteriormente considerado como sendo *B. phoenicis*) (Ochoa, comunicação pessoal 2014). Nesse estudo, observa-se que, além das principais culturas/hospedeiros em que são relatados BTVs (citros, café, maracujá, hibisco, ligustro) esse ácaro-praga infesta diversas outras frutíferas (siriguela, acerola), plantas ornamentais (flamboyant, tamareira anã, malvavisco), hortaliças (batata doce), e também plantas nativas (embaúba). Sobre as localidades de ocorrência observou-se que *B. yothersi* foi coletado em amostras do Brasil, México, Argentina, e Israel (Tabelas 2.8, 2.10, 2.12, 2.14), evidenciando que a espécie apresenta ampla distribuição nas

Américas e sugerindo que também está presente em outros continentes, como no Oriente Médio. Nesse estudo foram identificados ao menos 40 haplótipos (diferentes sequências da região COI amplificada pelos *primers* DNR & DNF) de *B. yothersi* (Tabela 2.8), e observou-se alta variabilidade intraespecífica para a espécie (Tabelas 2.9, 2.11, 2.13, 2.15). Nos estudos morfológicos também observou-se grande variabilidade entre os espécimes de *B. yothersi*, especialmente na ornamentação dorsal, comprimento de setas de adultos e imaturos (Ferragut, comunicação pessoal 2014), o que tem sido relatados por diversos autores. Estudos detalhados sobre a eficiência de diferentes haplótipos como vetores de BTVs estão sendo realizados.

O estudo também permitiu levantar uma hipótese sobre espécies vetoras da leprose dos citros na Argentina. Esse foi o primeiro país da América do Sul onde foi relatada a ocorrência da leprose dos citros (então denominada “lepra explosiva” (Spegazzini 1920, Zeman 1932), e o vetor da doença foi identificado como sendo *B. obovatus* (anteriormente *Tenuipalpus pseudocuneatus*) (Frezzi 1940, Vergani 1945). No presente estudo, foram identificadas duas espécies de *Brevipalpus* em citros na exata localidade onde a leprose dos citros foi relatada pela primeira vez. Uma das espécies foi *B. yothersi* e a outra foi *B. grupo ? sp.*. Além disso a filogenia da região COI indicou a presença de uma linhagem nomeada como *B. n. yothersi*. A espécie *B. grupo ? sp.*, cuja identidade não pode ser esclarecida e filogeneticamente foi separada de todas as demais, seria classificada como pertencente ao grupo *obovatus* com base nos caracteres morfológicos utilizados por Baker & Tuttle (1987). É possível que essa espécie seja a vetora da leprose dos citros relatada por Frezzi (1940) e Vergani (1945). Estudos deverão ser realizados para confirmar essa hipótese.

Novas informações foram obtidas sobre hospedeiros e localidades de ocorrência de *B. incognitus*, anteriormente relatado apenas em coqueiros em Minas Gerais. Nesse trabalho verificou-se a ocorrência da espécie também em tamareira em São Paulo; e em graviola e coqueiros em Roraima. Altas infestações e danos causados por *B. incognitus* foram observados em graviola em Roraima, com milhares de indivíduos sobre frutos totalmente necróticos (Navia, comunicação pessoal 2014).

A ocorrência de amostras contendo mais de uma espécie de ácaros *Brevipalpus* reforça a necessidade de cuidados para o estabelecimento e manutenção de colônias e para a condução de estudos biológicos. É necessário checar frequentemente a identidade dos espécimes de *Brevipalpus* para assegurar que as informações geradas são de uma determinada espécie. Ácaros do gênero *Brevipalpus*, bem como os BTVs, representam um grupo de pragas de importância quarentenária. A identificação precisa das espécies/genótipos de *Brevipalpus* que ocorrem em cada localidade e hospedeiro serão importantes para subsidiar a adoção de medidas de prevenção de espécies exóticas de *Brevipalpus* que podem causar impacto na agricultura. Para o Brasil, além de *B. chilensis* e *B. lewisi*, os quais já são regulamentados como quarentenários ausentes, seria importante evitar a introdução, por exemplo, de espécies do grupo *californicus* associados aos citros, como *B. grupo californicus* espécie A relatado no Japão, México, Espanha e EUA (Beard *et al.* 2013) e, pelo conhecimento atual, ausente no Brasil.

## 2.5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O trabalho representou um avanço importante para a sistemática molecular de ácaros *Brevipalpus*, com a avaliação e otimização de protocolos; produção das primeiras sequências e/ou informações sobre a variabilidade de diferentes regiões do genoma mitocondrial e nuclear para o gênero. A partir das sequências produzidas, poderão ser desenhados *primers* específicos ou desenvolvidos métodos para o diagnóstico molecular de espécies de *Brevipalpus* de importância econômica e quarentenária.

De acordo com a abordagem da taxonomia integrativa é fundamental integrar dados moleculares a dados morfológicos e biológicos nos estudos de sistemática. Nesse trabalho, as informações inéditas geradas sobre as filogenias e distâncias genéticas entre táxons e/ou linhagens das amostras de *Brevipalpus* estudadas permitiram dar uma interpretação sobre as relações filogenéticas entre os mesmos; aclarar o status taxonômico de algumas populações, as quais provavelmente constituem novos táxons para a ciência e serão descritos; e discutir a valor taxonômico de alguns caracteres morfológicos, visando subsidiar a revisão da classificação de grupos do gênero. Entretanto, pode-se considerar que um ponto bastante importante do estudo foi o de indicar a necessidade da condução de estudos mais detalhados, morfológicos e/ou biológicos, para esclarecer a posição taxonômica de linhagens próximas a *B. yothersi*, *B. incognitus* e *B. phoenicis* tipo 1, para as quais não houve consenso entre as filogenias das diferentes regiões, e que podem constituir populações com diferenças genéticas ou espécies crípticas.

## 2.6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Baker, E.W. & Tuttle, D.M. (1987) The false spider mites of Mexico (Tenuipalpidae: Acari). *United States Department of Agriculture, Agricultural Research Service, Technical Bulletin*, 1706, 1-236.
- Beard, J. J., Ochoa, R., Redford, A. J., Trice, M.D., Walters, T. W. & Mitter, C. (2012). Flat mites of the World – Part I *Raoiella* and *Brevipalpus*. Identification Technology Program, CPHST, PPQ, APHIS, USDA; Fort Collins, CO, USA. 1º Ed. Available via <http://idtools.org/id/mites/flatmites/>
- Beard, J. J., Ochoa, R., Redford, A. J., Trice, M.D., Walters, T. W. & Mitter, C. (2013). Flat mites of the World – Part I *Raoiella* and *Brevipalpus*. Identification Technology Program, CPHST, PPQ, APHIS, USDA; Fort Collins, CO, USA. 2º Ed. Available via <http://idtools.org/id/mites/flatmites/>
- Beard, J.J., Ochoa, R., Bauchan, E.B. & Braswell, E. (2014) *Brevipalpus phoenicis* (Geijskes) species complex – resurrection of E.W. Baker's species (Acari: Tenuipalpidae). Em *Abstract Book, XIV International Congress of Acarology, Kyoto, Japão, Julho 13-18, 2014*.
- Breeuwer, J.A.J., Jacobs, G. (1996). *Wolbachia*: intracellular manipulators of mite reproduction. *Exp Appl Acarol*, 20,421–434.
- 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.
- Castagnoli, M. (1974) La spermateca in alcun especie di *Brevipalpini* (Acarina, Tenuipalpidae). *Redia*, 55, 85–88.

- Chagas, C.M., Kitajima, E.W. & Rodrigues, J.C.V. Coffee ringspot virus vectored by *Brevipalpus phoenicis* (Acari: Tenuipalpidae) in coffee. *Experimental and Applied Acarology*, 30, 203–213.
- Cheraghian, A. (2013) A Guide for Diagnosis & Detection of Quarantine Pests - Chilean false red mite, *Brevipalpus chilensis* Baker, 1949 (Acari: Tenuipalpidae). *Bureau of Plant Pest Surveillance and Pest Risk Analysis*.
- Childers, C.C., Rodrigues, J.C.V., Derrick, K.S., Achor, D.S., French, J.V., Welbourn, W.C., Ochoa, R. & Kitajima, E.W. (2003a) Citrus leprosis and its status in Florida and Texas: past and present. *Experimental and Applied Acarology*, 30, 181-202.
- Childers, C.C., Rodrigues, J.C.V. & Welbourn, W.C. (2003b) Host plants of *Brevipalpus californicus*, *B. obovatus* and *B. phoenicis* (Acari: Tenuipalpidae) and their potential involvement in the spread of one or more viruses. *Experimental and Applied Acarology*, 30(1/3), 29–105.
- Darriba, D., Taboada, G. L., Doallo, R., Posada, D. (2012). jModel Test 2: more models, new heuristics and parallel computing. *Nat Methods*, 9(8), 772.
- Dowling, A.P.G., Ochoa, R., Beard, J.J., Welbourn, W.C. & Ueckermann, E.A. (2012) Phylogenetic investigation of the genus *Raoiella* (Prostigmata: Tenuipalpidae): diversity, distribution and world invasions. *Experimental and Applied Acarology*, 57(3-4), 257-69.
- Fawcett, H. S. (1963). *Citrus diseases and their control*. New York: McGraw Hill (582p).
- Felsenstein, J. (1985). Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. *Evolution* 39:783-791.
- Folmer, O., Black, M., Hoeh, W., Lutz, R. & Vrijenhoek, R. (1994) DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome *c* oxidase subunit I from diverse

metazoan invertebrates. *Molecular Marine Biology and Biotechnology*, 3(5), 294-299.

Frezzi, M.S. (1940) La lepra explosiva del naranjo – Investigaciones realizadas por el laboratorio de patología de Bella Vista (Corrientes). *Boletín Frutas y Hortalizas* no. 5. Buenos Aires Argentina. Ministerio de la Agricultura.

Groot, T. V. M. & Breeuwer, J. A. J. (2006). *Cardinium* symbionts induce haploid thelytoky in most clones of three closely related *Brevipalpus* species. *Experimental and Applied Acarology*, 39, 257-271.

Guidon, S., Dufayard, J. F., Lefort, V., Anisimova, M., Hordijk, W. Gascuel, O. (2010). New Algorithms and Methods to Estimate Maximum-Likelihood Phylogenies: Assessing the Performance of PhyML 3.0. *Systematic Biology*, 59(3), 307-321.

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.

Hebert, P. D. N., Cywinska, A., Ball, S. L. & de Waard, J. R. (2003). Biological identifications through DNA barcodes. *Proc. R. Soc. Lond.*, B270, 313–322.

Hoy, M. A. (2011). *Agricultural Acarology: Introduction to Integrated Mite Management*. CRC Press. (114p).

Hurst, G. D. D., Jiggins, F. M. (2005). Problems with mitochondrial DNA as a marker in population, phylogeographic and phylogenetic studies: the effects of inherited symbionts. *Proc R Soc B*, 272, 1525–1534.

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.

Jeppson, L. R. (1989). Biology of citrus insects, mites and mollusks, pp. 1-81. In: W. Reuther, E. C. Calavan, and G. E. Carman (eds.), *The citrus industry*, vol. 4. The Regents of the University of California, Oakland, CA.

Jeppson, L.R, Keifer, H.H. & Baker, E.W. (1975) *Mites Injurious to Economic Plants*. University of California Press, Berkeley, 614pp.

Kimura, M. (1980). A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution*, 16(2), 111–120.

Kitajima, E.W., Rezende, J.A.M., Rodrigues, J.C.V., Chiavegato, L.G., Piza Jr., C.T. & Morozini, W. (1997). Green spot of passion fruit, a possible viral disease associated with infestation by the mite *Brevipalpus phoenicis*. *Fitopatologia Brasileira*, 22, 555–559.

Kitajima, E.W., Chagas, C.M. & Rodrigues, J.C. (2003) *Brevipalpus*-transmitted plant virus and virus-like diseases: cytopathology and some recent cases. *Experimental and Applied Acarology*, 30(1/3), 135–160.

Kitajima, E. W., Rodrigues, J. C. V. & Freitas-Astua, J. (2010) An annotated list of ornamentals naturally found infected by *Brevipalpus* mite-transmitted viruses. *Scientia Agricola*, 67(3), 348-371.

Librado, P. & Rozas, J. (2009). DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics*, 25, 1451–1452.

Mesa, N.C., Ochoa, R., Welbourne, W.C., Evans, G.A. & Moraes, G.J. (2009) A catalog of the Tenuipalpidae (Acari) of the world with a key to genera. *Zootaxa*, 2098, 1-185.

- Moraes, G. J. & Flechtmann, C. H. W. (2008). *Manual de Acarologia – Acarologia Básica e Ácaros de Plantas Cultivadas no Brasil*. Holos Editora, Ribeirão Preto. 308p.
- 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., 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., 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, 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.
- Navia, D., Moraes, G. J. & Flechtmann, C. H. W. (2006). Phytophagous mites as invasive alien species: quarantine procedures. In: J. B. Morales-Malacara, V. Behan-Pelletier, E. Ueckermann, T. M. Pérez, E. Estrada, C. Gispert & M. Badii (Eds). *Proceedings of the XI International Congress of Acarology, Acarology XI*. (pp. 87-96). Mexico DF: UNAM/ Sociedad Latinoamericana de Acarología.

- Navia, D., Mendonça, R.S., Ferragut, F., Miranda, L.C., Trincado, R.C., Michaux, J. & Navajas, M. (2013) Cryptic diversity in *Brevipalpus* mites (Tenuipalpidae). *Zoologica Scripta*, 42(4), 406-426.
- Navia, D., Domingos, C. A., Mendonça, R. S., Ferragut, F., Rodrigues, M. A. N., Morais, E. G. F., Tixier, M. S., Gondim Jr., M. G. C. (2014). Reproductive compatibility and genetic and morphometric variability among populations of the predatory mite, *Amblyseius largoensis* (Acari: Phytoseiidae), from Indian Ocean Islands and the Americas. *Biological Control*, 72, 17-29.
- Park, J. K., Foighil, D. (2000) Sphaeriid and corbiculid clams represent separate heterodont bivalve radiations into freshwater environments. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 14, 75–88.
- Rodrigues, J.C., Gall-Meagher, M., Ochoa, R., Childers, C.C. & Adams, B.J. (2004) Mitochondrial DNA and RAPD polymorphisms in the haploid mite *Brevipalpus phoenicis* (Acari: Tenuipalpidae). *Experimental & Applied of Acarology*, 34, 275–290.
- Rodrigues, J.C., Kitajima, E.W., Childers, C.C. & Chagas C.M. (2003) Citrus leprosis virus vectored by *Brevipalpus phoenicis* (Acari: Tenuipalpidae) in citrus in Brazil. *Experimental & Applied of Acarology*, 30(1/3), 161–179.
- 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. *Exp Appl Acarol*, 42, 239–262.
- Spegazzini, C. (1920) Sobre algunas enfermedades y hongos que afectan plantas de “agrios” en el Paraguay. *Annales de la Sociedad Científica Argentina*, 90, 155-188.

- Staden, R., Beal, K. F. & Bonfield, J. K. *The Staden Package*, 1998. Computer Methods in Molecular Biology. In: Misener, S. & Krawetz, S. A. (Eds). *Bioinformatics Methods and Protocols*, 132. Totowa: Humana Press Inc., 115-130.
- Tamura, K. (1992). Estimation of the number of nucleotide substitutions when there are strong transition-transversion and G+C content biases. *Molecular Biology and Evolution*, 9(4), 678–687.
- Tamura, K., Nei, M. (1993). Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. *Molecular Biology and Evolution*, 10 (3), 512–526
- Tamura, K. Stecher, G., Peterson, D., Filipiński, A., Kumar, S. (2013). MEGA 6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution*, 30, 2725-2729.
- Tavaré, S. (1986). Some probabilistic and statistical problems in the analysis of DNA sequences. *Lectures on Mathematics in the Life Sciences* (American Mathematical Society), 17, 57–86.
- 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.
- 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.
- Vasconcelos, G.J., Silva, F.R., Barbosa, D.G.F., Gondin Junior, M.G.C., & Moraes, G.J. (2005). Ocorrência de Eriophyoidea, Tenuipalpidae, Tarsonemidae e Tukerellidae (Acari) em fruteiras no Estado de Pernambuco, Brasil. *Caatinga*, 18(2), 98-104.

Vergani, A. R. (1945). Transmisión y naturaleza de la “lepra explosiva” del naranjo. Buenos Aires Argentina. Ministerio de La Agricultura de la Nación, Instituto de Sanidad Vegetal. Serie A.3.

Welbourn, W.C., Ochoa, R., Kane, E.C. & Erbe, E.F. (2003) Morphological observations on *Brevipalpus phoenicis* (Acari: Tenuipalpidae) including comparisons with *B. californicus* and *B. obovatus*. *Experimental & Applied Acarology*, 30(1/3), 107–133.

Zeman, V. (1932) Lepra explosiva del naranjo. Universidad Nacional del Litoral. Facultad de Agronomía, Ganadería y Industrias afines. Corrientes Argentina.

# ANEXOS

**Anexo 1:** Sequências de DNA de ácaros *Brevipalpus* usadas na composição do conjunto de dados. O número do acesso, informações sobre a espécie de planta hospedeira e origem geográfica foram extraídas do Genbank.

Nº do acesso	Espécie	Gene	Tamanho (pb)	País e localidade	Planta hospedeira	Referência
KF955008	<i>Brevipalpus phoenicis</i>	COI	352	México, Villa Flores, CS	<i>Citrus sinensis</i>	Não publicado
KF955007	<i>Brevipalpus phoenicis</i>	COI	352	México, Villa Flores, CS	<i>Citrus sinensis</i>	Não publicado
KF955006	<i>Brevipalpus phoenicis</i>	COI	352	México, Villa Corzo, CS	<i>Citrus sinensis</i>	Não publicado
KF955005	<i>Brevipalpus phoenicis</i>	COI	352	México, Villa Corzo, CS	<i>Citrus sinensis</i>	Não publicado
KF955004	<i>Brevipalpus phoenicis</i>	COI	352	México, Villa Corzo, CS	<i>Citrus sinensis</i>	Não publicado
KF955003	<i>Brevipalpus phoenicis</i>	COI	352	México, Villa Corzo, CS	<i>Citrus sinensis</i>	Não publicado
KF955002	<i>Brevipalpus phoenicis</i>	COI	352	México, Villa Corzo, CS	<i>Citrus sinensis</i>	Não publicado
KF955001	<i>Brevipalpus phoenicis</i>	COI	352	México, Uxpanapa, VZ	<i>Citrus sinensis</i>	Não publicado
KF955000	<i>Brevipalpus phoenicis</i>	COI	352	México, Uxpanapa, VZ	<i>Citrus sinensis</i>	Não publicado
KF954999	<i>Brevipalpus phoenicis</i>	COI	352	México, Tecpatan, CS	<i>Citrus sinensis</i>	Não publicado
KF954998	<i>Brevipalpus phoenicis</i>	COI	352	México, Tecpatan, CS	<i>Citrus sinensis</i>	Não publicado
KF954997	<i>Brevipalpus phoenicis</i>	COI	352	México, Salto de Agua, CS	<i>Citrus sinensis</i>	Não publicado
KF954996	<i>Brevipalpus phoenicis</i>	COI	352	México, Salto de Agua, CS	<i>Citrus sinensis</i>	Não publicado
KF954995	<i>Brevipalpus phoenicis</i>	COI	352	México, Salto de Agua, CS	<i>Citrus sinensis</i>	Não publicado
KF954994	<i>Brevipalpus phoenicis</i>	COI	352	México, Salto de Agua, CS	<i>Citrus sinensis</i>	Não publicado
KF954993	<i>Brevipalpus phoenicis</i>	COI	352	México, Salto de Agua, CS	<i>Citrus sinensis</i>	Não publicado
KF954992	<i>Brevipalpus phoenicis</i>	COI	352	México, Ocozocoautla de Espinosa, CS	<i>Citrus sinensis</i>	Não publicado
KF954991	<i>Brevipalpus phoenicis</i>	COI	352	México, Ocozocoautla de Espinosa, CS	<i>Citrus sinensis</i>	Não publicado
KF954990	<i>Brevipalpus phoenicis</i>	COI	352	México, Ocozocoautla de Espinosa, CS	<i>Citrus sinensis</i>	Não publicado
KF954989	<i>Brevipalpus phoenicis</i>	COI	352	México, Ocozocoautla de Espinosa, CS	<i>Citrus sinensis</i>	Não publicado
KF954988	<i>Brevipalpus phoenicis</i>	COI	352	México, Ocozocoautla de Espinosa, CS	<i>Citrus sinensis</i>	Não publicado
KF954987	<i>Brevipalpus phoenicis</i>	COI	352	México, Ocozocoautla de Espinosa, CS	<i>Citrus sinensis</i>	Não publicado
KF954986	<i>Brevipalpus phoenicis</i>	COI	352	México, Las Choapas, VZ	<i>Citrus sinensis</i>	Não publicado
KF954985	<i>Brevipalpus phoenicis</i>	COI	352	México, Las Choapas, VZ	<i>Citrus sinensis</i>	Não publicado
KF954984	<i>Brevipalpus phoenicis</i>	COI	352	México, Las Choapas, VZ	<i>Citrus sinensis</i>	Não publicado
KF954983	<i>Brevipalpus phoenicis</i>	COI	352	México, La Concordia, CS	<i>Citrus sinensis</i>	Não publicado
KF954982	<i>Brevipalpus phoenicis</i>	COI	352	México, La Concordia, CS	<i>Citrus sinensis</i>	Não publicado
KF954981	<i>Brevipalpus phoenicis</i>	COI	352	México, La Concordia, CS	<i>Citrus sinensis</i>	Não publicado
KF954980	<i>Brevipalpus phoenicis</i>	COI	352	México, La Concordia, CS	<i>Citrus sinensis</i>	Não publicado
KF954979	<i>Brevipalpus phoenicis</i>	COI	352	México, La Concordia, CS	<i>Citrus sinensis</i>	Não publicado
KF954978	<i>Brevipalpus phoenicis</i>	COI	352	México, La Concordia, CS	<i>Citrus sinensis</i>	Não publicado
KF954977	<i>Brevipalpus phoenicis</i>	COI	352	México, Angel Albino Corzo, CS	<i>Citrus sinensis</i>	Não publicado
KF954976	<i>Brevipalpus phoenicis</i>	COI	352	México, Comalcalco, TC	<i>Citrus sinensis</i>	Não publicado
KF954975	<i>Brevipalpus phoenicis</i>	COI	352	México, Cardenas, TC	<i>Citrus sinensis</i>	Não publicado
KF954974	<i>Brevipalpus phoenicis</i>	COI	352	México, Cardenas, TC	<i>Citrus sinensis</i>	Não publicado
KF954973	<i>Brevipalpus phoenicis</i>	COI	352	México, Copainal, CS	<i>Citrus sinensis</i>	Não publicado
KF954972	<i>Brevipalpus phoenicis</i>	COI	352	México, Copainal, CS	<i>Citrus sinensis</i>	Não publicado
KF954971	<i>Brevipalpus phoenicis</i>	COI	352	Brasil, Capitao Poco, PA	<i>Citrus sinensis</i>	Não publicado
KF954970	<i>Brevipalpus phoenicis</i>	COI	352	Brasil, São José do Rio Preto, SP	<i>Citrus sinensis</i>	Não publicado
KF954969	<i>Brevipalpus phoenicis</i>	COI	352	Brasil, São José do Rio Preto, SP	<i>Citrus sinensis</i>	Não publicado
KF954968	<i>Brevipalpus phoenicis</i>	COI	352	Brasil, São José do Rio Preto, SP	<i>Citrus sinensis</i>	Não publicado

**Anexo 1:** Sequências de DNA de ácaros *Brevipalpus* usadas na composição do conjunto de dados. O número do acesso, informações sobre a espécie de planta hospedeira e origem geográfica foram extraídas do Genbank.

Nº do acesso	Espécie	Gene	Tamanho (pb)	País e localidade	Planta hospedeira	Referência
KF954967	<i>Brevipalpus phoenicis</i>	COI	352	Brasil, São José do Rio Preto, SP	<i>Citrus sinensis</i>	Não publicado
KF954966	<i>Brevipalpus phoenicis</i>	COI	352	Brasil, São José do Rio Preto, SP	<i>Citrus sinensis</i>	Não publicado
KF954965	<i>Brevipalpus phoenicis</i>	COI	352	Brasil, São José do Rio Preto, SP	<i>Citrus sinensis</i>	Não publicado
KF954964	<i>Brevipalpus phoenicis</i>	COI	352	Brasil, São José do Rio Preto, SP	<i>Citrus sinensis</i>	Não publicado
KF954963	<i>Brevipalpus phoenicis</i>	COI	352	Brasil	<i>Citrus sinensis</i>	Não publicado
KF954962	<i>Brevipalpus phoenicis</i>	COI	352	Brasil	<i>Citrus sinensis</i>	Não publicado
KF954961	<i>Brevipalpus phoenicis</i>	COI	352	Brasil, Palmas, TO	<i>Citrus sinensis</i>	Não publicado
KF954960	<i>Brevipalpus phoenicis</i>	COI	352	Brasil, Palmas, TO	<i>Citrus sinensis</i>	Não publicado
KF954959	<i>Brevipalpus phoenicis</i>	COI	352	Brasil, Palmas, TO	<i>Citrus sinensis</i>	Não publicado
KF954958	<i>Brevipalpus phoenicis</i>	COI	352	Brasil, Terenos, MS	<i>Citrus sinensis</i>	Não publicado
KF954957	<i>Brevipalpus phoenicis</i>	COI	352	Brasil, Lavras, MG	<i>Citrus sinensis</i>	Não publicado
KF954956	<i>Brevipalpus phoenicis</i>	COI	352	Brasil, Lavras, MG	<i>Citrus sinensis</i>	Não publicado
KF954955	<i>Brevipalpus phoenicis</i>	COI	352	Brasil, Gurupi, TO	<i>Citrus sinensis</i>	Não publicado
KF954954	<i>Brevipalpus phoenicis</i>	COI	352	Brasil, Gurupi, TO	<i>Citrus sinensis</i>	Não publicado
KF954953	<i>Brevipalpus phoenicis</i>	COI	352	Brasil, Pouso Alegre, MG	<i>Citrus sinensis</i>	Não publicado
KF954952	<i>Brevipalpus phoenicis</i>	COI	352	Brasil, Pouso Alegre, MG	<i>Citrus sinensis</i>	Não publicado
KF954951	<i>Brevipalpus phoenicis</i>	COI	352	Brasil, Pouso Alegre, MG	<i>Citrus sinensis</i>	Não publicado
KF954950	<i>Brevipalpus phoenicis</i>	COI	352	Brasil, Pouso Alegre, MG	<i>Citrus sinensis</i>	Não publicado
KC344729	<i>Brevipalpus chilensis</i>	COI	358	Chile, VI Region, Placilla	<i>Ligustrum sinensis</i>	Navia et al., 2013
KC344728	<i>Brevipalpus chilensis</i>	COI	358	Chile, La Pintana	<i>Crataegus</i> sp.	Navia et al., 2013
KC344727	<i>Brevipalpus chilensis</i>	COI	358	Chile, La Platina	<i>Juglans regia</i>	Navia et al., 2013
KC344726	<i>Brevipalpus chilensis</i>	COI	358	Chile, Santiago	<i>Ligustrum sinensis</i>	Navia et al., 2013
KC344725	<i>Brevipalpus chilensis</i>	COI	358	Chile, Curacavi	<i>Ligustrum sinensis</i>	Navia et al., 2013
KC344724	<i>Brevipalpus chilensis</i>	COI	358	Chile, VI Region, Pichilemu	<i>Ligustrum sinensis</i>	Navia et al., 2013
KC344723	<i>Brevipalpus chilensis</i>	COI	358	Chile, La Pintana	<i>Crataegus</i> sp.	Navia et al., 2013
KC344722	<i>Brevipalpus chilensis</i>	COI	358	Chile, Lampa	<i>Cestrum parqui</i>	Navia et al., 2013
KC344721	<i>Brevipalpus chilensis</i>	COI	358	Chile, La Platina	<i>Ligustrum sinensis</i>	Navia et al., 2013
KC344720	<i>Brevipalpus chilensis</i>	COI	358	Chile, La Platina	<i>Ligustrum sinensis</i>	Navia et al., 2013
KC344719	<i>Brevipalpus chilensis</i>	COI	358	Chile, La Platina	<i>Ligustrum sinensis</i>	Navia et al., 2013
KC344718	<i>Brevipalpus chilensis</i>	COI	358	Chile, La Platina	<i>Ligustrum sinensis</i>	Navia et al., 2013
KC344717	<i>Brevipalpus chilensis</i>	COI	358	Chile, La Platina	<i>Ligustrum sinensis</i>	Navia et al., 2013
KC344716	<i>Brevipalpus chilensis</i>	COI	358	Chile, La Pintana	<i>Ligustrum sinensis</i>	Navia et al., 2013
KC344715	<i>Brevipalpus chilensis</i>	COI	358	Chile, Quinta Normal	<i>Crataegus</i> sp.	Navia et al., 2013
KC344714	<i>Brevipalpus obovatus</i>	COI	358	Estados Unidos, Florida, Lake Alfred	Não informado	Navia et al., 2013
KC344713	<i>Brevipalpus phoenicis</i>	COI	358	Brasil, PR, Colombo	<i>Ligustrum japonicum</i>	Navia et al., 2013
KC344712	<i>Brevipalpus phoenicis</i>	COI	358	Estados Unidos, Florida	<i>Citrus sinensis</i>	Navia et al., 2013
KC344711	<i>Brevipalpus phoenicis</i>	COI	358	Brasil, BA, Maragogipe	<i>Citrus</i> sp.	Navia et al., 2013
KC344710	<i>Brevipalpus phoenicis</i>	COI	358	Brasil, BA, Governador Mangabeira	<i>Citrus</i> sp.	Navia et al., 2013
KC344709	<i>Brevipalpus phoenicis</i>	COI	358	Brasil, BA, Muritiba	<i>Citrus</i> sp.	Navia et al., 2013
KC344708	<i>Brevipalpus phoenicis</i>	COI	358	Brasil, BA, Cruz das Almas	<i>Citrus</i> sp.	Navia et al., 2013
KC344707	<i>Brevipalpus phoenicis</i>	COI	358	Brasil, BA, Cruz das Almas	<i>Citrus</i> sp.	Navia et al., 2013
KC344706	<i>Brevipalpus phoenicis</i>	COI	358	Brasil, RR, Bonfim	<i>Malpighia glabra</i>	Navia et al., 2013
KC344705	<i>Brevipalpus phoenicis</i>	COI	358	Brasil, SP, Piracicaba	<i>Coffea arabica</i>	Navia et al., 2013
KC344704	<i>Brevipalpus phoenicis</i>	COI	358	Brasil, MG, Janauba	<i>Vitis vinifera</i>	Navia et al., 2013

**Anexo 1:** Sequências de DNA de ácaros *Brevipalpus* usadas na composição do conjunto de dados. O número do acesso, informações sobre a espécie de planta hospedeira e origem geográfica foram extraídas do Genbank.

Nº do acesso	Espécie	Gene	Tamanho (pb)	País e localidade	Planta hospedeira	Referência
KC344703	<i>Brevipalpus phoenicis</i>	COI	358	Brasil, MG, Janauba	<i>Vitis vinifera</i>	Navia et al., 2013
KC344702	<i>Brevipalpus phoenicis</i>	COI	358	Brasil, MG, Araguari	<i>Coffea arabica</i>	Navia et al., 2013
KC291402	<i>Brevipalpus californicus</i>	COI	358	Estados Unidos, Florida	Não informado	Navia et al., 2013
KC291401	<i>Brevipalpus chilensis</i>	COI	358	Chile, La Pintana Region 13	<i>Ligustrum sinensis</i>	Navia et al., 2013
KC291400	<i>Brevipalpus chilensis</i>	COI	358	Chile, Lo Aguirre/SAG	<i>Ligustrum sinensis</i>	Navia et al., 2013
KC291399	<i>Brevipalpus chilensis</i>	COI	358	Chile, Placilla	<i>Ligustrum sinensis</i>	Navia et al., 2013
KC291398	<i>Brevipalpus chilensis</i>	COI	358	Chile, Molina Region 07	<i>Vitis vinifera</i>	Navia et al., 2013
KC291397	<i>Brevipalpus chilensis</i>	COI	358	Chile, La Obra Region 13	<i>Ligustrum sinensis</i>	Navia et al., 2013
KC291396	<i>Brevipalpus chilensis</i>	COI	358	Chile, La Pintana Region 13	<i>Crataegus</i> sp.	Navia et al., 2013
KC291395	<i>Brevipalpus chilensis</i>	COI	358	Chile, Lampa Region 14	<i>Cestrum parqui</i>	Navia et al., 2013
KC291394	<i>Brevipalpus chilensis</i>	COI	358	Chile, Lampa Region 13	<i>Citrus</i> sp.	Navia et al., 2013
KC291393	<i>Brevipalpus chilensis</i>	COI	358	Chile, La Platina	<i>Ligustrum sinensis</i>	Navia et al., 2013
KC291392	<i>Brevipalpus chilensis</i>	COI	358	Chile, La Platina	<i>Juglans regia</i>	Navia et al., 2013
KC291391	<i>Brevipalpus chilensis</i>	COI	358	Chile, Santa Rosa	<i>Ligustrum sinensis</i>	Navia et al., 2013
KC291390	<i>Brevipalpus</i> sp.	COI	358	Brasil, MG, Janauba	<i>Cocos nucifera</i>	Navia et al., 2013
KC291389	<i>Brevipalpus phoenicis</i>	COI	358	Brasil, PR, Colombo	<i>Alnus subcordata</i>	Navia et al., 2013
KC291388	<i>Brevipalpus phoenicis</i>	COI	358	Brasil, PR, Colombo	<i>Alnus subcordata</i>	Navia et al., 2013
KC291387	<i>Brevipalpus phoenicis</i>	COI	358	Brasil, DF, Brasília	<i>Ligustrum</i> sp.	Navia et al., 2013
KC291386	<i>Brevipalpus obovatus</i>	COI	358	Brasil, SP, Cordeiropolis	<i>Cestrum nocturnum</i>	Navia et al., 2013
KC291385	<i>Brevipalpus obovatus</i>	COI	358	Brasil, DF, Brasília	<i>Ocimum basilicum</i>	Navia et al., 2013
KC291384	<i>Brevipalpus obovatus</i>	COI	358	Brasil, DF, Brasília	<i>Ocimum basilicum</i>	Navia et al., 2013
KC291383	<i>Brevipalpus obovatus</i>	COI	358	Brasil, SE, Sao Cristovao	<i>Ocimum basilicum</i>	Navia et al., 2013
KC291382	<i>Brevipalpus phoenicis</i>	COI	358	Estados Unidos, Florida, Lake Alfred	<i>Citrus</i> sp.	Navia et al., 2013
KC291381	<i>Brevipalpus phoenicis</i>	COI	345	Brasil, AP, Ferreira Gomes	<i>Malvaviscus arboreus</i>	Navia et al., 2013
KC291380	<i>Brevipalpus phoenicis</i>	COI	358	Brasil, AP, Ferreira Gomes	<i>Malvaviscus arboreus</i>	Navia et al., 2013
KC291379	<i>Brevipalpus phoenicis</i>	COI	343	Brasil, AP, Porto Grande	<i>Citrus</i> sp.	Navia et al., 2013
KC291378	<i>Brevipalpus phoenicis</i>	COI	358	Brasil, AP, Ferreira Gomes	<i>Spondias purpurea</i>	Navia et al., 2013
KC291377	<i>Brevipalpus phoenicis</i>	COI	358	Brasil, MG, Janauba	<i>Hibiscus</i> sp.	Navia et al., 2013
KC291376	<i>Brevipalpus phoenicis</i>	COI	358	Brasil, MG, Janauba	<i>Citrus</i> sp.	Navia et al., 2013
KC291375	<i>Brevipalpus phoenicis</i>	COI	358	Brasil, AC, Rio Branco	<i>Hibiscus</i> sp.	Navia et al., 2013
KC291374	<i>Brevipalpus phoenicis</i>	COI	352	Brasil, BA, Governador Mangabeira	<i>Citrus</i> sp.	Navia et al., 2013
KC291373	<i>Brevipalpus phoenicis</i>	COI	358	Brasil, RR, Bonfim	<i>Malpighia glabra</i>	Navia et al., 2013
KC291372	<i>Brevipalpus phoenicis</i>	COI	358	Brasil, MG, Araguari	<i>Coffea arabica</i>	Navia et al., 2013
KC291371	<i>Brevipalpus phoenicis</i>	COI	358	Brasil, SP, Piracicaba	<i>Hibiscus</i> sp.	Navia et al., 2013
KC291370	<i>Brevipalpus phoenicis</i>	COI	358	Brasil, PE, Recife	<i>Citrus</i> sp.	Navia et al., 2013
KC291369	<i>Brevipalpus phoenicis</i>	COI	358	Brasil, PE, Recife	<i>Hibiscus</i> sp.	Navia et al., 2013
KC291368	<i>Brevipalpus phoenicis</i>	COI	358	Brasil, PE, Recife	<i>Malpighia glabra</i>	Navia et al., 2013
KC291367	<i>Brevipalpus phoenicis</i>	COI	358	Brasil, DF, Brasília	<i>Ligustrum</i> sp.	Navia et al., 2013
KC291366	<i>Brevipalpus phoenicis</i>	COI	358	Brasil, DF, Brasília	<i>Ligustrum</i> sp.	Navia et al., 2013
DQ789594	<i>Brevipalpus californicus</i>	COI	410	Holanda	<i>Thevetia peruviana</i>	Groot & Breeuwer, 2006
DQ789593	<i>Brevipalpus californicus</i>	COI	410	Holanda	<i>Euphorbia xanthii</i>	Groot & Breeuwer, 2006
DQ789592	<i>Brevipalpus californicus</i>	COI	410	Brasil	<i>Rhododendron</i> sp.	Groot & Breeuwer, 2006
DQ789591	<i>Brevipalpus californicus</i>	COI	410	Brasil	<i>Rhododendron</i> sp.	Groot & Breeuwer, 2006

**Anexo 1:** Sequências de DNA de ácaros *Brevipalpus* usadas na composição do conjunto de dados. O número do acesso, informações sobre a espécie de planta hospedeira e origem geográfica foram extraídas do Genbank.

Nº do acesso	Espécie	Gene	Tamanho (pb)	Pais e localidade	Planta hospedeira	Referência
DQ789590	<i>Brevipalpus obovatus</i>	COI	410	Brasil	<i>Hibiscus rosa-sinensis</i>	Groot & Breeuwer, 2006
DQ789589	<i>Brevipalpus obovatus</i>	COI	410	Brasil	<i>Zingiber</i> sp.	Groot & Breeuwer, 2006
DQ789588	<i>Brevipalpus obovatus</i>	COI	410	Holanda	<i>Beaumontia grandiflora</i>	Groot & Breeuwer, 2006
DQ789587	<i>Brevipalpus obovatus</i>	COI	410	Holanda	<i>Strongylodon macrobotrys</i>	Groot & Breeuwer, 2006
DQ789586	<i>Brevipalpus obovatus</i>	COI	410	Brasil	<i>Malpighia glabra</i>	Groot & Breeuwer, 2006
DQ789585	<i>Brevipalpus phoenicis</i>	COI	410	Brasil	<i>Carica papaya</i>	Groot & Breeuwer, 2006
DQ789584	<i>Brevipalpus phoenicis</i>	COI	410	Brasil	<i>Rhododendron</i> sp.	Groot & Breeuwer, 2006
DQ789583	<i>Brevipalpus phoenicis</i>	COI	410	Brasil	<i>Citrus</i> sp.	Groot & Breeuwer, 2006
DQ789582	<i>Brevipalpus phoenicis</i>	COI	410	Brasil	<i>Citrus</i> sp.	Groot & Breeuwer, 2006
DQ789581	<i>Brevipalpus phoenicis</i>	COI	410	Brasil	<i>Hibiscus rosa-sinensis</i>	Groot & Breeuwer, 2006
DQ789580	<i>Brevipalpus phoenicis</i>	COI	410	Brasil	<i>Hibiscus rosa-sinensis</i>	Groot & Breeuwer, 2006
DQ789579	<i>Brevipalpus phoenicis</i>	COI	410	Holanda	<i>Terminalia ivorensis</i>	Groot & Breeuwer, 2006
DQ789578	<i>Brevipalpus phoenicis</i>	COI	410	Holanda	<i>Monodora crispata</i>	Groot & Breeuwer, 2006
DQ789577	<i>Brevipalpus phoenicis</i>	COI	410	Brasil	<i>Citrus</i> sp.	Groot & Breeuwer, 2006
DQ789576	<i>Brevipalpus phoenicis</i>	COI	410	Brasil	<i>Citrus</i> sp.	Groot & Breeuwer, 2006
DQ450528	<i>Brevipalpus phoenicis</i>	COI	410	Não informado	Não informado	Groot & Breeuwer, 2006
DQ450527	<i>Brevipalpus phoenicis</i>	COI	410	Não informado	Não informado	Groot & Breeuwer, 2006
DQ450526	<i>Brevipalpus phoenicis</i>	COI	410	Não informado	Não informado	Groot & Breeuwer, 2006
DQ450525	<i>Brevipalpus phoenicis</i>	COI	410	Não informado	Não informado	Groot & Breeuwer, 2006
DQ450524	<i>Brevipalpus phoenicis</i>	COI	410	Não informado	Não informado	Groot & Breeuwer, 2006
DQ450523	<i>Brevipalpus phoenicis</i>	COI	410	Não informado	Não informado	Groot & Breeuwer, 2006
DQ450522	<i>Brevipalpus phoenicis</i>	COI	410	Não informado	Não informado	Groot & Breeuwer, 2006
DQ450521	<i>Brevipalpus phoenicis</i>	COI	410	Não informado	Não informado	Groot & Breeuwer, 2006
DQ450520	<i>Brevipalpus phoenicis</i>	COI	410	Não informado	Não informado	Groot & Breeuwer, 2006
DQ450519	<i>Brevipalpus phoenicis</i>	COI	410	Não informado	Não informado	Groot & Breeuwer, 2006
DQ450518	<i>Brevipalpus phoenicis</i>	COI	410	Não informado	Não informado	Groot & Breeuwer, 2006
DQ450517	<i>Brevipalpus phoenicis</i>	COI	410	Não informado	Não informado	Groot & Breeuwer, 2006
DQ450516	<i>Brevipalpus phoenicis</i>	COI	410	Não informado	Não informado	Groot & Breeuwer, 2006
DQ450515	<i>Brevipalpus phoenicis</i>	COI	410	Não informado	Não informado	Groot & Breeuwer, 2006
DQ450514	<i>Brevipalpus phoenicis</i>	COI	410	Não informado	Não informado	Groot & Breeuwer, 2006
DQ450513	<i>Brevipalpus phoenicis</i>	COI	410	Não informado	Não informado	Groot & Breeuwer, 2006
DQ450512	<i>Brevipalpus phoenicis</i>	COI	410	Não informado	Não informado	Groot & Breeuwer, 2006
DQ450511	<i>Brevipalpus phoenicis</i>	COI	410	Não informado	Não informado	Groot & Breeuwer, 2006
DQ450510	<i>Brevipalpus phoenicis</i>	COI	410	Não informado	Não informado	Groot & Breeuwer, 2006
DQ450509	<i>Brevipalpus phoenicis</i>	COI	410	Não informado	Não informado	Groot & Breeuwer, 2006
DQ450508	<i>Brevipalpus phoenicis</i>	COI	410	Não informado	Não informado	Groot & Breeuwer, 2006
DQ450507	<i>Brevipalpus phoenicis</i>	COI	410	Não informado	Não informado	Groot & Breeuwer, 2006
DQ450506	<i>Brevipalpus phoenicis</i>	COI	410	Não informado	Não informado	Groot & Breeuwer, 2006
DQ450505	<i>Brevipalpus phoenicis</i>	COI	410	Não informado	Não informado	Groot & Breeuwer, 2006
DQ450504	<i>Brevipalpus phoenicis</i>	COI	410	Não informado	Não informado	Groot & Breeuwer, 2006
DQ450503	<i>Brevipalpus phoenicis</i>	COI	410	Não informado	Não informado	Groot & Breeuwer, 2006
DQ450502	<i>Brevipalpus phoenicis</i>	COI	410	Não informado	Não informado	Groot & Breeuwer, 2006
DQ450501	<i>Brevipalpus</i> sp.	COI	410	Não informado	Não informado	Groot & Breeuwer, 2006
DQ450500	<i>Brevipalpus californicus</i>	COI	410	Não informado	Não informado	Groot & Breeuwer, 2006

**Anexo 1:** Sequências de DNA de ácaros *Brevipalpus* usadas na composição do conjunto de dados. O número do acesso, informações sobre a espécie de planta hospedeira e origem geográfica foram extraídas do Genbank.

Nº do acesso	Espécie	Gene	Tamanho (pb)	País e localidade	Planta hospedeira	Referência
DQ450499	<i>Brevipalpus californicus</i>	COI	410	Não informado	Não informado	Groot & Breeuwer, 2006
DQ450498	<i>Brevipalpus obovatus</i>	COI	410	Não informado	Não informado	Groot & Breeuwer, 2006
DQ450497	<i>Brevipalpus obovatus</i>	COI	410	Não informado	Não informado	Groot & Breeuwer, 2006
DQ450496	<i>Brevipalpus obovatus</i>	COI	410	Não informado	Não informado	Groot & Breeuwer, 2006
DQ450495	<i>Brevipalpus obovatus</i>	COI	410	Não informado	Não informado	Groot & Breeuwer, 2006
DQ450494	<i>Brevipalpus obovatus</i>	COI	410	Não informado	Não informado	Groot & Breeuwer, 2006
DQ450493	<i>Brevipalpus obovatus</i>	COI	410	Não informado	Não informado	Groot & Breeuwer, 2006
DQ450492	<i>Brevipalpus obovatus</i>	COI	410	Não informado	Não informado	Groot & Breeuwer, 2006
DQ450491	<i>Brevipalpus obovatus</i>	COI	410	Não informado	Não informado	Groot & Breeuwer, 2006
DQ450490	<i>Brevipalpus obovatus</i>	COI	410	Não informado	Não informado	Groot & Breeuwer, 2006
DQ450489	<i>Brevipalpus obovatus</i>	COI	410	Não informado	Não informado	Groot & Breeuwer, 2006
DQ450488	<i>Brevipalpus obovatus</i>	COI	410	Não informado	Não informado	Groot & Breeuwer, 2006
DQ450487	<i>Brevipalpus obovatus</i>	COI	410	Não informado	Não informado	Groot & Breeuwer, 2006
DQ450486	<i>Brevipalpus obovatus</i>	COI	410	Não informado	Não informado	Groot & Breeuwer, 2006
DQ450485	<i>Brevipalpus obovatus</i>	COI	410	Não informado	Não informado	Groot & Breeuwer, 2006
DQ450484	<i>Brevipalpus obovatus</i>	COI	410	Não informado	Não informado	Groot & Breeuwer, 2006
DQ450483	<i>Brevipalpus obovatus</i>	COI	410	Não informado	Não informado	Groot & Breeuwer, 2006
DQ450482	<i>Brevipalpus obovatus</i>	COI	410	Não informado	Não informado	Groot & Breeuwer, 2006
DQ450481	<i>Brevipalpus</i> sp.	COI	410	Não informado	Não informado	Groot & Breeuwer, 2006
DQ450480	<i>Brevipalpus</i> sp.	COI	410	Não informado	Não informado	Groot & Breeuwer, 2006
AY320028	<i>Brevipalpus obovatus</i>	COI	374	Estados Unidos	<i>Camellia sinensis</i>	Rodrigues <i>et al.</i> , 2004
AY320027	<i>Brevipalpus phoenicis</i>	COI	374	Brasil	<i>Citrus reshni</i>	Rodrigues <i>et al.</i> , 2004
AY320026	<i>Brevipalpus phoenicis</i>	COI	374	Estados Unidos	<i>Citrus paradisi</i>	Rodrigues <i>et al.</i> , 2004
AY320025	<i>Brevipalpus phoenicis</i>	COI	374	Estados Unidos	<i>Citrus maxima</i>	Rodrigues <i>et al.</i> , 2004
AY320024	<i>Brevipalpus phoenicis</i>	COI	374	Brasil	<i>Coffea</i> sp.	Rodrigues <i>et al.</i> , 2004
AY320023	<i>Brevipalpus phoenicis</i>	COI	374	Brasil	<i>Citrus sinensis</i>	Rodrigues <i>et al.</i> , 2004
AY320022	<i>Brevipalpus phoenicis</i>	COI	374	Brasil	<i>Citrus sinensis</i>	Rodrigues <i>et al.</i> , 2004
AY320021	<i>Brevipalpus phoenicis</i>	COI	374	Brasil	<i>Citrus sinensis</i>	Rodrigues <i>et al.</i> , 2004
AY320020	<i>Brevipalpus phoenicis</i>	COI	374	Brasil	<i>Citrus sinensis</i>	Rodrigues <i>et al.</i> , 2004
AY320019	<i>Brevipalpus phoenicis</i>	COI	374	Brasil	<i>Citrus sinensis</i>	Rodrigues <i>et al.</i> , 2004
AY320018	<i>Brevipalpus phoenicis</i>	COI	374	Estados Unidos	<i>Ligustrum japonicum</i>	Rodrigues <i>et al.</i> , 2004
AY320017	<i>Brevipalpus phoenicis</i>	COI	374	Estados Unidos	<i>Citrus sinensis</i>	Rodrigues <i>et al.</i> , 2004
AY320016	<i>Brevipalpus phoenicis</i>	COI	374	Estados Unidos	<i>Citrus sinensis</i>	Rodrigues <i>et al.</i> , 2004
AY320015	<i>Brevipalpus phoenicis</i>	COI	374	Estados Unidos	<i>Azalea</i> sp.	Rodrigues <i>et al.</i> , 2004
AY320014	<i>Brevipalpus phoenicis</i>	COI	374	Estados Unidos	<i>Hibiscus</i> sp.	Rodrigues <i>et al.</i> , 2004
AY320013	<i>Brevipalpus phoenicis</i>	COI	374	Estados Unidos	<i>Citrus sinensis</i>	Rodrigues <i>et al.</i> , 2004
AY320012	<i>Brevipalpus phoenicis</i>	COI	374	Estados Unidos	<i>Citrus sinensis</i>	Rodrigues <i>et al.</i> , 2004
AY320011	<i>Brevipalpus phoenicis</i>	COI	374	Estados Unidos	<i>Citrus sinensis</i>	Rodrigues <i>et al.</i> , 2004
AY320010	<i>Brevipalpus phoenicis</i>	COI	374	Estados Unidos	<i>Citrus sinensis</i>	Rodrigues <i>et al.</i> , 2004
AY320009	<i>Brevipalpus phoenicis</i>	COI	374	Estados Unidos	<i>Citrus sinensis</i>	Rodrigues <i>et al.</i> , 2004
AY320008	<i>Brevipalpus phoenicis</i>	COI	374	Estados Unidos	<i>Citrus sinensis</i>	Rodrigues <i>et al.</i> , 2004
AY320007	<i>Brevipalpus phoenicis</i>	COI	374	Estados Unidos	<i>Citrus sinensis</i>	Rodrigues <i>et al.</i> , 2004

**Anexo 1:** Sequências de DNA de ácaros *Brevipalpus* usadas na composição do conjunto de dados. O número do acesso, informações sobre a espécie de planta hospedeira e origem geográfica foram extraídas do Genbank.

Nº do acesso	Espécie	Gene	Tamanho (pb)	País e localidade	Planta hospedeira	Referência
EU345430	<i>Tetranychus urticae</i>	<i>COI</i> <i>completo</i>	1530	Não informado	Não informado	Van Leeuwen <i>et al.</i> , 2008
AY320029	<i>Cenopalpus pulcher</i>	<i>COI</i>	374	Estados Unidos	<i>Malus pumila</i>	Rodrigues <i>et al.</i> , 2004
EU682445	<i>Raoiella indica</i>	<i>COI</i>	636	Estados Unidos	Não informado	Não publicado
EU682444	<i>Raoiella indica</i>	<i>COI</i>	657	Venezuela	Não informado	Não publicado
X99881	<i>Tetranychus urticae</i>	ITS	613	Não informado	Não informado	Navajas <i>et al.</i> , 1998
HE984346	<i>Brevipalpus phoenicis</i>	ITS	767	Não informado	Não informado	Não publicado
AB369894	<i>Tetranychus urticae</i>	28S	933	Não informado	Não informado	Sakagami <i>et al.</i> , 2009
JF928438	<i>Raoiella indica</i>	28S	930	Não informado	Não informado	Não publicado
JF928437	<i>Raoiella indica</i>	28S	923	Não informado	Não informado	Não publicado