



Caracterização molecular da resistência de *Phytoseiulus macropilis* (Banks) (Acari: Phytoseiidae) a piretroides, liberação em campo e monitoramento dos predadores com marcadores moleculares

Maria Cristina Vitelli Queiroz

Tese apresentada ao Instituto Biológico, da Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios, para obtenção do título de Doutor em Sanidade, Segurança Alimentar e Ambiental no Agronegócio.

Área de Concentração: Segurança Alimentar e Sanidade no Agroecossistema

Orientador: Prof. Dr. Mário Eidi Sato

Coorientadora: Dra. Maria Augusta Crivelente Horta

São Paulo

2020

**Secretaria de Agricultura e Abastecimento do Estado de São Paulo
Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios
Instituto Biológico
Programa de Pós-Graduação em Sanidade, Segurança Alimentar e Ambiental no
Agronegócio**

Maria Cristina Vitelli Queiroz

Caracterização molecular da resistência de *Phytoseiulus macropilis* (Banks) (Acari: Phytoseiidae) a piretroides, liberação em campo e monitoramento dos predadores com marcadores moleculares

Tese apresentada ao Instituto Biológico, da Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios, para obtenção do título de Doutor em Sanidade, Segurança Alimentar e Ambiental no Agronegócio.

Área de Concentração: Segurança Alimentar e Sanidade no Agroecossistema

Orientador: Prof. Dr. Mário Eidi Sato

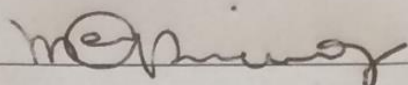
Coorientadora: Dra. Maria Augusta Crivelente Horta

São Paulo

2020

Eu **Maria Cristina Vitelli Queiroz**, autorizo o Instituto Biológico (IB-APTA), da Secretaria de Agricultura e Abastecimento do Estado de São Paulo, a disponibilizar gratuitamente e sem ressarcimento dos direitos autorais, o presente trabalho acadêmico de minha autoria, no portal, biblioteca digital, catálogo eletrônico ou qualquer outra plataforma eletrônica do IB para fins de leitura, estudo, pesquisa e/ou impressão pela Internet desde que citada a fonte.

Assinatura: _____



Data 31/03/20

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Secretaria de Agricultura e Abastecimento do Estado de São Paulo
Núcleo de Informação e Documentação – IB

Queiroz, Maria Cristina Vitelli.

Caracterização molecular da resistência de *Phytoseiulus macropilis* (Banks) (Acari: Phytoseiidae) a piretroides, liberação em campo e monitoramento dos predadores com marcadores moleculares. / Maria Cristina Vitelli Queiroz.

- São Paulo, 2020.

133 p.

doi: 10.31368/PGSSAAA.2020T.MQ011

Tese (Doutorado). Instituto Biológico (São Paulo). Programa de Pós-Graduação.

Área de concentração: Segurança Alimentar e Sanidade no Agroecossistema.

Linha de pesquisa: Manejo integrado de pragas e doenças em ambientes rurais e urbanos.

Orientador: Mario Eid Sato.

Versão do título para o inglês: Biochemical and molecular characterization of resistance of *Phytoseiulus macropilis* (Banks) (Acari: Phytoseiidae) to pyrethroids, release in the field and monitoring of predators with molecular markers

1. Controle biológico 2. Resistência a inseticida 3. Ácaro predador
4. Transcriptoma I. Queiroz, Maria Cristina Vitelli II. Sato, Mario Eid III. Horta, Maria Augusta Crivelente IV. Instituto Biológico (São Paulo) V. Título.

IB/Bibl./2020/011

FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome: Maria Cristina Vitelli Queiroz

Título: Caracterização molecular da resistência de *Phytoseiulus macropilis* (Banks) (Acari: Phytoseiidae) a piretroides, liberação em campo e monitoramento dos predadores com marcadores moleculares.

Tese apresentado ao Programa de Pós-graduação em Sanidade, Segurança Alimentar e Ambiental no Agronegócio do Instituto Biológico, Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios, da Secretaria de Agricultura e Abastecimento do Estado de São Paulo para a obtenção do título de Doutor em Sanidade, Segurança Alimentar e Ambiental no Agronegócio.

Aprovado em: 31 / 03 / 2020

Banca Examinadora

Prof. Dr. Mário Eidi Sato

Instituição: Instituto Biológico

Julgamento: 

Assinatura: Aprovado

Prof. Dr. Celso Omoto

Instituição: ESALQ / USP

Julgamento: Aprovado

Assinatura: 

Dra. Prianda Rios Laborda

Instituição: Unicamp

Julgamento: APROVADO

Assinatura: 

Prof. Dr. Luiz Carlos Dias da Rocha

Instituição: IFSULDEMINAS

Julgamento: APROVADA

Assinatura: 

Prof. Dr. Alberto Soares Corrêa

Instituição: ESALQ / USP

Julgamento: Aprovado

Assinatura: 

*caracol,
docemente, docemente,
escala o Fuji!*

Issa Kobayashi

(tradução de Olga Savary)

Deparo-me concordando com Freud, quando um dia escreveu: "A voz do intelecto é suave, mas não descansa até ser ouvida. Em última instância, depois de reiteradas recusas, que parecem infundáveis, ela é bem-sucedida." Esse é um dos poucos pontos em que podemos ser otimistas sobre o futuro da humanidade.

(Mentes que Lideram, Howard E. Gardner)

Dedico aos meus pais,

Vicente Queiroz e Maria Luzia Vitelli,

in memoriam

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, todos os dias, por Ele mostrar o caminho que devo seguir.

Aos meus filhos Giovanna e Gabriel, compreensivos, amorosos e sobreviventes.

Ao meu filho Gabriel, especialmente, pela ajuda na finalização do trabalho.

À minha irmã Maria Raquel Vitelli Queiroz-Wachholz pelo infinito suporte.

Ao Prof. Dr. Mário Eidi Sato, uma mente brilhante, especialmente agradeço. Pela orientação, pela dedicação incansável, pelo exemplo, pela oportunidade, pela confiança em mim depositada, obrigada.

À Profa. Anete Pereira de Souza, pela acolhida e por tornar possível a execução dos trabalhos no Centro de Biologia Molecular e Engenharia Genética (CBMEG).

À Profa Marie-Stefane Tixier, pelos ensinamentos e supervisão do estágio de pesquisa no “Centre de Biologie pour la Gestion des Populations” (CBGP).

Às Dras Maria Augusta Crivelente Horta e Fernanda Ancelmo de Oliveira, pelos ensinamentos e orientação.

Às colegas do Laboratório de Acarologia Sirlei, Jéssica, Rafaelly, Aline e Angelita pela grande ajuda nas coletas de ácaros e manutenção das criações, sem o que esse trabalho não teria sido possível.

Aos professores do curso de Pós-Graduação do Instituto Biológico pela atenção, apoio e ensinamentos transmitidos.

À pesquisadora Dalva Gabriel, pelo exemplo de uma vida dedicada à Agricultura.

Aos amigos Fernando Baldo e Julie Chacon Orosco, do Laboratório de Controle Biológico, pelo carinho e apoio, sempre.

Ao Instituto Biológico de São Paulo - SP e ao Centro Experimental do Instituto Biológico em Campinas - SP pela infra-estrutura e por tudo o que foi necessário para a realização do meu projeto.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelas bolsas concedidas, de doutorado (Processo 2015/26288-6) e estágio de pesquisa no exterior (Processo 2019/04387-3).

Esse estudo foi financiado em parte pela CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil) – Código Financeiro 001.

RESUMO

QUEIROZ, Maria Cristina Vitelli. **Caracterização molecular da resistência de *Phytoseiulus macropilis* (Banks) (Acari: Phytoseiidae) a piretroides, liberação em campo e monitoramento dos predadores com marcadores moleculares.** 2020. 138f. Tese (Doutorado em Sanidade, Segurança Alimentar e Ambiental no Agronegócio) – Instituto Biológico, Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios, Secretaria de Agricultura e Abastecimento do Estado de São Paulo, São Paulo, 2020.

O ácaro-rajado, *Tetranychus urticae* Koch (Acari: Tetranychidae), considerado um dos ácaros-praga de maior importância econômica em todo o mundo, causa sérios prejuízos em diversas culturas. O emprego de ácaros predadores para o controle do ácaro-rajado representa uma das estratégias mais promissoras para o controle da praga, em sistemas de produção comercial de frutas, hortaliças e ornamentais. A utilização de linhagens de ácaros predadores resistentes a compostos de largo espectro de ação (como piretroides) pode viabilizar o uso desses inimigos naturais para o controle biológico do ácaro-rajado, em cultivos onde o agricultor realiza aplicações eventuais de agroquímicos contra outros artrópodes-praga (ex.: lagartas, tripses, cochonilhas, moscas-brancas). Técnicas moleculares empregadas para identificar e monitorar o estabelecimento e dispersão de inimigos naturais têm um papel significativo no desenvolvimento de bioprodutos. Os objetivos desta pesquisa foram ampliar o conhecimento sobre estrutura genética de populações de *Phytoseiulus macropilis* (Banks) (Acari: Phytoseiidae) e caracterizar os mecanismos moleculares associados à resistência a piretroides neste predador, visando o desenvolvimento de ferramentas a serem empregadas na identificação, bem como no monitoramento do estabelecimento e dispersão de inimigos naturais. Experimentos envolvendo liberação e recaptura de ácaros predadores (*P. macropilis*) resistentes a piretroides foram realizados em três áreas de cultivo de morango no estado de São Paulo (Monte Alegre do Sul, Socoro, Pinhalzinho). Observou-se rápida dispersão dos ácaros predadores nos canteiros, registrando-se reduções de até 99,8% nas densidades populacionais de *T. urticae* nos canteiros com liberação do ácaro predador. O DNA genômico dos ácaros *P. macropilis* foi extraído e usado para construir a biblioteca genômica enriquecida com microssatélites. De um total de 26 pares de iniciadores sintetizados, 24 mostraram padrões de amplificação compatíveis com os tamanhos esperados dos fragmentos. O polimorfismo dos 24 novos locos microssatélites foi testado em diferentes populações de *P. macropilis* e sete amplificações foram obtidas com sucesso. Amplificações cruzadas foram obtidas em três espécies diferentes de fitoseídeos: *Phytoseiulus persimilis* Athias-Henriot, *Amblyseius swirskii* Athias-Henriot e *Proprioseiopsis* sp. Um estudo para avaliar as variações

intraespecíficas (usando o marcador CytB mtDNA), em populações de *P. macropilis* coletadas de diferentes regiões, mostrou separação das populações de acordo com fatores geográficos e fenótipos de resistência a pesticidas. Foi realizada uma análise de transcriptoma, para busca dos genes relacionados com os mecanismos de resistência e determinação da expressão diferencial dos genes relacionados à resistência a piretroides, em linhagens R e S de *P. macropilis*. A partir de 48.736 transcritos obtidos, apenas 14.605 (29,97%) puderam ser anotados, 220 dos quais possivelmente relacionados com resistência. A designação funcional pela análise da ontologia gênica (GO) dos 14.605 transcritos anotados mostrou 1.389 transcritos identificados na categoria “funções moleculares”, 5.192 na categoria “componentes celulares” e 5.195 na categoria “processos biológicos”. Foram identificados 97 transcritos possivelmente relacionados com resistência. Os resultados aqui obtidos são um ponto de partida para o uso de ferramentas moleculares como incremento para o desenvolvimento de programas de Manejo Integrado de Pragas.

Palavras-chave: Controle Biológico, resistência a inseticida, ácaro predador, transcriptoma

ABSTRACT

QUEIROZ, Maria Cristina Vitelli. **Biochemical and molecular characterization of resistance of *Phytoseiulus macropilis* (Banks) (Acari: Phytoseiidae) to pyrethroids, release in the field and monitoring of predators with molecular markers.** 2020. 138f. Thesis (Doctorate of Animal, Plant Health and Food Safety in Agribusiness) – Biological Institute, APTA, SAA, São Paulo, 2020.

The two-spotted spider mite, *Tetranychus urticae* Koch (Acari: Tetranychidae), considered one of the mite pests of greatest economic importance worldwide, causes serious damage in several crops. The use of predatory mites to control the spider mite is one of the most promising strategies for the pest control in commercial production systems for fruits, vegetables and ornamentals. The use of predatory mite strains resistant to compounds of broad spectrum of action (e.g. pyrethroids) can enable the use of these natural enemies for the biological control of the spider mite, in crops where the farmer makes any application of pesticides against other arthropod pests (e.g. caterpillars, thrips, mealybugs, whiteflies). Molecular techniques used to identify and monitor the establishment and dispersion of natural enemies have a significant role in the development of bioproducts. The objectives of this research were to expand knowledge about the genetic structure of populations of *Phytoseiulus macropilis* (Banks) (Acari: Phytoseiidae) and to characterize the molecular mechanisms associated with resistance to pyrethroids in this predator, aiming at the development of tools to be used in the identification, as well as monitoring the establishment and dispersal of natural enemies. Experiments involving release and recapture of the predatory mites (*P. macropilis*) resistant to pyrethroids were carried out in three strawberry cultivation areas in the state of São Paulo (Monte Alegre do Sul, Socorro, Pinhalzinho). Rapid dispersion of predatory mites was observed in strawberry beds, with reductions of up to 99.8% in the population densities of *T. urticae* in beds with the release of predatory mites. The genomic DNA of *P. macropilis* mites was extracted and used to build the genomic library enriched with microsatellites. Of a total of 26 pairs of synthesized primers, 24 showed amplification patterns compatible with the expected sizes of the fragments. The polymorphism of the 24 new microsatellite loci was tested in different populations of *P. macropilis* and seven amplifications were successfully obtained. Cross amplifications were obtained in three different phytoseiid species: *Phytoseiulus persimilis* Athias-Henriot, *Amblyseius swirskii* Athias-Henriot and *Proprioseiopsis* sp. A study investigating the intraspecific variations (using CytB mtDNA marker), in *P. macropilis* populations collected from different regions, showed separation of populations according to geographic factors and pesticide resistance phenotypes. Transcriptome analysis was performed to search for genes related to resistance mechanisms and determination of the differential expression of genes associated with resistance to pyrethroids, in S and R strains of *P. macropilis*. From 48,736 transcripts obtained, only 14,605 (29.97%) could be annotated, 220 of which possibly related to resistance. The functional designation by the Genetic Ontology (GO) analysis of the 14,605 annotated transcripts showed 1,389 transcripts identified in the category “molecular functions”, 5,192 in the category “cellular components” and 5,195 in the category “biological processes”. We identified 97 transcripts possibly related to resistance. In addition, a study of monitoring of resistant *P. macropilis* mites released in

three crops was carried out to observe the establishment and dispersion of the mites in the field through the use of molecular markers. The results obtained here are a starting point for the use of molecular tools to increase the development of Integrated Pest Management programs.

Key words: Biological control, insecticide resistance, predatory mite, transcriptome

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Populações utilizadas no desenvolvimento e avaliação de marcadores microssatélites para <i>Phytoseiulus macropilis</i> e transferabilidade em <i>Phytoseiulus persimilis</i> , <i>Amblyseius swirskii</i> e <i>Proprioseiopsis</i> sp.....	64
Tabela 2. Características de 24 locos microssatélites para <i>Phytoseiulus macropilis</i>	67
Tabela 3. Caracterização genética de 7 microssatélites em três populações de <i>Phytoseiulus macropilis</i>	68
Tabela 4. Transferabilidade de oito microssatélites em três espécies de ácaros Phytoseiidae.....	69
Tabela 5. Características das localidades de coleta das diferentes populações, espécies de suporte de plantas consideradas e números de acesso no banco de dados Genbank.....	75
Tabela 6. Distâncias genéticas médias de K2P (valores mínimo e máximo), entre e dentro das populações de <i>Phytoseiulus persimilis</i> e <i>Phytoseiulus macropilis</i> , bem como entre as populações de <i>Phytoseiulus macropilis</i> incluídas nos dois clados (mostradas na árvore - Neighbour Joining tree) para o marcador molecular CytB mtDNA.....	79
Tabela 7. Índices $\Delta\Delta G$ (energia livre de Gibbs) calculados de acordo com diferentes métodos utilizados.....	86
Tabela 8. Relatório do Lactad mostrando quantidade de leituras com “score” de qualidade maior ou igual a Q30.....	101

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Formas morfológicas do ácaro-rajado <i>Tetranychus urticae</i> em folha de feijão-de-porco (<i>Canavalia ensiformis</i>) (Foto: M.C.V.Queiroz).....	5
Figura 2. Criação de ácaro-rajado <i>Tetranychus urticae</i> em folha de feijão-de-porco (<i>Canavalia ensiformis</i>) (Fotos: M.C.V.Queiroz).....	5
Figura 3. Injúria causada pelo ácaro-rajado (<i>Tetranychus urticae</i>) em roseira (Foto: M.C.V.Queiroz).....	7
Figura 4. Plantas de feijão-de-porco (<i>Canavalia ensiformis</i>) cultivadas em vasos (Foto: M.C.V.Queiroz).....	9
Figura 5. <i>Phytoseiulus macropilis</i> predando <i>Tetranychus urticae</i> (Foto: M.C.V.Queiroz).....	10
Figura 6. <i>Phytoseiulus macropilis</i> em folha de feijão-de-porco (<i>Canavalia ensiformis</i>) com alta infestação de ácaro-rajado (<i>Tetranychus urticae</i>) (Foto: M.C.V.Queiroz).....	10
Figura 7. Cultivo orgânico de morango em Socorro, SP (Área 1).....	43
Figura 8. Croqui da área experimental piloto em cultivo de morango. A liberação dos predadores foi feita no ponto 0.0 (círculo vermelho).....	44
Figura 9. Local da liberação dos ácaros predadores no experimento no cultivo de morango da Área 1.....	45
Figura 10. Cultivo de morango em estufa com controle químico em Monte Alegre do Sul, SP (Área 2).....	46
Figura 11. Cultivo de morango em estufa sem controle químico em Pinhalzinho, SP (Área 3).....	47
Figura 12. Densidades populacionais do ácaro-rajado (<i>Tetranychus urticae</i>) e do ácaro predador <i>Phytoseiulus macropilis</i> em cultivo orgânico de morango. Monte Alegre do Sul, SP, outubro a novembro de 2017.....	49
Figura 13. Densidades populacionais de formas ativas (FA) e ovos (Ov) do ácaro-rajado (<i>Tetranychus urticae</i>) e do ácaro predador <i>Phytoseiulus macropilis</i> em cultivo de morango, em estufa com uso de controle químico. Distâncias do ponto de liberação de <i>Phytoseiulus macropilis</i> : 0 a 5 m (Faixas 2 e 3); 5 a 10 m (Faixas 1 e 4). Monte Alegre do Sul, SP, outubro e novembro de 2018.....	51
Figura 14. Densidades populacionais de formas ativas (FA) e ovos (Ov) do ácaro-rajado (<i>Tetranychus urticae</i>) e do ácaro predador <i>Phytoseiulus macropilis</i> em cultivo de morango, em estufa sem uso de controle químico. Distâncias do ponto de liberação de <i>Phytoseiulus</i>	

<i>macropilis</i> : 0 a 5 m (Faixa 3) (parte central dos canteiros); 5 a 10 m (Faixas 2 e 4); 10 a 15 m (Faixas 1 e 5). Pinhalzinho, SP, outubro a dezembro de 2018.....	53
Figura 15. Mapa mostrando os locais de coleta das populações de <i>Phytoseius macropilis</i> no Brasil e na Argentina.....	76
Figura 16. “Neighbour joining trees” baseadas nas distâncias genéticas K2P entre espécimens de <i>Phytoseiulus persimilis</i> e <i>P. macropilis</i> com o Cytb mtDNA. Os números correspondem aos valores de “bootstraps”.....	78
Figura 17. Representação visual da energia de entropia vibracional devido às mutações N180Y, Y204S, N216Y, V224M na proteína CytB de <i>Phytoseiulus macropilis</i> . Os aminoácidos são coloridos de acordo com a alteração da entropia vibracional após a mutação, o azul representa uma rigidificação da estrutura e o vermelho um ganho de flexibilidade.....	84
Figura 18. Previsão de interações interômicas devido às mutações N180Y, Y204S, N216Y, V224M na proteína CytB de <i>Phytoseiulus macropilis</i> entre populações coletadas no Sul (Argentina, Brasil: Rio Grande do Sul) e no estado de São Paulo. Os resíduos do Sul e São Paulo são coloridos em verde-claro e também são representados no esquema, juntamente com os resíduos ao redor, envolvidos em qualquer tipo de interação.....	85
Figura 19. Armadilhas para a coleta de amostras de ácaros predadores sem indução, feitas com garrafas PET de 350 mL e tubos tipo Falcon de 15 mL.....	95
Figura 20. Armadilha para a coleta das amostras de ácaros com indução, feitas com garrafas PET de 2 L e tubos tipo Falcon de 15 mL.....	96
Figura 21. Teste para definição da concentração não letal máxima em linhagem S de <i>Phytoseiulus macropilis</i>	97
Figura 22. Distribuição de transcritos expressos nas linhagens resistente e suscetível de <i>Phytoseiulus macropilis</i> , com e sem indução.....	102
Figura 23: Kal’s <i>t</i> -test: A) RC x SC [R controle (RC); S controle (SC)]; B) RI x SI [R induzido (RI); S induzido (SI)]; C) SC x SI [S controle (SC); S induzido (SI)]; D) RI x RC [R induzido (RI); R controle (RC)].....	103
Figura 24. Distribuição de transcritos diferencialmente expressos nos pares RC x SC, RI x SC, SC x SI, RI x SI.....	104

SUMÁRIO

RESUMO	i
ABSTRACT	ii
LISTA DE TABELAS	iii
LISTA DE FIGURAS	iv
CAPÍTULO 1	1
1.1 INTRODUÇÃO	1
1.2 OBJETIVOS	3
1.2.1 Geral	3
1.2.2 Específicos	3
1.3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	4
1.3.1 Ácaro-rajado <i>Tetranychus urticae</i>	4
1.3.2 Ácaro predador <i>Phytoseiulus macropilis</i>	7
1.3.3 Controle químico e resistência de artrópodes a pesticidas	12
1.3.4 Mecanismos de resistência a pesticidas	13
1.3.5 Resistência de ácaro-rajado a acaricidas	16
1.3.6 Resistência de ácaros predadores a pesticidas	19
1.3.7 Marcadores moleculares para monitoramento de ácaros predadores	21
1.4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	24
CAPÍTULO 2 – ESTUDOS DE ESTABELECIMENTO E DISPERSÃO DE UMA LINHAGEM DE <i>Phytoseiulus macropilis</i> RESISTENTE AO PIRETROIDE FENPROPATHRIN	40
RESUMO	40
2.1 INTRODUÇÃO	40
2.2 MATERIAL E MÉTODOS.....	42
2.2.1 Criação de manutenção da linhagem resistente de <i>P. macropilis</i>	42
2.2.2 Liberação e recuperação dos predadores	43
2.2.2.1 Cultivo orgânico de morango em Monte Alegre do Sul, SP (Área 1)	43
2.2.2.2 Cultivo de morango em estufa com controle químico em Socorro, SP (Área 2)	45
2.2.2.3 Cultivo de morango em estufa sem controle químico em Pinhalzinho, SP (Área3)	47
2.3 RESULTADOS	48
2.3.1 Cultivo orgânico de morango em Monte Alegre do Sul, SP (Área 1)	48
2.3.2 Cultivo de morango em estufa com controle químico (Socorro, SP)	49
2.3.3 Cultivo de morango em estufa sem controle químico (Pinhalzinho, SP)	52
2.4 DISCUSSÃO	53
2.5 CONCLUSÕES	55

2.6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	55
CAPÍTULO 3 – DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE MARCADORES MOLECULARES MICROSSATÉLITES PARA O ÁCARO PREDADOR <i>Phytoseiulus macropilis</i> E TRANSFERABILIDADE	61
RESUMO	61
3.1 INTRODUÇÃO	62
3.2 MATERIAL E MÉTODOS	63
3.2.1 Ácaros e extração de DNA	63
3.2.2 Construção da biblioteca enriquecida com SSRs e desenho de primers	65
3.2.3 Validação da biblioteca e avaliação dos marcadores	66
3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	66
3.4 CONCLUSÕES	69
3.5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	70
CAPÍTULO 4 – VARIAÇÕES MOLECULARES DAS SEQUÊNCIAS DE DNA E PROTEÍNA DO CITOCROMO B EM <i>Phytoseiulus macropilis</i> BANKS E <i>P. Phytoseiulus persimilis</i> (ATHIAS-HENRIOT) (ACARI: PHYTOSEIIDAE) E ESTRUTURA GENÉTICA DE POPULAÇÕES	72
RESUMO	72
4.1 INTRODUÇÃO	73
4.2 MATERIAL E MÉTODOS	74
4.2.1 Espécies e populações estudadas	74
4.2.2 Experimentos moleculares	76
4.2.2.1 Extração de DNA	76
4.2.2.2 Amplificação do DNA e sequenciamento	76
4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	79
4.3.1 Identidade dos espécimes de <i>Phytoseiulus macropilis</i> do Brasil	79
4.3.2 Variação genética entre as populações de <i>Phytoseiulus persimilis</i> e <i>Phytoseiulus macropilis</i>	80
4.4 CONCLUSÕES	87
4.5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	88
CAPÍTULO 5 – ANÁLISE DE TRANSCRIPTOMA DE LINHAGENS DE <i>Phytoseiulus macropilis</i> (ACARI: PHYTOSEIIDAE) RESISTENTE E SUSCETÍVEL A PIRETROIDES	92
RESUMO	92
5.1 INTRODUÇÃO	93
5.2 MATERIAL E MÉTODOS	94
5.2.1 Criação de manutenção das populações de ácaros	94
5.2.2 Coleta das amostras	94

5.2.2.1 Coleta das amostras controle SC e RC (sem exposição a fenpropathrin)	95
5.2.2.2 Coleta das amostras com exposição à fenpropathrin	95
a) Indução e coleta de amostras na linhagem S (SI)	96
b) Indução e coleta de amostras na linhagem R (RI)	97
5.2.3 Análise do transcriptoma	98
5.2.3.1 Extração de RNA	98
5.2.3.2 Sequenciamento	98
5.2.3.3 Transcriptoma	99
5.2.3.4 Anotação funcional e ontologia gênica (GO)	99
5.2.3.5 Análise de expressão gênica	99
5.3 RESULTADOS	100
5.3.1 Análise do transcriptoma de <i>Phytoseiulus macropilis</i> (ATPm)	100
5.3.1.1 Sequenciamento	100
5.3.1.2 Anotação funcional e ontologia gênica	101
5.3.1.3 Níveis de expressão (RPKM)	101
5.3.1.4 Expressão diferencial	102
5.4 DISCUSSÃO	104
5.5 CONCLUSÕES	106
5.6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	107
6. CAPÍTULO FINAL	111
6.1. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	114
7. ANEXOS (Análise de Transcriptoma – <i>Phytoseiulus macropilis</i>) (ATPm)	115

CAPÍTULO 1

1.1 INTRODUÇÃO

O ácaro-rajado, *Tetranychus urticae* Koch (Acari: Tetranychidae), é um artrópode polífago e cosmopolita, alimentando-se de mais de 1.100 espécies de plantas pertencentes a mais de 140 famílias diferentes (ZHANG, 2003; GRBIĆ et al., 2011), incluindo espécies conhecidas pela produção de compostos tóxicos. O ácaro-rajado tem causado consideráveis prejuízos em um grande número de culturas no Brasil, tais como, algodão, morango, mamão, pêssego, uva, feijão, soja, rosa, crisântemo, pimentão e tomate (CHIAVEGATO; MISCHAN, 1981; MORAES; FLECHTMANN, 2008).

O controle do ácaro-rajado ainda vem sendo realizado quase que exclusivamente com o uso de acaricidas químicos, cujo impacto ambiental pode ser bastante significativo (WATANABE et al., 1994). Mesmo quando aplicações regulares de acaricidas são realizadas, existem muitos casos em que o controle de *T. urticae* mostra-se ineficiente. Uma das razões desta ineficiência pode estar associada ao desenvolvimento de resistência do ácaro aos acaricidas (SATO et al., 2004; NICASTRO et al., 2013).

A dificuldade para o controle químico, devido ao problema da seleção de populações resistentes a inseticidas e acaricidas, aliado à procura cada vez maior por alimentos saudáveis, com uso mínimo de pesticidas (FLORES-CANTILLANO et al., 2001), tem levado à busca de estratégias alternativas, como o uso do controle biológico aplicado, com a liberação de inimigos naturais (parasitoides e predadores) (PARRA, 2002) ou a aplicação de entomopatógenos (ALVES; LOPES, 2008).

Em diversos países da Europa e na América do Norte, o controle de *T. urticae* é frequentemente realizado por meio de liberações periódicas de ácaros predadores da família Phytoseiidae (HELLE; SABELIS, 1985). Entre essas espécies, duas pertencem ao gênero *Phytoseiulus*: *Phytoseiulus persimilis* Athias-Henriot e *Phytoseiulus macropilis* Banks. Ambas as espécies são predadoras especialistas (McMUTRY et al. 2015) e predam *Tetranychus urticae* Koch (Acari: Tetranychidae). Essas duas espécies são morfologicamente muito próximas, diferindo apenas pelo número de cerdas no escudo ventrianal (KANOUH et al., 2010). Vários estudos, incluindo abordagens morfológicas, cruzadas e moleculares, parecem mostrar que são espécies distintas, apesar dessa pequena diferença morfológica (OKASSA et al., 2010).

No Brasil, esforços têm sido feitos para promover o uso de programas de controle biológico utilizando ácaros predadores (BUENO; POLETTI, 2009), e *P. macropilis* tem se mostrado promissor para o controle biológico aplicado de *T. urticae* em várias culturas (WATANABE et al., 1994; MONTEIRO, 2003; SATO et al., 2007a).

O emprego de ácaros predadores em sistemas de produção comercial de plantas ornamentais, frutas e hortaliças é prejudicado pela adoção intermitente do controle químico de artrópodes-praga, pois, geralmente, esses predadores são mais suscetíveis aos agrotóxicos que suas presas (CROFT, 1990). Uma estratégia para minimizar os efeitos negativos dos agrotóxicos nos ácaros predadores é o emprego de linhagens resistentes desses inimigos naturais (HOY, 1990, 2011).

Os piretroides são análogos sintéticos do inseticida natural encontrado em certas espécies de crisântemo, amplamente utilizados para o controle de insetos vetores e pragas agrícolas (ZHAO, 2013). São o maior grupo de inseticidas neurotóxicos que têm sido usados extensivamente durante quatro décadas (NYONI et al., 2011), que atuam como moduladores de canais de sódio (NARAHASHI, 2002; SODERLUND, 2012).

Em 2010 foi encontrada uma população de *P. macropilis* resistente a piretroides, em cultivo comercial de morango, em Socorro, SP. Essa população foi mantida em laboratório, realizando-se seleções periódicas com fenpropathrin, para a manutenção da resistência ao acaricida. Essa linhagem R selecionada mostrou-se 5.300 vezes mais resistente que uma linhagem S, mantida em laboratório, no Instituto Biológico, em Campinas, SP (QUEIROZ; SATO, 2016).

O surgimento das plataformas de sequenciamento de nova geração (NGS) tais como as plataformas Solexa/IlluminaTM (Illumina[©]), 454 (Roche[©]) e SOLIDTM (Applied Biosystems[©]), possibilitou a geração de uma enorme quantidade de dados de sequenciamento (HUDSON, 2008), permitindo estudos mais aprofundados sobre a caracterização molecular da resistência a pesticidas em diversos organismos (FEYEREISEN, 2011), incluindo a análise do transcriptoma [conjunto completo de transcritos (RNAs mensageiros, RNAs ribossômicos, RNAs transportadores e microRNAs)] desses organismos a um baixo custo, em um curto período de tempo (NASCIMENTO et al., 2015). A aplicação de técnicas moleculares para identificar e monitorar o estabelecimento e dispersão de inimigos naturais podem assumir um papel significativo no desenvolvimento de bioprodutos.

1.2 OBJETIVOS

1.2.1 Geral

O objetivo geral desta pesquisa foi ampliar os conhecimentos sobre a estrutura genética de populações de *P. macropilis*, com uso de ferramentas moleculares, bem como caracterizar os mecanismos moleculares associados à resistência do predador a piretroides.

1.2.2 Específicos

Avaliar o estabelecimento e dispersão de ácaros predadores, de uma linhagem de *P. macropilis* resistente a piretroides, liberados em cultivos comerciais de morango, no estado de São Paulo.

Desenvolver marcadores microssatélites para *P. macropilis* (e outras espécies de ácaros fitoseídeos), visando à condução de estudos de estrutura genética de populações em cultivos agrícolas.

Realizar estudos com uso de marcador molecular (CytB mtDNA), em populações brasileiras de *P. macropilis*, resistentes ou suscetíveis a piretroides, coletadas em diferentes regiões geográficas do país.

Realizar a análise do transcriptoma de linhagens de *P. macropilis* resistente e suscetível a piretroides, para a busca dos genes relacionados com os mecanismos de resistência a piretroides, em linhagens R e S do predador.

1.3 REVISÃO DE LITERATURA

1.3.1 Ácaro-rajado *Tetranychus urticae*

O desenvolvimento dos ácaros fitófagos está relacionado com a nutrição das plantas e as perturbações fisiológicas destas, originadas pelo estresse hídrico e nutricional, e pela ação de pesticidas (MONTEIRO; FAUVEL, 1996). Sabe-se também, que fatores climáticos como baixos níveis de umidade do ar, que frequentemente estão relacionados a menores níveis de precipitação, favorecem os tetraniquídeos (VIEIRA et al., 2004).

Os indivíduos de *T. urticae* vivem em colônias (Figura 1). Depois da infestação da planta, tecem uma teia de seda na face inferior das folhas, sobre a qual caminham. A teia tem diversas funções como: proteção contra chuva e predadores, facilita o encontro da fêmea pelo macho, e ajuda na dispersão dos ácaros (Figura 2). Ovos são depositados nas teias ou diretamente nas folhas. Cada fêmea oviposita em média 40 a 70 ovos/ciclo, com ciclo de vida variando de 10 a 15 dias (ovo, larva, protoninfa, deutoninfa, adulto) (MORAES; FLECHTMANN, 2008).

Fatores climáticos podem apresentar efeito sobre o desenvolvimento de tetraniquídeos. Bonfour e Tanigoshi (2001) observaram que o aumento da população de *T. urticae* foi favorecido com o aumento da temperatura, sendo que, a 30°C houve maior fecundidade e menor tempo de desenvolvimento de imaturos desta espécie, sobre folhas de framboesa, em condições de laboratório. Trabalhos de campo e laboratório mostram que, temperaturas acima de 27°C podem influenciar a reprodução de *T. urticae* em morangueiro, levando a um aumento de até 3 vezes no número de ovos e formas jovens (WHITE; LIBURD, 2005). Outros fatores podem influenciar a sua multiplicação, relacionados à interespecificidade da praga com hospedeiros e inimigos naturais.



Figura 1. Colônia do ácaro-rajado *Tetranychus urticae* em folha de feijão-de-porco (*Canavalia ensiformis*), apresentando as diferentes formas morfológicas (Foto: M.C.V.Queiroz).



Figura 2. Teia formada pelo ácaro-rajado *Tetranychus urticae* em folha de feijão-de-porco (*Canavalia ensiformis*) (Fotos: M.C.V.Queiroz).

A fecundidade de fêmeas de *T. urticae* também pode ser alterada pela ação de alguns inseticidas. James e Price (2002) observaram que fêmeas deste ácaro, quando expostas a imidacloprid, produzem de 30 a 70 ovos a mais, durante seu tempo de vida (1-1,5 ovos/dia), representando um aumento de 20 a 50% no total de ovos depositados.

As injúrias causadas pelo ácaro-rajado são consequência da alimentação do mesmo, que rompe com suas quelíceras as células da epiderme inferior das folhas. As folhas atacadas adquirem manchas difusas de coloração avermelhada no início e, posteriormente, secam e caem (FADINI; ALVARENGA, 1999), e em infestações severas ocorre redução qualitativa dos frutos.

Em relação à cultura do morangueiro, quando não controlado corretamente, pode reduzir a produção em até 80%, na fase máxima de desenvolvimento da população (CHIAVEGATO; MISCHAN, 1981).

A dispersão desta espécie pode ocorrer por meio de órgãos vegetais transportados pelo homem, sendo uma importante forma de dispersão entre regiões distantes. Quando os tetraniquídeos adultos desta família alcançam alta densidade populacional, mostram tendência de deslocar-se das folhas muito danificadas para outras folhas menos atacadas da planta onde se encontram ou de outras plantas (MORAES; FLECHTMANN, 2008). Segundo Yaninek (1988), os tetraniquídeos geralmente conseguem se dispersar apenas alguns metros caminhando de planta a planta em uma geração.

A dispersão mais frequente de tetraniquídeos dá-se pelo vento, onde fêmeas procuram a periferia da planta hospedeira, apoiam-se sobre as pernas do terceiro e quarto par e, levantando a parte anterior do corpo e as pernas do primeiro e segundo pares, e deixam-se levar pelo vento (MORAES; FLECHTMANN, 2008).

Em cultivo de plantas ornamentais a principal espécie de ácaro-praga é o ácaro-rajado, que em altas infestações, pode cobrir o topo das plantas com fios de seda (Figura 3), causando danos severos em diversas variedades de crisântemo, rosa e gipsofila, ocorrendo nestas culturas praticamente durante todo o ano, especialmente nas estações mais quentes e secas (TAMAI; LOPES; ALVES, 2000).

Em relação à cultura do morangueiro, no estado da Flórida (E.U.A.), a perda anual estimada na produção é da ordem de 10 a 20 milhões de dólares devido aos efeitos do ácaro-rajado, mesmo com a adoção de práticas culturais convencionais e uso de acaricidas (GIMÉNEZ-FERRER et al., 1994), e em Washington, (E.U.A.), constitui a espécie mais abundante nos pomares de pera e maçã (BEERS; ANDERSEN; BROWN, 1997).

Outro grande problema associado ao controle do ácaro-rajado é seu elevado potencial reprodutivo e seu curto ciclo de vida, que favorecem a rápida seleção de populações resistentes a acaricidas após algumas aplicações (STUMPF; NAUEN, 2001).



Figura 3. Injúria causada pelo ácaro-rajado (*Tetranychus urticae*) em roseira (Foto: M.C.V.Queiroz).

1.3.2 Ácaro predador *Phytoseiulus macropilis*

As principais famílias de ácaros que contém espécies de predadores são Anystidae, Bdellidae, Cheyletidae, Cunaxidae, Laelapidae, Phytoseiidae e Stigmaeidae (MORAES, 2002). Dentre essas, destaca-se a família Phytoseiidae. Em todo o mundo, são conhecidas mais de 2250 espécies, das quais aproximadamente 140 foram relatadas no Brasil (MORAES et al., 2004). A partir do final da década de 1950, os ácaros fitoseídeos passaram a ser extensivamente reconhecidos como eficientes predadores de ácaros fitófagos (MCMURTRY; HUFFAKER; VAN DE VRIE, 1970; GERSON; SMILEY; OCHOA, 2003). O controle de ácaros fitófagos, com o uso desses predadores, tem sido realizado com sucesso em diferentes localidades, com destaque para os EUA e Europa (McMURTRY et al., 2015).

O predador *P. macropilis* na fase adulta tem comprimento aproximado de 0,5 mm com cores que variam do laranja ao vermelho. A razão sexual é de 0,8 (quatro fêmeas para cada macho). Sob uma temperatura de 26°C, *P. macropilis* apresentou fecundidade de 72,2 ovos/fêmea, com um período de pré-oviposição de 1,9 dia, duração de 24,3 dias de oviposição, e uma longevidade para machos de 35,8 dias e para fêmeas de 44 dias (SILVA et al., 2005).

Esse predador, descrito originalmente da Flórida por Banks em 1904, também foi relatado em países do continente americano e ilhas do Caribe e outras regiões tropicais (MORAES et al., 2004). Sua biologia foi inicialmente estudada por Smith; Summers (1949). Depois disso, diversos autores estudaram a possibilidade do uso desse predador no controle biológico de ácaros tetraniquídeos (PRASAD, 1967; SHIH et al., 1979; WATANABE et al., 1994). Vários estudos foram realizados com esse predador, que demonstrou grande potencial de controle do ácaro-rajado. Garcia e Chiavegato (1997) verificaram grande eficiência desse predador quando avaliaram a resposta funcional e reprodutiva a diferentes densidades de ovos de *T. urticae* em folhas de morango. Ali (1998) verificou em seus estudos de tabela de vida de fertilidade em *Morus alba* L. que *P. macropilis* pode ser considerado um candidato promissor para o controle biológico de *T. urticae*. Oliveira et al. (2007) demonstraram resultados satisfatórios para o controle de *T. urticae* em morangueiro.

A espécie *P. macropilis* aparece naturalmente em plantações onde não se usam agrotóxicos. Alguns agricultores conseguiram controlar de forma satisfatória o ácaro-rajado com o uso desta espécie, sem a necessidade de intervenção química (GARCIA e CHIAVEGATO, 1997).

O controle biológico de pragas em culturas de estufa geralmente é baseado em lançamentos periódicos de inimigos naturais produzidos em massa, e esse método tem sido aplicado com sucesso por décadas (MESSELINK, 2014); porém, é difícil a criação massal de *P. macropilis* em laboratórios principalmente devido ao seu elevado consumo de presas e pelo desconhecimento de presas alternativas (BORTOLOZZO et al., 2007).

As criações são mantidas em plantas de feijão-de-porco (*Canavalia ensiformis* L.), infestadas com *T. urticae*, cultivadas em vasos de 500 mL, em salas climatizadas ($25 \pm 1^\circ\text{C}$, $70 \pm 5\%$ de UR, fotofase de 12 horas (Figura 4).



Figura 4. Plantas de feijão-de-porco (*Canavalia ensiformis* L.) cultivadas em vasos (Foto: M.C.V.Queiroz).

Os indivíduos adultos de *P. macropilis* apresentam corpo de coloração avermelhada e formato ovóide (Figura 5). É encontrado na face inferior dos folíolos do morangueiro em teia do ácaro-rajado ou próximo da nervura principal (MORAES; FLECHTMANN, 2008). Pode ser visualizado a olho nu, como um ponto vermelho de rápida movimentação após receber um toque (Figura 6).



Figura 5. *Phytoseiulus macropilis* predando *Tetranychus urticae* (Foto: M.C.V.Queiroz).



Figura 6. *Phytoseiulus macropilis* em folha de feijão-de-porco (*Canavalia ensiformis*) com alta infestação de ácaro-rajado (*Tetranychus urticae*) (Foto: M.C.V.Queiroz).

Estudos relacionados à biologia de *P. macropilis* relataram uma grande variação na duração do estágio de ovo, com observações que alternam de 1,5 a 4,5 dias (ALI, 1998; SILVA et al., 2005). Após a oviposição, os ovos apresentam formato oblongo e coloração translúcida, passando à coloração mais escura com o desenvolvimento embrionário, a oviposição é realizada nas folhas das plantas hospedeiras do ácaro-rajado.

O período larval de *P. macropilis* dura em média 1 dia e nesta fase o ácaro apresenta apenas três pares de pernas (SILVA et al., 2005). A fase de larva deste predador alimentado com *T. urticae* apresentou duração de 0,86 dia (JOHANN; SCHERER; FERLA, 2004).

Em estudos realizados sobre o desenvolvimento dos estágios imaturos de *P. macropilis*, foi constatado que o tempo médio de desenvolvimento diminuiu progressivamente com o aumento da temperatura (SILVA et al., 2005). Os autores verificaram ainda que as fases de protoninfa e deutoninfa apresentaram uma variação de 2,6 a 0,9 e 2,6 a 0,8 dias respectivamente, para temperaturas de 18°C e 30°C. A alteração na duração dos estágios com a elevação da temperatura também foi observada por Ali (1998).

Johann, Scherer e Ferla (2004), observaram que para a temperatura de 25±1°C, umidade relativa de 80±5%, a duração dos estágios de protoninfa e deutoninfa foi de 0,62 e 0,5 dia, respectivamente.

Uma característica importante de *P. macropilis* é que esse predador é bem adaptado a climas quentes, podendo ser utilizado tanto em cultivos abertos, como em estufas, onde a temperatura pode exceder facilmente 30°C, especialmente no verão (OLIVEIRA et al., 2007).

Embora diversos trabalhos com ácaros predadores da família Phytoseiidae tenham indicado o seu potencial de uso no controle do ácaro-rajado em morangueiro, as informações obtidas até o presente momento no Brasil não permitem a elaboração de programa amplo de manejo de *T. urticae*. A espécie escolhida para o estudo de seletividade, *P. macropilis*, é um dos fitoseídeos de maior frequência em culturas como morangueiro e ornamentais no Estado de São Paulo e Minas Gerais. Essa espécie mostra-se sensível a diversos pesticidas (POLETTI, 2007).

Para a viabilização do uso desses predadores e para a implementação de modo eficiente do controle biológico na cultura do morangueiro e outras culturas, é indispensável que os pesticidas utilizados sejam inócuos ou seletivos aos inimigos naturais e que estudos de seletividade sejam incentivados em condições laboratório, semicampo e campo (JANSEN, 2010).

Trabalhos conduzidos no Brasil demonstraram alta potencialidade de se realizar o controle biológico desta praga em morangueiro com liberações de ácaros predadores das espécies *Amblyseius idaeus* (Denmark e Muma), *P. macropilis* (GARCIA, 1992; WATANABE et al., 1994) e *Neoseiulus californicus* (McGregor) (SATO et al., 2002, 2007b). A espécie *P. macropilis* ocorre naturalmente em diversas regiões produtoras de morango no

Brasil, e segundo Garcia e Chiavegato (1997), apresenta grande eficiência predatória para o controle de *T. urticae*.

A utilização do ácaro predador *P. macropilis*, associado a compostos de baixa toxicidade, pode apresentar grande utilidade em programas de manejo integrado de *T. urticae* nas lavouras de morangueiros no Brasil, principalmente aquelas conduzidas sob sistemas de produção integrada (PIMo) (VERONEZ et al., 2009).

O uso de ácaros tolerantes a pesticidas foi relatado em casa de vegetação na Califórnia, USA. Uma linhagem do predador *Metaseiulus occidentalis* (Nesbitt) apresentou um bom potencial de controle do ácaro-praga por ser resistente a vários orgnofosforados e carbamatos, e pela sua capacidade de controle em baixas densidades da praga, durante longos períodos (HELLE; SABELLIS, 1985).

No Brasil, os ácaros fitoseídeos *Neoseiulus californicus* e *Phytoseiulus macropilis* (Banks) têm sido promissores para o controle biológico aplicado de *Tetranychus urticae* Koch em várias culturas (BELLINI et al., 2006; MONTEIRO, 2003; SATO et al., 2007a; WATANABE et al. 1994). Devido ao fato de *N. californicus* e *P. macropilis* apresentarem características que os diferem quanto ao hábito alimentar e comportamento, sendo o primeiro generalista e o segundo especialista (McMURTRY; CROFT, 1997; CROFT; MONETTI; PRATT, 1998), considera-se que essas espécies possam ser exploradas de forma combinada para otimizar programas de manejo de *T. urticae*.

1.3.3 Controle químico e resistência de artrópodes a pesticidas

A resistência em insetos e ácaros tem sido um dos maiores problemas no controle de pragas dos últimos tempos, dificultando bastante a recomendação de pesticidas (SOUZA FILHO et al., 1994). O primeiro caso de resistência de uma praga a um pesticida foi relatado em 1908 nos Estados Unidos, o piolho-de-São José *Quadraspidiotus perniciosus* (Comstock) resistente ao enxofre (MELANDER, 1914). Os casos de resistência se intensificaram com a introdução dos inseticidas organo-sintéticos ao redor de 1940 (GEORGHIOU, 1983).

A resistência pode ser definida como o desenvolvimento de uma habilidade em uma linhagem de um organismo de tolerar doses de tóxicos que seriam letais para a maioria da população normal (suscetível) da mesma espécie (OMS) (IRAC-BR, 2009).

Em relação à evolução da resistência estão sendo observadas consequências drásticas como a aplicação mais freqüente de pesticidas; aumento na dose do produto; uso de misturas indevidas de produtos e substituição por outro produto, geralmente de maior toxicidade

(GEORGHIOU, 1983). Esses fatores comprometem os programas de manejo integrado de pragas (MIP) em vista da maior contaminação do meio ambiente com pesticidas, mortalidade de organismos benéficos (ex.: insetos polinizadores, inimigos naturais), e elevação nos custos de controle da praga. Sabe-se também que a descoberta e o desenvolvimento de novas moléculas químicas está se tornando cada vez mais difíceis e caros (OMOTO, 2003).

A evolução da resistência de insetos a pesticidas, que inclui os aleloquímicos de ocorrência natural nas plantas e os inseticidas sintéticos, é um desafio para o manejo de pragas e ao mesmo tempo um sistema ideal para o estudo em microevolução e adaptação ambiental. Na última década, grandes progressos foram feitos na identificação de genes associados à resistência a pesticidas e mudanças estruturais que afetam suas funções. Algumas proteínas de insetos, alvos dos pesticidas, podem se tornar insensíveis, normalmente devido a poucas mutações pontuais conservadas, provavelmente porque suas funções são vitais e pequenas mudanças podem reduzir a sensibilidade aos pesticidas sem prejudicar seu funcionamento (FFRENCH-CONSTANT, 1998). Em contraste, genes associados à resistência metabólica mediam funções de resposta ambiental (BERENBAUM, 2002) que têm relativamente menos restrições intrínsecas e tendem a ser mais tolerantes a mudanças genômicas para alteração de função, expressão, ou dos dois (LI; SCHULER; BERENBAUM, 2007). Amplificação de sequências, melhoria na transcrição, e mudanças na codificação em genes que expressam esterases, monooxigenases dependentes do citocromo P450 e glutathione-S-transferases (GSTs) têm sido identificadas como mecanismos de resistência (SCOTT, 1999; HEMINGWAY, 2000; FEYEREISEN, 2005).

1.3.4 Mecanismos de resistência a pesticidas

Os artrópodes utilizam alguns meios para se manter vivos e reduzir ou escapar do modo de ação dos ingredientes ativos presentes nos pesticidas utilizados para seu controle.

Quanto aos mecanismos de resistência a pesticidas associados aos ácaros, uma ampla discussão foi apresentada por Croft (1990). Em geral, os mecanismos de resistência de insetos e ácaros a pesticidas são incluídos em três categorias: a) redução da penetração do pesticida pela cutícula do artrópode; b) redução da sensibilidade no sítio de ação do inseticida ou acaricida; e c) detoxificação ou metabolização enzimática do produto químico (OPPENORTH, 1985; HEMINGWAY, 2000; SATO et al., 2001; LORINI; BECKEL, 2002). O comportamento dos insetos frente a inseticidas é um quarto mecanismo que recentemente vem sendo estudado, e tem sido verificado pela repelência de inseticidas

exercida sobre as pragas (HODGES; MEIK, 1986), e por alterações de comportamento provocadas pelos pesticidas (LORINI; GALLEY 1998; BECKEL et al., 2004).

Vários grupos enzimáticos estão envolvidos no metabolismo de pesticidas e têm sido identificados como mecanismos de resistência em várias espécies de artrópodes. É o caso as monooxigenases dependentes do citocromo P-450, esterases, GSH-transferase, sendo que potencialmente todas as classes de pesticidas podem ser afetadas através desses mecanismos (OMOTO, 2003). Por meio de táticas biomoleculares pode-se identificar esses grupos enzimáticos, avaliar esses mecanismos de resistência em ácaros e realizar o monitoramento da resistência.

A degradação do inseticida pode ocorrer por vários processos metabólicos nos quais o produto é convertido em uma forma não tóxica ou mesmo eliminado rapidamente do corpo do inseto. As enzimas e sistemas enzimáticos envolvidos, como as esterases, oxidases, transferases e outras enzimas, apresentam maior atividade ou estão em quantidades maiores nas populações resistentes (YU, NGUYEN 1996; HEMINGWAY, 2000). As oxidases e transferases são enzimas ubíquas que estão comumente envolvidas na detoxificação de numerosos compostos. Já as esterases são de maior importância na detoxificação de alguns grupos químicos, principalmente organofosforados e piretróides (CONYERS et al., 1998; VAN LEEUWEN; TIRRY, 2007).

O metabolismo ou detoxificação é, provavelmente, o mecanismo mais estudado de resistência de insetos a inseticidas. Este mecanismo permite ao inseto modificar ou detoxificar o inseticida a uma taxa suficiente para prevenir a ação no seu sítio alvo (FUKUTO; MALLIPUDI 1983).

Guedes et al. (1997) demonstraram que a atividade específica da acetilcolinesterase diferiu significativamente entre populações resistentes e suscetíveis de *Rhyzopertha dominica*, indicando que a atividade aumentada da acetilcolinesterase parece estar associada com a resistência a organofosforados. E, com relação à resistência bioquímica aos piretróides, estudos de Collins (1990), com a espécie *Tribolium castaneum*, indicam que o aumento do metabolismo enzimático na molécula do inseticida envolve oxidação e/ou hidrólise por ésteres.

Os piretroides agem no sistema nervoso dos artrópodes, onde modificam a cinética do VGSC (voltage-gated sodium channel) (CATTERALL, 2000), que resultam em descargas irregulares e perda de sinalização neural coordenada, levando à paralisia e morte (SODERLUND; BLOOMQUIST, 1989).

A resistência aos piretroides tem sido registrada em muitos artrópodes-praga e geralmente resulta de mutações no gene VGSC que provocam substituições de aminoácidos em proteínas desses canais (DAVIES et al., 2007; RINKEVICH et al., 2013). Essas substituições tendem a se agrupar em pontos específicos para a resistência e muitas estão localizadas dentro dos segmentos transmembranares de domínios II e III (O'REILLY et al., 2006). A mutação mais comum é a substituição de leucina 1014 por fenilalanina (L1014F), no segmento S6 do domínio II. Essa mutação é geralmente associada com resistência moderada aos piretroides (10-30 vezes) e foi denominada mutação kdr (knockdown resistance) (WILLIAMSON et al., 1996). Outras mutações associadas com resistência de maior magnitude (super-kdr) também foram identificadas e incluem substituições para metionina 918 (IIS4- S5 ligante), leucina 925, treonina 929, leucina 932 (IIS5 hélice) e fenilalaninas 1534, 1538 (IIS6 hélice) (GONZÁLEZ- CABRERA et al., 2013).

O aumento no metabolismo ou detoxificação é, provavelmente, o mecanismo mais estudado de resistência de insetos a inseticidas. Esse mecanismo permite ao inseto modificar ou detoxificar o inseticida a uma taxa suficiente para prevenir a ação no seu sítio alvo de ação (FUKUTO; MALLIPUDI, 1983). Stumpf e Nauen (2001) observaram um aumento na atividade das monooxigenases dependentes do citocromo P450 em linhagens resistentes a acaricidas (METIs), comprovando que indivíduos resistentes eram capazes de degradar a molécula química em compostos inertes com maior eficácia que os indivíduos suscetíveis.

Diagnósticos moleculares de resistência a pesticidas, em populações de artrópodes, são considerados mais precisos e diminuem a variabilidade associada com bioensaios, levando em consideração aspectos intrínsecos (estrutura genética) e extrínsecos (condições laboratoriais, tamanho da amostra, etc.) (BROWN; BROGDON, 1987; OSAKABE et al., 2009; VAN LEEUWEN et al., 2010).

Com o estabelecimento da técnica conhecida como PCR (Polymerase Chain Reaction), houve grande avanço no entendimento da resistência em nível molecular. A técnica consiste em uma amplificação exponencial de fragmentos específicos de DNA a partir de pequenas quantidades dessa molécula, utilizando enzimas polimerases e pequenas sequências iniciadoras (primers) que se ligam a regiões complementares do DNA e servem como molde inicial para a amplificação de determinada região dessa molécula de DNA (LOCALI et al., 2003). Tal técnica poderia ser utilizada para a detecção de uma região específica de populações resistentes a pesticidas com o emprego de marcadores moleculares para essa característica.

1.3.5 Resistência de ácaro-rajado a acaricidas

Mesmo quando aplicações regulares de acaricidas são realizadas para o controle de *T. urticae*, existem muitos casos em que o controle dessa praga mostra-se ineficiente, sendo que a razão desta ineficiência pode estar associada ao desenvolvimento de resistência do ácaro-rajado aos acaricidas (FLEXNER; WESTIGARD; CROFT, 1988; SATO et al., 1994).

O primeiro relato de resistência para *T. urticae* foi em 1937, com a detecção de uma linhagem dessa espécie resistente a um composto a base de selênio (Selocide®) (COMPTON; KEARNS, 1937). A resistência de *T. urticae* a acaricidas tem sido documentada em diversos países para diferentes compostos tais como organofosforados (SATO et al., 1994), dicofol (FERGUSSON-KOLMES; SCOTT; DENNEHY, 1991), organoestânicos (FLEXNER; WESTIGARD; CROFT, 1988), hexitiazox (HERRON; ROPHAIL, 1993), clofentezina (HERRON; EDGE; ROPHAIL, 1993); fenpiroximato (STUMPF; NAUEN, 2001; SATO et al., 2004) e abamectina (BEERS; RIEDL; DUNLEY, 1998).

Sato et al. (2007a) utilizaram testes toxicológicos de pulverização direta com clorfenapir sobre 21 populações ácaro-rajado provenientes de cultivos comerciais de mamoeiro, morangueiro, feijoeiro, tomateiro, crisântemo e roseira, oriundas de diversos municípios paulistas com o objetivo de avaliar frequência de resistência de *T. urticae*, para cada população. Através do monitoramento realizado por esses autores foi constatado que 66,7% das populações avaliadas se mostraram suscetíveis ao acaricida clorfenapir, e que apenas duas populações coletadas em áreas comerciais de crisântemo, em Holambra (SP), tinham frequências de resistência acima de 30%.

A evolução da resistência tem relação positiva com o potencial reprodutivo de uma espécie, sendo mais rápida para espécies que tenham alto potencial reprodutivo, pois um maior número de descendentes estará sofrendo pressão de seleção (GEORGHIOU; TAYLOR, 1977). Para *T. urticae* vem sendo registrado um grande número de casos de resistência aos principais compostos registrados e/ou utilizados nas culturas, dificultando seu controle com pesticidas (SATO et al., 2007a). De acordo com o IRAC, há registro de 468 casos de resistência de *T. urticae* a acaricidas (94 ingredientes ativos) em 36 países (IRAC-MSU, 2015).

A evolução da resistência de ácaros fitófagos aos acaricidas em curto intervalo de tempo depende, dentre outros fatores, do uso frequente do mesmo acaricida (pressão de seleção), do elevado potencial reprodutivo e do ciclo de vida curto dos ácaros (STARK et al., 1997; BEERS; RIEDL; DUNLEY, 1998; STUMPF; NAUEN, 2001). Na prática, verificou-se que as pulverizações contínuas de pesticidas levam à seleção de populações resistentes (MONTEIRO, 1994), o que explica a baixa eficiência de alguns acaricidas em condições de campo.

Devido a elevados níveis de resistência cruzada de *T. urticae* a todos os acaricidas que atuam como inibidores de transporte de elétrons na mitocôndria (METIs) disponíveis comercialmente, Stumpf e Nauen (2001), realizaram um bioensaio de aplicação por pulverização foliar, fazendo uma comparação com uma linhagem suscetível GSS e larvas de duas linhagens resistentes (AKITA e UK-99), que se mostraram 1100 e 480 vezes mais resistentes a piridabem, 870 e 45 vezes mais resistentes contra fenpyroximato, e 33 e 44 vezes mais resistentes contra tebufenpirade, respectivamente. Esses autores observaram que houve um aumento do metabolismo oxidativo nas linhagens resistentes a acaricidas METIs, sendo que as linhagens resistentes AKITA e UK-99 apresentaram 2,4 e 1,7 vezes etoxicumarina reforçada pela atividade do citocromo P450, comprovando que indivíduos resistentes através do aumento na detoxificação metabólica do pesticida são capazes de degradar a molécula química em compostos inertes com maior eficácia do que os indivíduos suscetíveis.

Sato et al. (2000), estudando a resistência de *T. urticae* em pessegueiros, observaram que a linhagem procedente de Paranapanema mostrou-se 12,10; 8,39 e 6,08 vezes mais resistentes aos organofosforados dimetoato, naledo e mevinfós, respectivamente, e a linhagem de pessegueiro proveniente de Jundiá apresentou-se, respectivamente, 3,76 e 2,94 vezes mais resistentes a cihexatina que a suscetível. Possivelmente a população de *T. urticae* usada nesse estudo apresentava uma acetilcolinesterase menos sensível à inibição pelas "formas oxon" destes compostos, segundo relatado por Smissaert (1964), em estudos anteriores com populações de *T. urticae* resistente a organofosforados.

Para o controle do ácaro-rajado, o manejo de acaricidas é de fundamental importância, visando evitar a seleção de populações resistentes. De acordo com Omoto (2003), são sugeridas como estratégias de manejo da resistência, a rotação de acaricidas com modos de ação diferentes, mistura de acaricidas e uso de sinergistas. Sato et al. (2005), estudando aspectos da resistência do ácaro-rajado a pesticidas, não detectou resistência cruzada entre abamectina e os acaricidas fenpiroximato, cihexatina, propargito e dimetoato, porém, populações artificialmente selecionadas com fenpiroximato apresentaram resistência cruzada

positiva com piridabem e dimetoato e ausência de resistência com abamectina, milbemectina, fenpropathrin e cihexatina (SATO et al., 2004), deixando claro que devem ser tomados cuidados essenciais para manejar esses compostos a fim de evitar o surgimento de populações com resistência cruzada a esses produtos.

Outras formas de manejo como rotação de culturas, manutenção de áreas de refúgio, uso de doses reduzidas ou elevadas de pesticidas, uso de produtos com baixa persistência, culturas transgênicas, entre outros, também podem ser bastante eficientes no controle de pragas de diversas culturas (OMOTO, 2003).

O grande desafio atual está na implementação de estratégias de manejo da resistência, sendo que a implementação depende de vários fatores, tais como programa educacional para a conscientização da magnitude do problema da resistência; necessidade de um esforço conjunto envolvendo agricultores, indústrias químicas, técnicos e pesquisadores; realização de experimentos de campo por um período prolongado; regulamentação de uso de pesticidas, entre outros (OMOTO, 2003).

Trabalhos desenvolvidos no Instituto Biológico têm indicado que diversas populações deste ácaro, coletadas no Estado de São Paulo, já se mostram resistentes a alguns acaricidas como dimetoato, abamectina, fenpiroximato, propargito e clorfenapir (SATO et al., 1994, 2000, 2004, 2005, 2007b, 2009), sendo que a porcentagem de ácaros resistentes a pelo menos um acaricida chega a 90% e a intensidade de resistência pode chegar a centenas de vezes em algumas culturas como a do morangueiro e ornamentais, evidenciando a gravidade do problema.

A abundância de inimigos naturais no campo é muito relevante para diminuir a frequência de aplicação de acaricidas que contribui para retardar a evolução da resistência do ácaro-rajado (ESTEVES FILHO; OLIVEIRA; GONDIM JÚNIOR, 2008), uma vez que certas espécies de inimigos naturais têm a capacidade de consumir grande quantidade de indivíduos considerados praga.

1.3.6 Resistência de ácaros predadores a pesticidas

Os ácaros fitoseídeos têm constituído o grupo de inimigos naturais mais explorado em estudos dirigidos à resistência a pesticidas. O primeiro relato de sobrevivência em populações de ácaros fitoseídeos após pulverizações com inseticidas de largo espectro de ação em campo foi efetuado no início dos anos 50 para *Galendromus occidentalis* (Nesbitt) (HUFFAKER; KENNETT, 1953). No entanto, esse fato foi associado à resistência somente no final da década de 60, quando trabalhos realizados em laboratório confirmaram a ocorrência de variabilidade intraespecífica na suscetibilidade de *G. occidentalis* e *Neoseiulus* (= *Amblyseius*) *fallacis* a inseticidas organofosforados (CROFT, JEPPSON, 1970; MOTOYAMA et al., 1971). A partir disso, diversos trabalhos de detecção e seleção para resistência a pesticidas em populações de ácaros fitoseídeos foram efetuadas em todo mundo (HOY, 1990).

Quanto aos grupos químicos, ênfase tem sido dada aos carbamatos, organofosforados e piretróides, pelo fato de apresentarem elevada toxicidade para a maioria das espécies de ácaros predadores em campo.

Uma espécie de ácaro fitoseídeo que se destaca no número de trabalhos relacionados à resistência é *P. persimilis*, sendo comumente utilizado para controle de *T. urticae* em cultivos protegidos e em ornamentais, em países da Europa. A resistência de *P. persimilis* a inseticidas organofosforados foi relatada por Schulten et al. (1976). Esses autores observaram que populações liberadas em cultivos protegidos na Holanda apresentaram elevada resistência a parathion. Quanto à resistência múltipla, tem sido detectada com frequência em alguns países da Europa (CROFT, 1990). A introdução de uma linhagem de *P. persimilis* resistente a organofosforados foi realizada no Egito para controle de *T. urticae* na cultura do pepino, evidenciando-se uma elevada efetividade desse predador quando foram realizadas liberações de dez indivíduos por planta (RASMY; ELLAITHY, 1988).

Em 1972, uma linhagem de *G. occidentalis* resistente a organofosforados foi enviada da América do Norte para a Austrália. Segundo Readshaw (1975) citado por Gerson et al. (2003), este foi o primeiro relato de transferência intercontinental de inimigos naturais resistentes no mundo. Linhagem de *G. occidentalis* resistente a organofosforados, também foi introduzida na antiga União Soviética no início dos anos 80 para o controle biológico de *Tetranychus pruni* obtendo-se um grande sucesso no estabelecimento da mesma

(PETRUSHOV, 1987). A esses se seguiram outros casos de sucesso na liberação e estabelecimento de populações de ácaros predadores resistentes a pesticidas.

Em termos práticos, HOY (1985) propôs um programa de manejo de ácaros na cultura de amêndoas (Califórnia/EUA) baseando-se na liberação de linhagens de *G. occidentalis* resistentes a inseticidas, associada à utilização de acaricidas seletivos. Uma economia de aproximadamente 60 a 110 dólares/ha/ano foi estimada para cada produtor de amêndoa que aderiu ao programa de liberação de linhagens resistentes, observando que a maior economia foi devido à redução nos gastos com acaricidas (HEADLEY; HOY, 1987). A estimativa mais recente feita por Hoy (2000) associou aos resultados desse projeto um benefício, desde o início do programa, de aproximadamente 20 milhões de dólares.

A desvantagem ou custo adaptativo é uma característica que pode estar associada à resistência em populações de artrópodes. Sato et al. (2005), observaram que a resistência de *P. macropilis* a abamectina mostrou-se instável na ausência de pressão de seleção, e para todas as populações estudadas (com frequência inicial de 75, 50 e 25% de ácaros resistentes), a porcentagem de ácaros resistentes caiu para níveis iguais ou inferiores a 15% em seis meses. Esse fato pode estar associado a um custo adaptativo, ou seja, os resistentes são menos aptos que os suscetíveis quando o produto químico não é utilizado (OMOTO, 2003; NICASTRO; SATO; SILVA, 2010). Este menor valor adaptativo dos indivíduos resistentes pode estar associado a uma menor viabilidade total, menor fecundidade, maior tempo para o desenvolvimento, menor competitividade para o acasalamento, maior suscetibilidade aos inimigos naturais, etc. (GEORGHIOU, 1972).

Queiroz e Sato (2016) observaram, em populações de *P. macropilis* com frequência inicial de 75 e 50 % de ácaros resistentes a fenprothrin, uma tendência de queda nas frequências de resistência em ausência de pressão de seleção, que desapareceu após alguns meses, indicando a associação com um mecanismo de existência sem custo adaptativo.

No caso de inimigos naturais, o fato de a linhagem selecionada apresentar alterações em alguns de seus parâmetros biológicos pode afetar diretamente o desempenho dela como agente de controle biológico (POLETTI; OMOTO, 2003). Fournier et al. (1988) comparando parâmetros relacionados à tabela de vida e a capacidade de predação, dentre outros, entre as linhagens do ácaro predador *P. persimilis* resistente e suscetível ao inseticida methidation, não observaram custo adaptativo associado à linhagem selecionada. Apesar de vários relatos estarem associados à ausência de custo adaptativo em inimigos naturais resistentes a pesticidas, a realização de estudos prévios relacionados aos parâmetros biológicos, bem como a capacidade de predação na linhagem selecionada é de primordial importância, pois este fato

pode comprometer diretamente a implementação de programas baseados na introdução desses organismos (HOY, 1990).

A seleção artificial de linhagens de inimigos naturais resistentes a pesticidas nem sempre tem sido efetivada com sucesso. De acordo com Hoy (1990) algumas técnicas de biotecnologia poderiam ser ferramentas exploradas no melhoramento de inimigos naturais a pesticidas. A utilização da técnica de DNA recombinante tem sido considerada a mais viável para a implementação da resistência em inimigos naturais. Várias etapas envolvem esse processo, sendo necessário primeiramente identificar os genes que governam a resistência, posteriormente devem ser clonados e inseridos no organismo (inimigo natural) geralmente através de microinjeção. Após a incorporação no genoma esse gene deve estabilizar, se expressar apropriadamente e ser transmitido às progênes. *Galendromus occidentalis* foi o primeiro inimigo natural melhorado através dessa técnica (PRESNAIL; HOY, 1994).

A PROMIP, criada em 2006, foi a primeira empresa brasileira a comercializar ácaros predadores para o controle biológico de insetos e ácaros-praga.

1.3.7 Marcadores moleculares para monitoramento de ácaros predadores

Os avanços na genética muito contribuíram para a compreensão do controle biológico. Marcadores genéticos são ferramentas poderosas para diferenciar espécies muito próximas, monitorar liberações de agentes de controle biológico, e avaliar traços biológicos relevantes. No campo, a importância das características particulares de cada espécie e/ou população de inimigo natural estabelecida pode ser avaliada. Introduções de indivíduos de diferentes origens ou de colônias de laboratório que foram selecionadas para diferentes características (como resistência a inseticidas), podem ser examinadas após a introdução em campo, para determinar quais fenótipos ou genótipos têm prevalecido (RONDERICK; NAVAJAS, 2003). O controle biológico conservativo é a prática de aumentar a eficácia de inimigos naturais através da modificação do ambiente ou de práticas de controle existentes (EILENBERG et al., 2001). No entanto, para melhor preservar os inimigos naturais de pragas agrícolas, é necessário considerar as alterações espaciais e temporais em seus padrões de distribuição e movimento no campo. Infelizmente, na prática é muito difícil observar direta e continuamente a dispersão de pequenos organismos, tais como ácaros predadores, durante gerações, apesar de terem sido tentados esforços para estimar os seus movimentos (TIXIER et al., 1998, 2000; BARBAR et al., 2006;). Como alternativa, a estimativa de fluxo gênico utilizando marcadores

genéticos pode fornecer informações sobre estrutura populacional e padrões de dispersão dos ácaros predadores (HINOMOTO et al., 2011).

Em menos de meio século, os marcadores moleculares mudaram totalmente nossa visão da natureza (SCHLOTTERER, 2004). Em alguns casos, marcadores moleculares, que são raros ou únicos, têm sido utilizados para monitorar a dispersão de genes a partir de fontes pontuais conhecidas. Essa abordagem genética é similar em conceito aos tradicionais estudos de rotulagem e rastreamento baseados em marcadores não hereditários, como marcadores radioativos e corantes fluorescentes (LEVIN et al., 1990), porém, com pelo menos duas vantagens: espécies microscópicas podem ser analisadas por marcadores moleculares, e estas também podem ser monitoradas através de múltiplas gerações (AVISE, 2004).

Dentre os diferentes marcadores genéticos comumente usados, está o Cytb mtDNA. Esse fragmento do Citocromo B provou ser um bom marcador para avaliar a história evolutiva recente em ácaros Phytoseiidae e, assim, adaptado às espécies e diferenciação populacional (SANTOS; TIXIER, 2016). Apesar das pequenas diferenças morfológicas entre *P. macropilis* e *P. persimilis*, foi observado um desenho claro entre as amostras desses dois táxons para o fragmento mtDNA Cytb (OKASSA et al., 2010).

Ainda, entre os diferentes marcadores moleculares usados em estudos de diferenciação de populações, estão os microssatélites (simple-sequence repeats - SSRs), que surgiram como uma ferramenta genética poderosa para responder perguntas sobre dinâmica de populações.

Os microssatélites são definidos como fragmentos curtos de DNA, com aproximadamente 100 pares de bases (pb) que contêm padrões com 2-6 pb repetidas em conjunto. Durante a replicação do DNA, unidades de repetição são adicionadas ou perdidas do microssatélite, causando rápida evolução dessas regiões. Há, geralmente, alta variabilidade no número de repetições em um determinado local. Isto faz com que um grande número de alelos por local de microssatélite esteja disponível para análise da população (NAVAJAS; FENTO, 2000).

Os microssatélites são onipresentes em genomas eucarióticos e altamente polimórficos (HANCOCK, 1999). Seus altos níveis de polimorfismo os tornam um marcador adequado para o estudo de variação intra e interpopulacional. Marcadores microssatélites também têm sido desenvolvidos para espécies de ácaros (NAVAJAS et al., 1998; NISHIMURA et al., 2003; BAILLY et al., 2004; UESUGI; OSAKABE, 2007). Hinomoto et al. (2011) desenvolveram marcadores moleculares microssatélites para *Neoseiulus womersleyi* (Schicha), e usaram essa ferramenta para investigar a estrutura genética da população desse

ácaro em um campo experimental de chá. Até então estes marcadores não tinham sido aplicados para ácaros fitoseídeos no contexto de controle biológico conservativo.

A principal desvantagem dos microssatélites é que eles precisam ser isolados “de novo” da maioria das espécies que estão sendo examinadas pela primeira vez. Consequentemente, a estratégia de usar sequências conservadas correspondentes a "primers universais", que foi eficaz para o DNA mitocondrial (KOCHER et al., 1989), é mais problemática para microssatélites. As abordagens de “Barcoding” foram desenvolvidas com sucesso para a família Phytoseiidae para fins de diagnóstico de espécies usando marcadores moleculares, como rRNA 12S, Cyt b mtDNA e ITS (JEYAPRAKASH; HOY, 2002, 2009; TIXIER et al., 2008a, 2014; OKASSA et al., 2009, 2010, 2012; KANOUEH et al., 2010; BOWMAN; HOY, 2012; NAVIA et al., 2014).

Os estudos de transferabilidade (cross-amplification) seriam, então, um método simples de desenvolvimento e validação de marcadores. Empiricamente, verificou-se que a transferabilidade entre espécies funciona para táxons intimamente relacionados, como espécies pertencentes ao mesmo gênero ou gêneros recentemente separados (SCRIBNER; PEARCE, 2000).

1.4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALI, F.S. Life tables of *Phytoseiulus macropilis* (Banks) (Gamasida: Phytoseiidae) at different temperatures. **Experimental and Applied Acarology**, v.22, p. 335-342, 1998.

ALVES, S.B.; LOPES, R.B. **Controle Microbiano de Pragas na América Latina**. 1.ed. Piracicaba: Fundação de Estudos Agrários Luiz de Queiroz-FEALQ, 2008. v.1. 414p.

AVISE, J.C. **Molecular Markers, Natural History, and Evolution**. Second Edition. Sunderland: Sinaue, 2004. 684p.

BAILLY, X.; MIGEON, A.; NAVAJAS, M. Analysis of microsatellite variation in the spider mite pest *Tetranychus turkestani* (Acari: Tetranychidae) reveals population genetic structure and raises questions about related ecological factors. **Biological Journal of the Linnean Society**, v.82, p.69-78, 2004.

BARBAR, Z.; TIXIER, M.S.; CHEVAL, B.; KREITER, S. Effects of agroforestry on Phytoseiidae mite communities (Acari: Phytoseiidae) in vineyards in the South of France. **Experimental and Applied Acarology**, v.40, p.175-188, 2006.

BECKEL, H., LORINI, I. and LAZZARI, S.M.N., 2004. Comportamento de adultos de diferentes raças de *Rhyzopertha dominica* (Fabricius) (Coleoptera, Bostrichidae) em superfície tratada com deltamethrin. **Revista Brasileira de Entomologia**, v.48, n.1, p.115-118. <http://dx.doi.org/10.1590/S0085-56262004000100019>.

BEERS, E. H.; ANDERSEN, A.; BROWN, R. D. Absorption and translaminar activity of abamectin in apple and pear foliage as determined by spider mite (Acari: Tetranychidae) mortality. **Journal of Economic Entomology**, v.90, p.566-573, 1997.

BEERS, E. H.; RIEDL, H.; DUNLEY, J. E. Resistance to abamectin and reversion to susceptibility to fenbutatin oxide in spider mite (Acari: Tetranychidae) populations in the Pacific Northwest. **Journal of Economic Entomology**, v.91, n.2. p.352-360, 1998.

BELLINI, M.R.; ARAÚJO, R.V.; MALLAMINUT, J.C.C.; BERTI FILHO, E.; MORAES, G. J.DE. 2006. Perspectiva para o controle biológico do ácaro rajado em gérberas. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO DE ACAROLOGIA, 1., 2006. Viçosa. Resumos..., Viçosa:UFV, 2006. p.188.

BERENBAUM, M.R. Post genomic chemical ecology: from genetic code to ecological interactions. **Journal of Chemical Ecology**, v.28, p.873-96, 2002.

BONFOUR, M.; TANIGOSHI, L.K. Effect of temperature on development and demographic parameters of *Tetranychus urticae* and *Eotetranychus carpini borealis* (Acari: Tetranychidae). **Annual Entomologic Soc. America**, v.94, n.3, p. 400-401, 2001.

BORTOLOZZO, A. R.; SANHUEZA, R. M. V.; MELO, G. W. B.; KOVALESKI, A.; BERNARDI, J.; HOFFMANN, A.; BOTTON, M.; FREIRE, J. M.; BRAGHINI, L. C.; VARGAS, L.; CALEGARIO, F. F.; FERLA, N. J.; PINENT, S. M. J. **Produção de morangos no sistema semihidropônico**. Circular Técnica, Bento Gonçalves: 24p., 2007.

BOWMAN, H.M.; HOY, M.A. Molecular discrimination of phytoseiids associated with the red palm mite *Raoiella indica* (Acari: Tenuipalpidae) from Mauritius and South Florida. **Experimental and Applied Acarology**, v.57, p.395-407, 2012.

BROWN, T.M., BROGDON, W.G. Improved detection of insecticide resistance through conventional and molecular techniques. **Annual Review of Entomology**, v.32, p.145–162, 1987.

BUENO, V.H.P.; POLETTI, M. Progress with biological control and IPM strategies in protected cultivation in Brazil. **IOBC/WPRS Bulletin**, v.49, p.31-36, 2009.

CATTERALL, W.A. From ionic currents to molecular mechanisms: The structure and function of voltage-gated sodium channels. **Neuron**, v.26, p.13-25, 2000.

CHIAVEGATO, L. G.; MISCHAM, M. M. Efeito do ácaro *Tetranychus* (*T.*) *urticae* (KOCH, 1836) BOUDREUX; DOSSE, 1963 (Acari, Tetranychidae) na produção no morangueiro (*Fragaria* spp.) CV. **Científica**, v.9, p.257-266, 1981.

COLLINS, P.J. A new resistance to pyrethroids in *Tribolium castaneum* (Herbst). **Pesticide Science**, v.28, p.101-115, 1990.

COMPTON, C. C.; KEARNS, C. W. Improved control of Red Spider on greenhouse crops with sulfur and cyclohexylamine derivatives. **Journal of Economic Entomology**, v.30, n.3, p. 512-522, 1937.

CONYERS, C.M.; MACNICOLL, A.D.; PRICE, N.R. Purification and characterization of an esterase involved in resistance to organophosphorus insecticides in the saw-toothed grain

beetle, *Oryzaephilus surinamensis* (Coleoptera: Silvanidae). **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v.28, p.435-448, 1998.

CROFT, B.A. **Arthropod biological control agents and pesticides**. New York: Wiley Interscience, 1990. 723p.

CROFT, B.A.; JEPPSON, L.R. Comparative studies on four strains of *Typhlodromus occidentalis*. II. Laboratory toxicity of ten compounds common to apple pest control. **Journal of Economic Entomology**, v.63, p.1528-1531, 1970.

CROFT, B.A.; MONETTI, L.N.; PRATT, P.D. Are *Neoseiulus californicus* and *N. fallacis* (Acari: Phytoseiidae) similar type II selective predators of tetranychid mites? Comparisons of 17 traits and 2 predation types. **Environmental Entomology**, v.27, n.3, p.531-538, 1998.

DAVIES, T.G.E.; FIELD, L.M.; USHERWOOD, P.N.R.; WILLIAMSON, M.S. DDT, pyrethrins, pyrethroids and insect sodium channels. **IUBMB Life**, v.59, p.151-162, 2007.

EILENBERG, J.; HAJEK, A.; LOMER, C. Suggestions for unifying the terminology in biological control. **Biocontrol**, v.46, p.387-400, 2001.

ESTEVEZ FILHO, A. B.; OLIVEIRA, J. V. de; GONDIM JÚNIOR, M. G. C. Toxicidade de acaricidas sobre diferentes estágios de vida de *Tetranychus urticae* Koch (Acari: Tetranychidae) em mamoeiro. **BioAssay**, v.3, n.6, 2008. Disponível em: <<http://www.bioassay.org.br/articles/3.6/BA3.6.pdf>>.

FADINI, M. A. M.; ALVARENGA, D. Pragas do morangueiro. **Informe Agropecuário**, v.20, n.198, p.75-79, 1999.

FERGUSON-KOLMES, L. A.; SCOTT, J. G.; DENNEHY, T. J. Dicofol resistance in *Tetranychus urticae* (Acari: Tetranychidae): Cross-resistance and pharmacokinetics. **Journal of Economic Entomology**, v.84, p.41-48, 1991.

FEYEREISEN, R. Insect cytochrome P450. In: GILBERT, L.I.; LATROU, K.; GILL, S.S. (Ed.) **Comprehensive Molecular Insect Science**. Oxford: Elsevier, 2005. Vol.4, p. 1-77.

FFRENCH-CONSTANT, R. H. et al. "Why Are There So Few Resistance-associated mutations in insecticide target genes?" **Philosophical Transactions: Biological Sciences**, v.353, n.1376, p. 1685–1693. 1998, *JSTOR*, www.jstor.org/stable/56756.

FLEXNER, J. L.; WESTIGARD, P. H.; CROFT, B. A. Field reversion of organotin resistance in the twospotted spidermite (Acari: Tetranychidae) following relaxation of selection pressure. **Journal of Economic Entomology**, v.81, p.1516-1520, 1988.

FLORES-CANTILLANO, R.F.; MADAIL, J.C.M.; MATTOS, M.L.T. Mercado de alimentos: tendência mundial. **Informe Agropecuário**, v.22, n.213, p.79-84, 2001.

FOURNIER, D.; PRALAVORIO, M.; CUANY, A.; BERGE, J.B. Genetic analysis of methidathion resistance in *Phytoseiulus persimilis* (Acari: Phytoseiidae). **Journal of Economic Entomology**, v.81, n.4, p.1008-1013, 1988.

FUKUTO, T.R.; MALLIPUDI, N.M. Supression of metabolic resistance through chemical structure modification, p. 557-578. In: Georghiou, G.P.; Saito, T. (ed.). **Pest resistance to pesticides: challenges and prospects**. Plenum Press, New York, United States of America, 1983.

GARCIA, I. P. **Estudos com *Phytoseiulus macropilis* (Banks, 1905) (Acari: Phytoseiidae) para o manejo de *Tetranychus urticae* (Koch, 1836) (Acari: Tetranychidae) na cultura de morangueiro (*Fragaria spp.*)**. 1992. 64p. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Botucatu, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho". Botucatu, 1992

GARCIA, I.P.; CHIAVEGATO, L.G. Respostas funcional e reprodutiva de *Phytoseiulus macropilis* (Banks, 1905) (Acari: Phytoseiidae) a diferentes densidades de ovos de *Tetranychus urticae* (Koch, 1836) (Acari: Tetranychidae). **Científica**, v.25, p.35-43, 1997.

GEORGHIOU, G. P. Management of resistance in arthropods. In: GEORGHIOU, G. P.; SAITO, T. (Ed.) **Pest resistance to pesticides**. New York: Plenum, p. 769-792. 1983.

GEORGHIOU, G. P. The evolution of resistance to pesticides. **Annual Review of Ecology and Systematic**, v.3, p.133-168, 1972.

GEORGHIOU, G.P. & TAYLOR, C.E. Genetic and biological influences in the evolution of insecticide resistance. **Journal of Economic Entomology**, v.70, p.319-323, 1977.

GERSON, U.; SMILEY, R.L.; OCHOA, R. **Mites (Acari) for pest control**. Oxford: Blackwell Publishing, 2003. 538p.

- GIMÉNEZ-FERRER, R.M.; BISHOP, W.A.; ERB, B.L.; SCHEERENS, J.C. Hostpest relationships between the twospotted spider mite (Acari: Tetranychidae) and strawberry cultivars with differing levels of resistance. **Journal of Economic Entomology**, v.87, p.168-175, 1994.
- GONZÁLEZ-CABRERA, J.; DAVIES, T.G.E.; FIELD, L.M.; KENNEDY, P.J.; WILLIAMSON, M.S. An amino acid substitution (L925V) associated with resistance to pyrethroids in *Varroa destructor*. **PLoS ONE**, v.8, e82941, 2013.
- GRBIĆ, M.; Van LEEUWEN, T.; CLARK, R.M.; ROMBAUTS, S.; ROUZÉ, P.; GRBIĆ, V.; OSBORNE, E.J.; DERMAUW, W.; NGOC, P.C.T.; ORTEGO, F.; HERNÁNDEZ-CRESPO, P.; DIAZ, I.; MARTINEZ, M.; NAVAJAS, M.; et al. The genome of *Tetranychus urticae* reveals herbivorous pest adaptations. **Nature**, v.479, p.487-492, 2011.
- GUEDES, R.N.C.; KAMBHAMPATI, S.; DOVER, B.A.; ZHU, K.Y. Biochemical mechanisms of organophosphate resistance in *Rhyzopertha dominica* (Coleoptera: Bostrichidae) populations from the United State and Brazil. **Bulletin of Entomological Research**, v.87, p.581-586, 1997.
- HANCOCK, J. Microsatellites and other simple sequences: genomic context and mutational mechanisms. In: GOLDSTEIN, D. B.; SCHLÖTTERER C. (eds.) **Microsatellites: evolution and applications**. Oxford: University Press, 1999. p 1-9.
- HEADLEY, J.C.; HOY, M.A. Benefit cost analysis of an integrated management program for almonds. **Journal of Economic Entomology**, v.80, p.555-559-1987.
- HELLE, W.; SABELIS, M. W. (Ed.) **Spider mites: their biology, natural enemies and control**. Amsterdam, Elsevier, vol. 1A, 1985. 405 p.
- HEMINGWAY, J. The molecular basis of two contrasting metabolic mechanisms of insecticide resistance. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v.30, p.1009-1015, 2000.
- HERRON, G. A.; EDGE, V.; ROPHAIL, J. Clofentezine and hexythiazox resistance in *Tetranychus urticae* Koch in Australia. **Experimental and Applied Acarology**, v.17, p.433-440, 1993.

HERRON, G. A.; ROPHAIL, J. Genetics of hexythiazox resistance in two spotted spider mite, *Tetranychus urticae* Koch. **Experimental and Applied Acarology**, v.17, p.423-431, 1993.

HINOMOTO, N.; TODOKORO, Y.; HIGAKI, T. Population structure of the predatory mite *Neoseiulus womersleyi* in a tea field based on an analysis of microsatellite DNA markers. **Experimental and Applied Acarology**, v.53, p.1-15, 2011.

HODGES, R.J.; MEIK, J. Lethal and sublethal effects of permethrin on Tanzanian strains of *Tribolium castaneum* (Herbst), *Gnatocerus maxillosus* (F.) *Sitophilus oryzae* (L.) and *Sitophilus zeamais* Motschulsky. **Insect Science and Its Application**, v.7, p.533-537, 1986.

HOY, M.A. **Agricultural acarology**: Introduction to integrated mite management. Boca Raton, CRC Press, 410p., 2011.

HOY, M.A. Pesticide resistance in arthropod natural enemies: variability and selection responses. In: ROUSH, R.T.; TABASHNIK, B.E. (Ed.) **Pest resistance in arthropods**. New York: Chapman and Hall, 1990. p. 203-236.

HOY, M.A. Recent advances in genetics and genetic improvement of the Phytoseiidae. **Annual Review of Entomology**, v.30, p.345-370, 1985.

HOY, M.A. Transgenic arthropods for pest control: risks and realities. **Experimental and Applied Acarology**, v.24, p.463-495, 2000.

HUDSON, M.E. Sequencing breakthroughs for genomic ecology and evolutionary biology. **Molecular Ecology Resources**, v.8, n.1, p.3-17, 2008.

HUFFAKER, C.B.; KENNETT, C.E. Differential tolerance to parathion in two *Typhlodromus* predatory on cyclamen mite. **Journal of Economic Entomology**, v.46, p.707-708, 1953.

JAMES, D.G.; PRICE, T.S. Fecundity in twospotted spider mite (Acari: Tetranychidae) is Increased by Direct and Systemic Exposure to Imidacloprid. **Journal of Economic Entomology**, v.95 (4), p.729-732, 2002.

JANSEN J.P. Working Group "Pesticides and Beneficial Organisms". Proceedings of the meeting at Dubrovnik, Croatia, 2009. **IOBC/WPRS Bulletin**, v.55, 2010. 129p.

JEYAPRAKASH, A.; HOY, M.A. Mitochondrial 12S rRNA sequences used to design a molecular ladder assay to identify six commercially available phytoseiids (Acari: Phytoseiidae). **Biological Control**, v.25, n.2, p.136-142, 2002.

JEYAPRAKASH, A.; HOY, M.A. The nuclear genome of the phytoseiid *Metaseiulus occidentalis* (Acari: Phytoseiidae) is among the smallest known in arthropods? **Experimental and Applied Acarology**, v.47, p.263-273, 2009.

JOHANN, L.; SCHERER, A.; FERLA, N. J. Duração dos estádios imaturos de *Phytoseiulus macropilis* (Phytoseiidae) (Banks, 1905), alimentado com ácaro-rajado *Tetranychus urticae* Koch, 1836. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENTOMOLOGIA, 20, 2004. Gramado, RS. **Anais...** Gramado: Embrapa Uva e Vinho, 2004. p.175.

KANOUEH M., TIXIER M.S., OKASSA M., KREITER S. 2010. Phylogenetic and biogeographic analysis of the genus *Phytoseiulus* (Acari: Phytoseiidae). **Zoologica Scripta**, v.39, p.450-461.

KOCHER, T.D.; THOMAS, W.K.; MEYER, A.; EDWARDS, S.V.; PÄÄBO, S.; VILLABLANCA, F.X.; WILSON, A.C. Dynamics of mitochondrial DNA evolution in animals: amplification and sequencing with conserved primers. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.86, n.16, p. 6196-6200, 1989.

LEVIN, L.A. A review of methods for labeling and tracking marine invertebrate larvae. **Ophelia**, v.32, p.115-144, 1990.

LI, X.; SCHULER, A.; BERENBAUM, M. Molecular mechanisms of metabolic resistance to synthetic and natural xenobiotics. **Annual Review of Entomology**, v.52, p.231-53, 2007.

LI, X.; SCHULER, A.; BERENBAUM, M. Molecular mechanisms of metabolic resistance to synthetic and natural xenobiotics. **Annual Review of Entomology**, v.52, p.231-53, 2007.

LOCALI, E.C.; FREITAS-ASTÚA, J.; SOUZA, A.A.; TAKITA, M.A.; ASTÚA-MONGE, G.; ANTONIOLI, R.; KITAJIMA, E.W. & MACHADO, M.A. Development of a molecular tool for the diagnosis of leprosis a major threat to the citrus production in Americas. **Plant Diseases**, v.87, p.1317-1321, 2003.

LORINI, I.; BECKEL, H. S. Mecanismos de resistência das pragas de grãos armazenados. In: LORINI, I.; MIIKE, L. H.; VILDES, M. S. (Eds.). **Armazenagem de grãos**, IBG, Campinas, Brasil, 2002.

LORINI, I.; GALLEY, D.J. Relative effectiveness of topical, filter paper and grain applications of deltamethrin, and associated behaviour of *Rhyzopertha dominica* (F.) strains. **Journal of Stored Products Research**, v.34, p.377-383, 1998.

McMURTRY, J.A.; CROFT, B.A. Lyfe-styles of phytoseiid mites and their roles in biological control. **Annual Review of Entomology**. Stanford, v.42, p.291-321, 1997.

McMURTRY, J.A.; HUFFAKER, C.B.; VAN DEN VRIE, M.V. Ecology of tetranychid mites and their natural enemies: A review. I. Tetranychid enemies: their biological characters and the impact of spray. **Hilgardia**, Berkeley, v.40, n.11, p.331- 390, 1970.

McMURTRY, J.A.; SOURASSOU, N.F.; DEMITE, P.R. The Phytoseiidae (Acari: Mesostigmata) as biological control agents. p.133-149. In: CARRILLO, D.; MORAES, G.J.; PEÑA, J.E. (eds.). Prospects for biological control of plant feeding mites and other harmful organisms. **Progress in Biological Control**. v.19. Springer International Publishing, 2015.

MELANDER, A. L. Can insects become resistant to sprays? **Journal of Economic Entomology**, v.7, p.167-173, 1914.

MESSELINK, G. J.; BENNISON, J.; ALOMAR, O.; INGEGNO, B.L.; TAVELLA, L.; SHIPP, L.; PALEVSKY, E.; WACKERS, F. L. Approaches to conserving natural enemy populations in greenhouse crops: current methods and future prospects. **BioControl**, v.59, p.377-393, 2014.

MONTEIRO, L. B. Tolerância de populações de ovos de inverno e de verão de *Panonychus ulmi* Koch ao ovicida clofentezine, no sudeste e no sudoeste da França. **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, v.23, p.461-466, 1994.

MONTEIRO, L. B.; FAUVEL, G. Influence of three irrigation levels on the reproduction of the red mite *Panonychus ulmi* Koch (Acari: Tetranychidae) and on some biochemical characteristics of leaves of potted apple plants. **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, v. 25, p.13-19, 1996.

MONTEIRO, L.B. Perspectiva para o controle biológico de ácaros na cultura do mamoeiro. In: **Papaya Brasil**, Vitória: Incaperp, p.253-264, 2003.

MORAES, G. J. de. Controle biológico de ácaros fitófagos com predadores. In PARRA, J.R.P.; BOTELHO, P.S.M.; CORRÊA-FERREIRA, B.; BENTO, J. M. S. (Ed.). **Controle biológico no Brasil: Parasitóides e predadores**. São Paulo, Manole, 2002, p.225-237.

MORAES, G.J.; FLECHTMANN, C.H.W. **Manual de Acarologia**: Acarologia básica e ácaros de plantas cultivadas no Brasil. Ribeirão Preto, Editora Holos, 2008. 308p.

MORAES, G.J.; McMURTRY, J.A.; DENMARK, H.A.; CAMPOS, C.B. A revised catalog of the mite family Phytoseiidae. **Zootaxa**, v.434, p.1-494, 2004.

MOTOYAMA, N.; ROCK, G.C.; DAUTERMAN, W.C. Studies on the mechanism of azinphosmethyl resistance on the predaceous mite, *Neoseiulus fallacis* (T.) (Family: Phytoseiidae). **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v.1, p.205-215, 1971.

NARAHASHI, T. Nerve membrane ion channels as the target site of insecticides. **Mini-Reviews in Medicinal Chemistry**, v.2, p.419-432, 2002.

NASCIMENTO, A.R.B. do; FRESIA, P.; CÔNSOLI, F.L.; OMOTO, C. Comparative analysis of lufenuron-resistant and susceptible strains of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). **BMC Genomics**, v.16, p.985, 2015.

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

NAVAJAS, M.J.; THISTLEWOOD, H.M.A.; LAGNEL, J.; HUGHES, C. Microsatellite sequences are under-represented in two mite genomes. **Insect Molecular Biology**, v.7, p.249-256, 1998.

NAVIA, D.; DOMINGOS, C.A.; MENDONÇA, R.S.; FERRAGUT, F.; RODRIGUES, M.A.N.; de MORAIS, E.G.F.; TIXIER, M.-S.; GONDIM, M.G.C., Jr. Reproductive compatibility and genetic and morphometric variability among populations of the predatory mite, *Amblyseius largoensis* (Acari: Phytoseiidae), from Indian Ocean islands and the Americas. **Biological Control**, v. 72, p. 17–29, 2014.

NICASTRO, R.L.; SATO, M.E.; SILVA, M.Z. Milbemectin resistance in *Tetranychus urticae* (Acari: Tetranychidae): selection, stability and cross-resistance to abamectin. **Experimental and Applied Acarology**, v.50, n.3, p.231-241, 2010.

NICASTRO, R.L.; SATO, M.E.; ARTHUR, V.; SILVA, M.Z. Chlorfenapyr resistance in the spider mite *Tetranychus urticae*: stability, cross-resistance and monitoring of resistance.

Phytoparasitica, v.41, p.1-11, 2013.

NISHIMURA, S.; HINOMOTO, N.; TAKAFUJI, A. Isolation, characterization, inheritance and linkage of microsatellite markers in *Tetranychus kanzawai* (Acari: Tetranychidae).

Experimental and Applied Acarology, v.31, p.93-103, 2003.

NYONI, B.N.I.; GORMAN, K.; MZILAHOWA, T.; WILLIAMSON, M.S.; NAVAJAS, M.; FIELD, L.M.; BASS, C. Pyrethroid resistance in the tomato red spider mite, *Tetranychus evansi*, is associated with mutation of the para-type sodium channel. **Pest Management Science**, v.67, p.891-897, 2011

OKASSA M., TIXIER M.S., KREITER S. Morphological and molecular diagnostics of *Phytoseiulus persimilis* and *Phytoseiulus macropilis* (Acari: Phytoseiidae). **Experimental and Applied Acarology**, v.52, n.3, p.291-303, 2010.

OKASSA, M.; KREITER, S.; TIXIER, M.-S. Molecular identification of all life stages of a mite species (Mesostigmata: Phytoseiidae): *Typhlodromus (Typhlodromus) exhilaratus*.

Experimental and Applied Acarology, v.57, p.105-116, 2012.

OKASSA, M.; TIXIER, M-S.; CHEVAL, B.; KREITER, S. Molecular and morphological evidence for new species status within the genus *Euseius* (Acari: Phytoseiidae). **Canadian Journal of Zoology**, v.87, p.689-698, 2009.

OLIVEIRA, H.; JANSSEN, A.; PALLINI, A.; VENZON, M.; FADINI, M.; DUARTE, V.A. phytoseiidae predator from the tropics as potencial biological control agent for the spider mite *Tetranychus urticae* Koch (Acari: Tetranychidae). **Biological Control**, v.42, p.105-109, 2007.

OMOTO, C. Avanço na implementação de programas de manejo da resistência de pragas a pesticidas no Brasil. 2003. Disponível em: <<http://www.irac-br.org.br/arquivos/avancosimplprog.doc>>

OPPENORTH, F.J. Biochemistry and genetics of insecticide resistance. In: KERKUT, G.A.; GILBERT, L.I. (Ed.) **Comprehensive insect physiology, biochemistry and pharmacology**, v.12, p.731-773. Oxford: Pergamon, 1985.

O'REILLY, A.O.; KHAMBAY, B.P.S.; WILLIAMSON, M.S.; FIELD, L.M.; WALLACE, B.A.; DAVIES, T.G. Modelling insecticide-binding sites in the voltage-gated sodium channel. **Biochemical Journal**, v.396, p.255-263, 2006.

OSAKABE, M.; UESUGI, R.; GOKA, K. Evolutionary aspects of acaricide-resistance development in spider mites. **Psyche**, p.1-9, 2009. Article ID 947439. Disponível em: <http://www.hindawi.com/journals/psyche/2009/947439.html>.

PARRA, J.R.P. Criação massal de inimigos naturais, p.143-164. In: PARRA, J.R.P.; BOTELHO, P.S.M.; CORRÊA-FERREIRA, B.S.; BENTO, J.M.S. (eds.), **Controle biológico no Brasil: parasitóides e predadores**. Piracicaba, Ed. Manole, 2002. 609p.

PETRUSHOV, A. Z. Results of introduction into the URSS of a population of predaceous mite, *Metaseiulus occidentalis* (Acarina, Phytoseiidae), resistant to pesticides. **Zoologicheskii Zhurnal**, v.6, p.674-680, 1987.

POLETTI, M. **Integração das estratégias de controle químico e biológico para a conservação e liberação dos ácaros predadores *Neoseiulus californicus* (McGregor) e *Phytoseiulus macropilis* (Banks) (Acari: Phytoseiidae) em programas de manejo do ácaro rajado *Tetranychus urticae* Koch (Acari: Tetranychidae)**. 163p. Tese (Doutorado) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz/ Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.

POLETTI, M.; OMOTO, C. Resistência de inimigos naturais a pesticidas. **Revista Biotecnologia, Ciência e desenvolvimento**, v.30, p.16-26, 2003.

PRASAD, V. Biology of the predatory mite *Phytoseiulus macropilis* in Hawaii (Acarina: Phytoseiidae). **Annals of the Entomological Society of America**, v.60, p.905-908, 1967.

PRESNAIL, J.K.; HOY, M.A. Transmission of injected DNA sequences to multiple eggs of *Metaseiulus occidentalis* and *Amblyseius finlandicus* (Acari: Phytoseiidae) following maternal microinjection. **Experimental and Applied Acarology**, v.18, p.319-330, 1994.

QUEIROZ, M.C.V.; SATO, M.E. Pyrethroid resistance in *Phytoseiulus macropilis* (Acari: Phytoseiidae): cross-resistance, stability and effect of synergists. **Experimental and Applied Acarology**, v.68, n.1, p.71-82, 2016.

RASMY, A.H.; ELLAITHY, Y.M. Introduction of *Phytoseiulus persimilis* for twospotted spider mite control in greenhouses in Egypt (Acari: Phytoseiidae, Tetranychidae). **Entomophaga**, v.33, p.435-438, 1988.

READSHAW, J.L. Biological control of orchard mites in Australia with insecticide resistant predator. **Journal of the Australian Institute of Agricultural Science**, v.41, p.213-214, 1975.

RINKEVICH, F.D.; DU, Y.; DONG, K. Diversity and convergence of sodium channel mutations involved in resistance to pyrethroids. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v.106, p.93-100, 2013.

RONDERICK, G.K.; NAVAJAS, M. Genes in a new environments: genetics and evolution in biological control. **Nature Review Genetics**, v.11, p.889-99, 2003.

SANTOS, V.V.; TIXIER, M.S. Which molecular markers for assessing which taxonomic level? The case study of the mite family Phytoseiidae (Acari: Mesostigmata). **Cladistics**, v.33, n.3, p.251-267, 2016.

SATO, M. E.; SILVA, M. Z.; GONÇALVES, L.R.; SOUZA FILHO, M.F.; RAGA, A. Toxicidade diferencial de agroquímicos a *Neoseiulus californicus* (McGregor) (Acari: Phytoseiidae) e *Tetranychus urticae* Koch (Acari: Tetranychidae) em morangueiro. **Neotropical Entomology**, v.31, n.3, p.449-456, 2002.

SATO, M.E.; MIYATA, T.; KAWAI, A.; NAKANO, O. Methidathion resistance mechanisms in *Amblyseius womersleyi* Schicha (Acari: Phytoseiidae). **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v.69, p.1-12., 2001.

SATO, M.E.; MIYATA, T.; SILVA, M. da; RAGA, A.; SOUZA FILHO, M.F. Selections for fenpyroximate resistance and susceptibility, and inheritance, cross- resistance and stability of fenpyroximate resistance in *Tetranychus urticae* Koch (Acari: Tetranychidae). **Applied Entomology and Zoology**, v.39, p.293-302, 2004.

SATO, M.E.; PASSEROTTI, C.M.; TAKEMATSU, A.P.; SOUZA FILHO, M.F.; POTENZA, M.R.; SIVIERI, A.P. Resistência de *Tetranychus urticae* (Koch, 1836) a acaricidas, em pessegueiro (*Prunus persica* (L.) Batsch) em Paranapanema e Jundiaí, SP. **Arquivos do Instituto Biológico**, v.67, p.117-123, 2000.

SATO, M.E.; SILVA, M. Z.; CANGANI, K.G.; RAGA, A. Seleções para resistência e suscetibilidade, detecção e monitoramento da resistência de *Tetranychus urticae* Koch (Acari: Tetranychidae) ao acaricida clorfenapir. **Bragantia**, v.66, n.1, p.89-95, 2007b.

SATO, M.E.; SILVA, M.Z.; RAGA, A.; SOUZA FILHO, M.F. Abamectin resistance in *Tetranychus urticae* Koch (Acari: Tetranychidae): selection, cross-resistance and stability of resistance. **Neotropical Entomology**, v.34, n.6, p.991-997, 2005.

SATO, M.E.; SILVA, M.Z.; SILVA, R.B.; SOUZA FILHO, M.F.; RAGA, A. Monitoramento da resistência de *Tetranychus urticae* Koch (Acari: Tetranychidae) a abamectin e fenpyroximate em diversas culturas no Estado de São Paulo. **Arquivos do Instituto Biológico**, v.76, p.217-223, 2009.

SATO, M.E.; SILVA, M.Z.; SOUZA FILHO, M.F.; MATIOLI, A.L.; RAGA, A. Management of *Tetranychus urticae* (Acari: Tetranychidae) in strawberry fields with *Neoseiulus californicus* (Acari: Phytoseiidae) and acaricides. **Experimental and Applied Acarology**, v.42, n.2, p.107-120, 2007a.

SATO, M.E.; SUPPLY FILHO, N.; SOUZA FILHO, M.F.; TAKEMATSU, A.P. Resistência do ácaro-rajado *Tetranychus urticae* (Koch, 1836) (Acari: Tetranychidae) a diversos acaricidas em morangueiro (*Fragaria* sp.) nos municípios de Atibaia-SP e Piedade-SP. **Ecossistema**, v.19, p.40-46, 1994.

SCHLÖTTERER, C. The evolution of molecular markers - just a matter of fashion? **Nature Reviews Genetics**, v.5, p.63-69, 2004.

SCHULTEN G.G.M.; van de KLASHORST, G.; RUSSEL, V.M. Resistance of *Phytoseiulus persimilis* A.H. (Acari: Phytoseiidae) to some insecticides. **Zeitschrift für Angewandte Entomologie**, v.80, p.337-341, 1976.

SCOTT, J.G. Cytochromes P450 and insecticide resistance. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v.29, p.757-77, 1999.

SCRIBNER, K.T.; PEARCE, J.M. Microsatellites: Evolutionary and methodological background and empirical applications at individual, population and phylogenetic levels. In:

BACKER, A.J. (ed.) **Molecular Methods in Ecology**, p.235-273. Blackwell Science, London, 2000.

SHIH, C.I.; POE, S.L.; CROMROY, H.L. Biology and predation of *Phytoseiulus macropilis* on *Tetranychus urticae*. **Florida Entomologist**, v.62, p.48-53, 1979.

SILVA, F.R.; VASCONCELOS, G.J.N.; GONDIM JUNIOR, M.G.C.; OLIVEIRA, J.V. Exigências térmicas e tabela de fertilidade de *Phytoseiulus macropilis* (Banks) (Acari: Phytoseiidae). **Neotropical Entomology**, v.34, n.2, p.291-296, 2005.

SMISSAERT, H. R. Cholinesterase inhibition in spider mites susceptible and resistant to organophosphate. **Science**, v.143, p.129-131, 1964.

SMITH, L.M.; SUMMERS, F.M. The structure and biology of the red spider predator, "*Hypoaspis macropilis*" (Banks). **Proceedings of the Entomological Society of Washington**, v.51, p.209-218, 1949.

SODERLUND, D.M. Molecular mechanisms of pyrethroid insecticide neurotoxicity: recent advances. **Archives of Toxicology**, v. 86, p.165-181, 2012.

SODERLUND, D.M.; BLOOMQUIST, J.R. Neurotoxic actions of pyrethroid insecticides. **Annual Review of Entomology**, v.34, p.77-96, 1989.

SOUZA FILHO, M.F.; SUPPLY FILHO, N.; SATO, M.E.; TAKMATSU, A.P. Suscetibilidade do ácaro-rajado proveniente de Pilar do Sul, SP, a diversos acaricidas. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.29, p.1187-1192, 1994.

STARK, J.D.; TANIGOSHI, L.; BOUNFOUR, M.; ANTONELLI, A. Reproductive potential: its influence on the susceptibility of a species to pesticides. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v.37, p.273-279, 1997.

STUMPF, N.; NAUEN, R. Cross-resistance, inheritance, and biochemistry of mitochondrial electron transport inhibitor-acaricide resistance in *Tetranychus urticae* (Acari: Tetranychidae). **Journal of Economic Entomology**, v.94, p.1577-1583, 2001.

TAMAI, M.A; LOPES, R.B; ALVES, S.B. **Manejo de pragas na floricultura**. 2000. Disponível em: <<http://www.biologico.sp.gov.br/rifib/IIIRifib/66-70.pdf>>

TIXIER, M.S.; KREITER, S. AUGER, P. Colonization of vineyards by phytoseiid mites: their dispersal patterns in the plot and their fate. **Experimental and Applied Acarology**, v.24, p.191-211, 2000.

TIXIER, M.S.; KREITER, S.; AUGER, P.; WEBER, M. Colonization of Languedoc vineyards by phytoseiid mites (Acari: Phytoseiidae): influence of wind and crop environment. **Experimental and Applied Acarology**, v.22, p.523-542, 1998.

TIXIER, M.S.; KREITER, S.; CROFT, B.A.; CHEVAL, B. *Kampimodromus aberrans* (Acari: Phytoseiidae) from USA: morphological and molecular assessment of its identity. **Bulletin of Entomological Research**, v.98, p.125-134, 2008.

TIXIER, M.S.; OTTO, J.; KREITER, S.; VICENTE, V.; BEARD, J. Is *Neoseiulus wearnei* the *Neoseiulus californicus* of Australia? **Experimental and Applied Acarology**, v.62, p.267-277, 2014.

UESUGI, R.; OSAKABE, M. Isolation and characterization of microsatellite loci in the two-spotted spider mite, *Tetranychus urticae* (Acari: Tetranychidae). **Molecular Ecology Notes**, v.7, p.290-292, 2007.

Van LEEUWEN, T.; TIRRY, L. Esterase-mediated bifenthrin resistance in a multiresistant strain of the two-spotted spider mite, *Tetranychus urticae*. **Pest Management Science**, v.63, p.150-156, 2007.

Van LEEUWEN, T.; VONTAS, J.; TSAGKARAKOU, A.; DERMAUW, W.; TIRRY, L. Acaricide resistance mechanisms in the two-spotted spider mite *Tetranychus urticae* and other important Acari: A review. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v.40, n.8, p.563-572, 2010.

VERONEZ, B.; ROCHA, L.C.D.; FREITAS, J.A.; SENA, C.A.; PORTO, L.M.A.; SILVA, S. Seletividade de produtos fitossanitários utilizados na cultura do morangueiro a *Phytoseiulus macropilis* (Banks) (Acari: Phytoseiidae) em condições de laboratório. **Revista Agrogeoambiental**, v.1, p.70-81, 2009.

VIEIRA, M.R.; CORREA, L.S.; CASTRO, T.M.M.G.; SILVA, L.F.S.; MONTEVERDE, M.S. Efeito do cultivo do mamoeiro (*Carica papaya* L.) em ambiente protegido sobre a ocorrência de ácaros fitófagos e moscas-brancas. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.26, n.3, p.441-445, 2004.

WATANABE, M.A.; MORAES, G.J.; GASTALDO JR., I.; NICOLELLA, G. Controle biológico do ácaro rajado com ácaros predadores fitoseídeos (Acari: Tetranychidae, Phytoseiidae) em culturas de pepino e morango. **Scientia Agricola**, v.51, p.75-81, 1994.

WHITE, J.C.; LIBURD, O.E. Effects of soil moisture and temperature on reproduction and development of twospotted spider mites *Tetranychus urticae* Koch (Acari: Tetranychidae) in strawberries. **Journal of Economic Entomology**, v.98, n.1, p.154-158, 2005.

WILLIAMSON, M.S.; MARTÍNEZ-TORRES D.; HICK, C.A.; DEVONSHIRE, A.L. Identification of mutations in the housefly para-type sodium channel gene associated with knockdown resistance (kdr) to pyrethroid insecticides. **Molecular and General Genetics**, v.252, p.51-60, 1996.

YANINEK, J. S. Continental dispersal of the cassava green mite, an exotic pest in Africa, and implacations for biological control. **Experimental and Applied Acarology**, v.4, p.211-224, 1988.

YU, S.J.; NGUYEN, S.N. Insecticide susceptibility and detoxication enzyme activities in permethrin-selected diamondback moths. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v.56, p.69-77, 1996.

ZHANG, Z.Q. **Mites in greenhouse**: identification, biology and control. Cambridge: CABI Publishing, 2003. 244 p.

ZHAO, H.; YI, X.; DENG, Y.; HU, M.; ZHONG, G.; WANG, P. Resistance to fenpropathrin, chlorpyrifos and abamectin in different populations of *Amblyseius longispinosus* (Acari: Phytoseiidae) from vegetable crops in South China. **Biological Control**, v.67, p.61-65, 2013.

CAPÍTULO 2 – ESTUDOS DE ESTABELECIMENTO E DISPERSÃO DE UMA LINHAGEM DE *Phytoseiulus macropilis* RESISTENTE AO PIRETROIDE FENPROPATHRIN

RESUMO

O ácaro predador da espécie *Phytoseiulus macropilis* Banks (Acari: Phytoseiidae) é considerado um importante inimigo natural do ácaro-rajado, *Tetranychus urticae* Koch, em diversos cultivos agrícolas. O presente estudo teve por objetivo avaliar os padrões de estabelecimento e dispersão de ácaros predadores (*P. macropilis*) resistentes a piretroides, liberados em cultivos comerciais de morango, no estado de São Paulo. Foram instalados experimentos de liberação e recaptura em três áreas de cultivo de morangos, com características distintas. Um cultivo orgânico em área aberta, um cultivo em estufa com uso de controle químico e outro, também em estufa, sem uso de controle químico. Os resultados indicam elevada capacidade de dispersão dos ácaros predadores da linhagem estudada nos canteiros de morango infestados por ácaro-rajado. Em todas as áreas de morango avaliadas, houve influência significativa de *P. macropilis* sobre as densidades populacionais de *T. urticae*, observando-se porcentagens de redução populacional do ácaro-praga de até 99,8% nos cultivos avaliados.

2.1 INTRODUÇÃO

Os artrópodes fornecem muitos serviços ecossistêmicos valiosos, incluindo o controle natural de pragas agrícolas (DAILY, 1997). Somente nos Estados Unidos, o valor anual desses serviços de controle biológico foi estimado em US\$ 4,5 a US\$ 17 bilhões (PIMENTEL et al., 1997; LOSEY; VAUGHAN, 2006), e esse valor ainda pode ser muito maior para a agricultura de pequena escala nos países em desenvolvimento. Com o início da era dos pesticidas, os inseticidas químicos substituíram a ação dos inimigos naturais que ocorrem naturalmente. Ao deslocar os agentes de controle biológico natural dos campos agrícolas, os pesticidas rapidamente separaram a produção agrícola da ecologia (ROBERTSON; SWINTON, 2005).

O controle biológico de artrópodes-praga tem uma longa tradição nos cultivos em estufa. (MESSELINK, 2014). A área em que é usado e o número de agentes de controle

biológico disponíveis ainda estão em expansão (PILKINGTON et al., 2010; VAN LENTEREN, 2012). Os programas de controle biológico em estufas geralmente são baseados em lançamentos periódicos de inimigos naturais, também chamados de controle biológico aumentativo (VAN LENTEREN, 2012). Embora o controle biológico tenha provado ser bem-sucedido em muitos cultivos protegidos, a eficácia pode ser insuficiente em outras culturas, como plantas ornamentais (HEINZ et al., 2004).

O estabelecimento precário e a persistência de inimigos naturais em certas culturas podem ser um dos principais problemas no controle biológico de pragas, em parte devido aos tipos de inimigos naturais utilizados. A seleção de inimigos naturais para o controle biológico aumentativo é tradicionalmente focada em inimigos naturais especialistas que são liberados para obter o controle rápido das pragas (VAN LENTEREN; WOETS, 1988). Embora esses especialistas estejam bem adaptados ao hospedeiro e possam ser muito eficazes, geralmente desaparecem quando as densidades de presas são reduzidas. Como são usadas principalmente para obter controle rápido de pragas específicas, sua eficácia requer alta quantidade e qualidade de inimigos naturais liberados e monitoramento intensivo para garantir o tempo exato da intervenção.

Demonstrou-se experimentalmente que as liberações de ácaros predadores fitoseideos reduzem a densidade de ácaros em muitas culturas perenes (MCMURTRY, 1982; HOY et al., 1982; FLAHERTY et al., 1985; HELLE; SABELIS, 1985; CROFT; MACRAE, 1992b; NYROP et al., 1998) e algumas culturas anuais em linha, como algodão (OSMAN; ZOHDI, 1976; TIJERINA-CHAVEZ, 1991) e milho de campo (PICKETT; GILSTRAP, 1986; PICKETT et al., 1987). As tentativas de melhorar o controle biológico aumentativo se concentraram principalmente em fatores como seleção de agentes de controle, controle de qualidade, técnicas de criação em massa, métodos de liberação e eficácia da supressão de pragas-alvo (VAN DRIESCHE; BELLOWS, 1996). Embora todos esses fatores sejam críticos para o uso bem-sucedido do controle biológico aumentativo, houve muito pouco exame de como inimigos naturais liberados podem interagir com inimigos naturais que ocorrem naturalmente. Há um reconhecimento crescente de que interações complexas de várias espécies entre inimigos naturais podem ser importantes no controle biológico (ROSENHEIM et al., 1995; SUNDERLAND et al., 1997; ROSENHEIM, 1998). Em uma safra anual como o algodão, predadores generalistas costumavam ser abundantes (VAN DEN BOSCH; HAGEN, 1966). Como resultado, as interações predador-predador podem ser comuns e podem ser um fator-chave que influencia o estabelecimento de inimigos naturais liberados.

Phytoseiulus macropilis Banks (Acari: Phytoseiidae) é um predador especialista, efetivo no controle de *Tetranychus urticae* Koch (Acari: Tetranychidae), um artrópode herbívoro, polífago e cosmopolita, alimentando-se de mais de 1.100 espécies de plantas pertencentes a mais de 140 famílias diferentes (ZHANG, 2003; GRBIĆ et al., 2011). No entanto, seu emprego de no manejo de ácaros fitófagos em sistemas de produção comercial de plantas ornamentais e hortaliças pode ser prejudicado pelo uso de pesticidas para o controle de pragas e doenças. A utilização de linhagens do ácaro predador resistentes a produtos de largo espectro de ação (ex.: piretroides) pode favorecer a conservação em cultivos onde o agricultor realiza aplicações eventuais de pesticidas contra outros artrópodes-praga (ex.: lagartas, tripes, cochonilhas, moscas-brancas). É necessário, porém, considerar as mudanças espaciais e temporais em seus padrões de distribuição e movimento no campo (HINOMOTO et al., 2011).

O presente estudo teve por objetivo avaliar os padrões de estabelecimento e dispersão de predadores (*P. macropilis*) resistentes a piretroides, liberados no campo. Visando estudar a dispersão dos ácaros predadores resistentes a piretróides em diferentes ambientes, foram instalados experimentos de liberação e recaptura em três áreas de cultivo de morangos no estado de São Paulo, com características distintas. Um cultivo orgânico em área aberta, um cultivo em estufa com uso de controle químico e outro, também em estufa, sem uso de controle químico.

2.2 MATERIAL E MÉTODOS

2.2.1 Criação de manutenção da linhagem resistente de *P. macropilis*

A população original do predador *P. macropilis* resistente a piretroides (R) foi coletada em uma lavoura comercial de morango (*Fragaria* spp.) no município de Socorro (22°35'S, 46°31'W), SP, em setembro de 2010, e foi mantida no Laboratório de Acarologia do Instituto Biológico (Campinas, SP), sob pressão de seleção para resistência a fenpropathrin.

A linhagem R, selecionada mostrou-se 5.300 vezes mais resistente a fenpropathrin que a linhagem S de referência (QUEIROZ; SATO, 2016).

2.2.2 Liberação e recuperação dos predadores

2.2.2.1 Cultivo orgânico de morango em Monte Alegre do Sul, SP (Área 1)

O primeiro experimento de liberação e recuperação foi conduzido em outubro de 2017, na área mostrada na Figura 7.



Figura 7. Cultivo orgânico de morango em Socorro, SP (Área 1).

Os procedimentos foram adaptados a partir de Navajas et al. (2001). Foi usada a linhagem R de *P. macropilis* mantida no Laboratório de Acarologia do Instituto Biológico.

O experimento de campo foi instalado conforme o croqui apresentado na Figura 8.

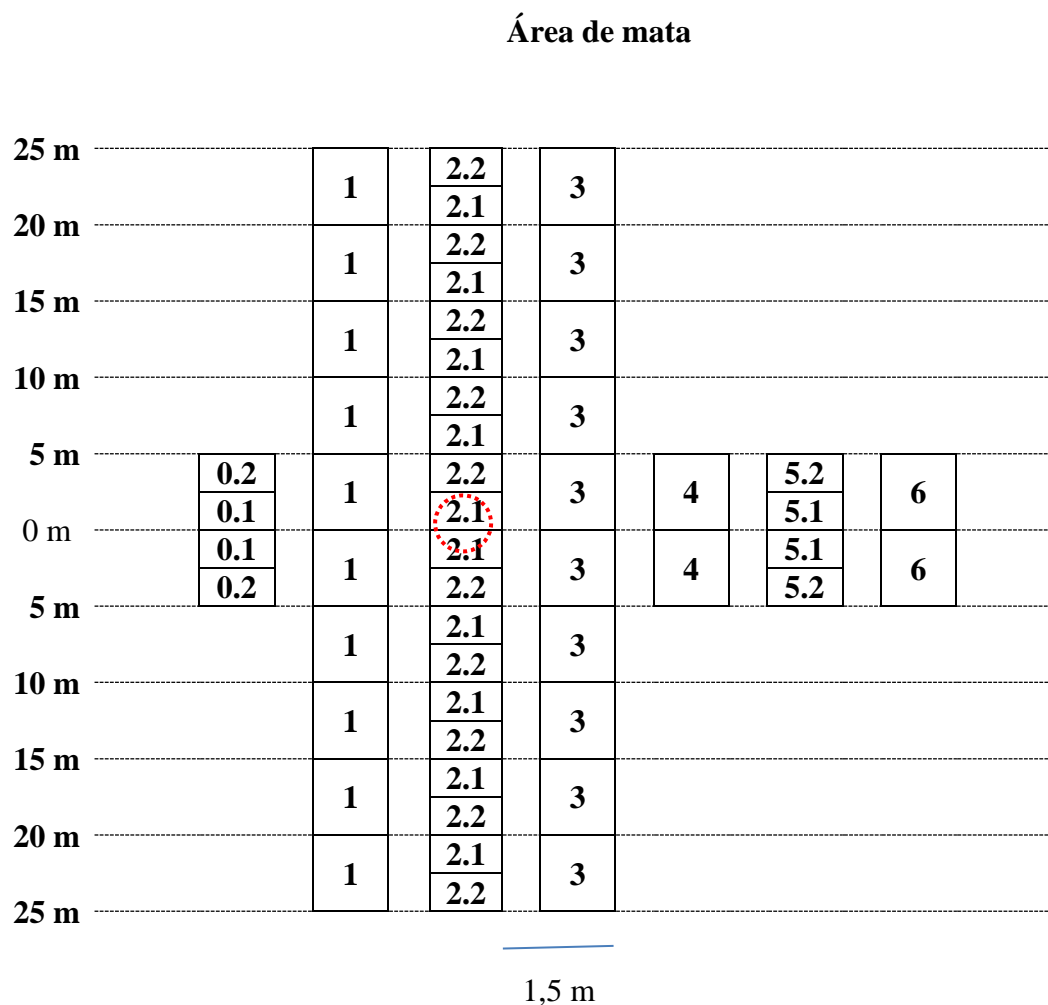


Figura 8. Croqui da área experimental piloto em cultivo de morango. A liberação dos predadores foi feita no ponto 0.0 (círculo vermelho).

A área experimental foi demarcada, tendo sido marcados pontos de amostragem a cada 5 metros do local de liberação dos predadores (ponto zero). Foram marcados pontos de coleta (a cada 5 m) nos dois sentidos, Norte e Sul, a partir do ponto zero, ao longo do canteiro central de morangueiro. O ponto de coleta mais próximo ficava a 5 metros e o mais distante a 25 metros do ponto zero. Foram marcados, também, pontos de coleta nos dois canteiros laterais.

Foram coletadas quatro amostras de cinco folíolos em cada um dos 16 pontos marcados no campo, para uma avaliação prévia, antes da liberação dos predadores. Os ácaros foram contados e conservados em álcool 95°GL, conforme descrito por Milligan (1998).

Em seguida 3.000 fêmeas adultas de *P. macropilis* foram liberadas no ponto zero (parte central da área amostrada) (Figura 9). O número de fêmeas a serem liberadas foi estimado em função das dimensões da área



Figura 9. Local da liberação dos ácaros predadores no experimento no cultivo de morango da Área 1.

Foram feitas coletas de 10 folíolos em cada ponto amostral para avaliar a dispersão dos predadores, nas seguintes datas: 26 de outubro, 4 e 10 de novembro de 2017. Os ácaros pragas e predadores foram contados e conservados em álcool 95° GL, conforme descrito por Milligan (1998).

2.2.2.2 Cultivo de morango em estufa com controle químico em Socorro, SP (Área 2)

O segundo experimento foi conduzido em um cultivo de morango em estufa, com uso de pesticidas para controle de ácaro rajado, em Socorro, SP (Figura 10), em outubro de 2018.



Figura 10. Cultivo de morango em estufa com controle químico em Socorro, SP (Área 2).

O produtor informou que usava habitualmente grande quantidade de pesticidas para controle de ácaro-rajado e não estava conseguindo controlar a praga. Informou, também, que foi feita uma aplicação do acaricida propargito 30 dias antes da coleta e liberação. Após esse período, nada mais foi aplicado.

O propargito é um acaricida específico, com ação ovicida, larvicida e adulticida, sendo seletivo para inimigos naturais e ácaros predadores (SATO et al., 2007).

O delineamento experimental foi feito em três canteiros, marcados com 15 estacas e foram liberados aproximadamente 150 predadores no ponto central de cada um dos três canteiros.

No dia 17 de outubro foram coletadas amostras de 10 folíolos em 12 pontos para uma avaliação inicial, antes da liberação dos predadores. Os ácaros foram contados e conservados em álcool 95°GL, conforme descrito por Milligan (1998).

Foram feitas coletas para avaliar o estabelecimento e dispersão, nas seguintes datas: 24 e 31 de outubro, 14 e 29 de novembro e 26 de dezembro.

2.2.2.3 Cultivo de morango em estufa sem controle químico em Pinhalzinho, SP (Área3)

O terceiro experimento foi conduzido em cultivo de morango protegido, em Pinhalzinho, SP (Figura 11), em outubro de 2018.



Figura 11. Cultivo de morango em estufa sem controle químico em Pinhalzinho, SP (Área 3).

O produtor informou que não usa habitualmente pesticidas para controle de ácaro rajado. O controle era feito com aplicações de *Beauveria bassiana*. Porém, devido à elevada infestação de ácaro rajado, foi feita uma aplicação do acaricida abamectina, 30 dias antes do início do experimento. O produtor informou, também, que fez uma aplicação de *B. bassiana* uma semana após o uso do acaricida. *B. bassiana* é um fungo entomopatogênico utilizado em programas de manejo integrado de pragas.

A área experimental foi constituída de cinco canteiros de morango, marcados com 25 estacas (a cada 5m) e foram liberados aproximadamente 150 predadores no ponto central de cada um dos canteiros.

No dia 17 de outubro foram coletadas amostras de 10 folíolos em cada ponto de amostragem, para uma avaliação inicial, antes da liberação dos predadores. Os ácaros foram contados e conservados em álcool 95°GL conforme descrito por Milligan (1998).

Foram feitas três outras coletas, para avaliar o estabelecimento e dispersão dos predadores, nas seguintes datas: 24 de outubro, 29 de novembro e 26 de dezembro.

O experimento foi conduzido na estufa 3. Porém a propriedade conta com 4 estufas próximas entre si e o produtor costuma levar folhas de uma estufa para outra. No dia 29/11 foram feitas 2 coletas, uma na estufa 3 e outra na estufa 4, uma vez que o produtor informou a ocorrência de *T. urticae* na estufa 4.

2.3 RESULTADOS

2.3.1 Cultivo orgânico de morango em Monte Alegre do Sul, SP (Área 1)

O experimento de liberação de *P. macropilis* em cultivo orgânico de morango, em Monte Alegre do Sul, SP, em 2017, indicou rápida dispersão do ácaro predador sobre os canteiros de morango, tendo sido encontradas formas ativas e ovos do ácaro predador a distâncias de até 25 metros do local de soltura, no sexto dia após a liberação das fêmeas adultas de *P. macropilis* no campo, não havendo diferenças significativas ($F = 0,544$, g.l. = 5, 35; $p = 0,707$) nas densidades populacionais do ácaro predador para as diferentes distâncias avaliadas (aos 6 dias) (Figura 12).

Nos primeiros seis dias após a liberação de *P. macropilis*, correspondente ao período de estabelecimento e multiplicação dos ácaros predadores sobre as plantas de morango, observou-se um crescimento populacional do ácaro-praga. No entanto, aos 15 dias após a liberação, observou-se uma redução significativa ($t = 15,1$; g.l. = 39; $p < 0,0001$) (de aproximadamente 97,5%) na população de *T. urticae* (em relação à amostragem anterior), considerando-se as diferentes distâncias avaliadas (0 a 25 m).

Observou-se correlação significativa ($r = 0,49$; g.l. = 78; $p < 0,0001$) entre as densidades populacionais de *P. macropilis* e *T. urticae*, nos diferentes locais de coleta, após a liberação do ácaro predador, indicando influência significativa do predador na variação populacional do ácaro-praga nos canteiros de morango.

Na última avaliação realizada, aos 15 dias após a liberação, observou-se que a população de *P. macropilis* praticamente desapareceu dos canteiros liberados, provavelmente, devido à drástica redução na infestação de ácaro-rajado, com registros de densidades populacionais inferiores a 0,8 ácaro por folíolo, nesta avaliação.

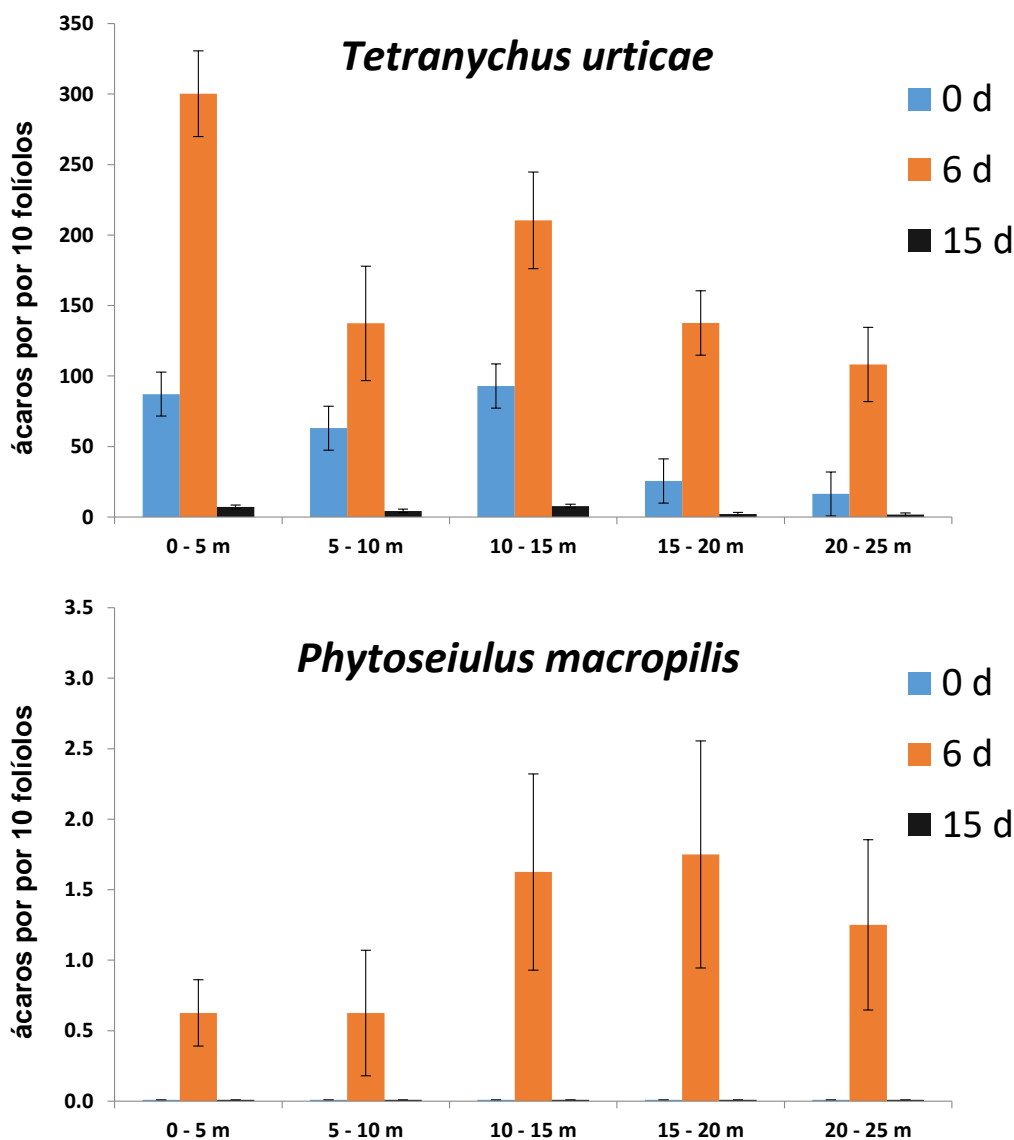


Figura 12. Densidades populacionais do ácaro-rajado (*Tetranychus urticae*) e do ácaro predador *Phytoseiulus macropilis* em cultivo orgânico de morango. Monte Alegre do Sul, SP, outubro a novembro de 2017.

2.3.2 Cultivo de morango em estufa com controle químico (Socorro, SP)

Os resultados do experimento de liberação de *P. macropilis* em cultivo de morango em Socorro, em 2018, indicam efetividade de controle de ácaro-rajado, que caíram de níveis em torno de 24 formas ativas e 55 ovos de *T. urticae* por folíolo, no início do experimento,

para densidades populacionais iguais ou inferiores a 0,5 formas ativas ou ovos por folíolo, a partir dos 28 dias após a liberação dos ácaros predadores (Figura 13).

Diferindo da pesquisa anterior, realizada em Monte Alegre do Sul, em 2017, neste experimento já havia presença de ácaros predadores da espécie *P. macropilis*, em baixas densidades populacionais (até 0,67 ácaro predador por folíolo), no momento da liberação de *P. macropilis*, nos canteiros de morango estudados. Esse fato indica possível contribuição dos ácaros predadores “nativos” sobre a flutuação populacional de *T. urticae* ao longo do experimento.

Da mesma forma que no experimento anterior, observaram-se correlações significativas entre as densidades populacionais do ácaro predador e os níveis de infestação ovos ($r = 0,469$; g.l. = 58; $p = 0,002$) e formas ativas ($r = 0,586$; g.l. = 58; $p < 0,0001$) de *T. urticae* sobre as folhas de morangueiro, indicando influência de *P. macropilis* na redução populacional do ácaro-praga.

As maiores densidades populacionais de *P. macropilis* (até 2,1 ácaros predadores por folíolo) foram observadas aos 14 dias após a liberação do ácaro predador nos canteiros de morango, com redução acentuada na população do predador (para densidades inferiores a 0,1 ácaro predador por folíolo) na avaliação seguinte (28 dias), em consequência da quase eliminação da população de ácaro-rajado no cultivo de morango após o período de duas semanas, a partir da liberação do ácaro predador.

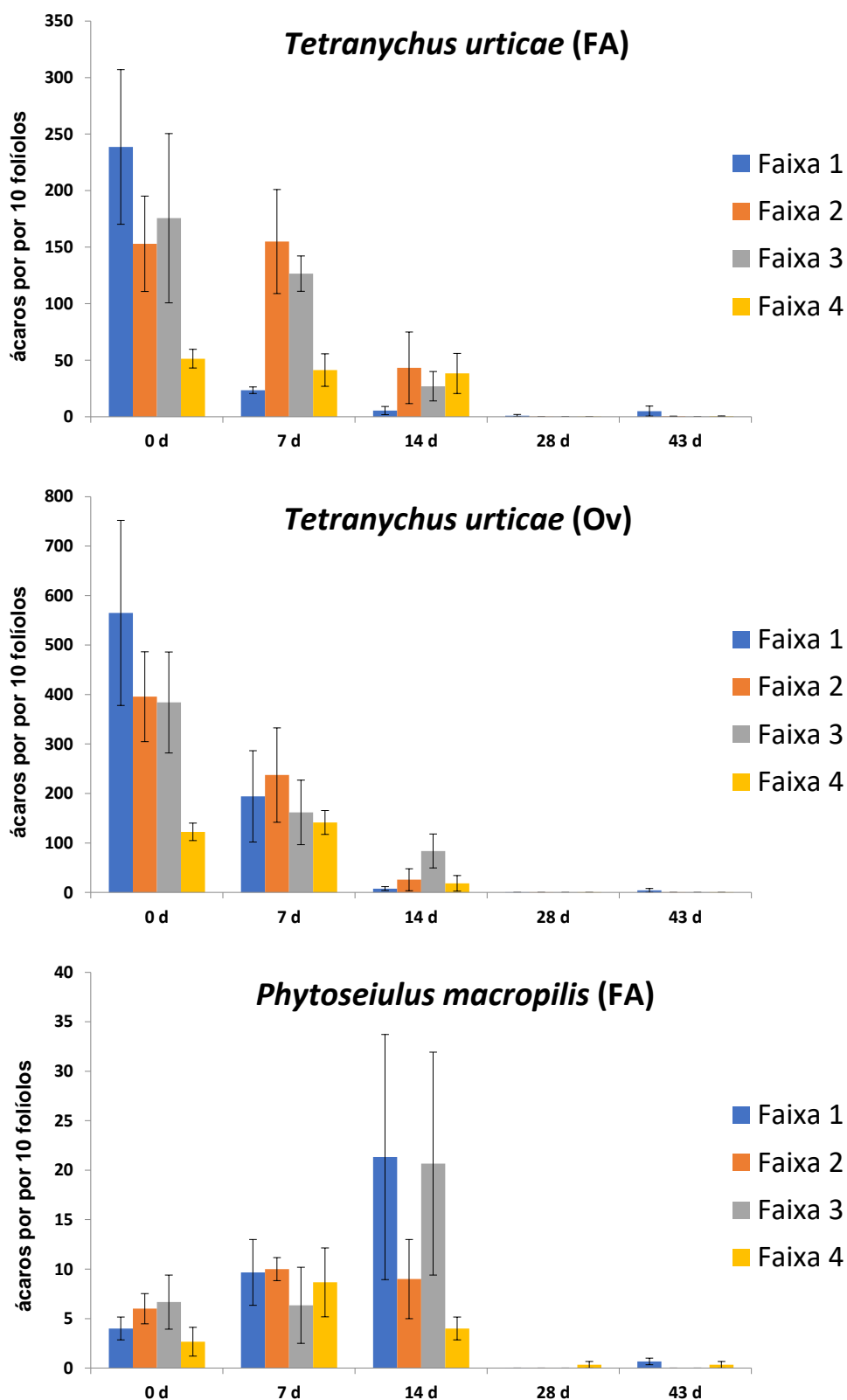


Figura 13. Densidades populacionais de formas ativas (FA) e ovos (Ov) do ácaro-rajado (*Tetranychus urticae*) e do ácaro predador *Phytoseiulus macropilis* em cultivo de morango, em estufa com uso de controle químico. Distâncias do ponto de liberação de *P.macropilis*: 0 a 5 m (Faixas 2 e 3); 5 a 10 m (Faixas 1 e 4). Socorro, SP, outubro e novembro de 2018.

2.3.3 Cultivo de morango em estufa sem controle químico (Pinhalzinho, SP)

No experimento conduzido em morangueiro em estufa, em Pinhalzinho, em 2018, observou-se também a presença de alguns ácaros da espécie *P. macropilis* no momento da liberação do ácaro predador (*P. macropilis*). Diferindo dos dois experimentos anteriores, as densidades populacionais de ácaro-rajado, assim como de *P. macropilis*, eram muito baixas ($\leq 0,02$ ácaros por folíolo) no início do experimento (0 d = data de liberação dos predadores) (Figura 14).

Devido à baixa infestação de ácaro-rajado no cultivo de morango, não houve o estabelecimento dos ácaros predadores liberados sobre os canteiros de morango, conforme constatado na avaliação realizada aos 14 dias após a liberação, na qual, nenhum ácaro *P. macropilis* foi encontrado nas amostras de folíolos coletadas.

Uma nova infestação de *T. urticae* foi detectada somente aos 43 dias, com densidades populacionais iguais ou inferiores a 0,42 ácaros por folíolo. Na avaliação realizada aos 70 dias, verificou-se um aumento significativo na infestação do ácaro-praga chegando a 6,5 ácaros por folíolo na área de maior infestação (Faixa 2).

Com o reaparecimento dos ácaros-rajados, houve um retorno dos ácaros predadores da espécie *P. macropilis*, que foram detectados inicialmente na faixa 4 dos canteiros de morango, aos 43 dias. O pico populacional (até 1,1 ácaros predadores por folíolo) de *P. macropilis* foi observado aos 70 dias, coincidindo com o período de maior infestação de ácaro-rajado. Na faixa 4, onde foram observados os primeiros ácaros predadores que retornaram à área do experimento, não foi constada a presença de ácaro-rajado na avaliação realizada aos 70 dias.

Seguindo a mesma tendência dos experimentos anteriores, observaram-se correlações significativas entre as densidades populacionais do ácaro predador e os níveis de infestação de formas ativas ($r = 0,675$; g.l. = 123; $p < 0,0001$) de *T. urticae* sobre as folhas de morangueiro, indicando influência significativa de *P. macropilis* na flutuação populacional do ácaro-praga.

No experimento realizado em Pinhalzinho, assim como nos dois outros experimentos, foram detectados ácaros predadores (Phytoseiidae) de outras espécies em baixas densidades populacionais ($\leq 0,05$ ácaro predador por folíolo), principalmente nos períodos de maior infestação de *T. urticae*, que também podem ter contribuído para a redução populacional do ácaro-rajado ou para dificultar o estabelecimento de *P. macropilis* nas áreas de liberação.

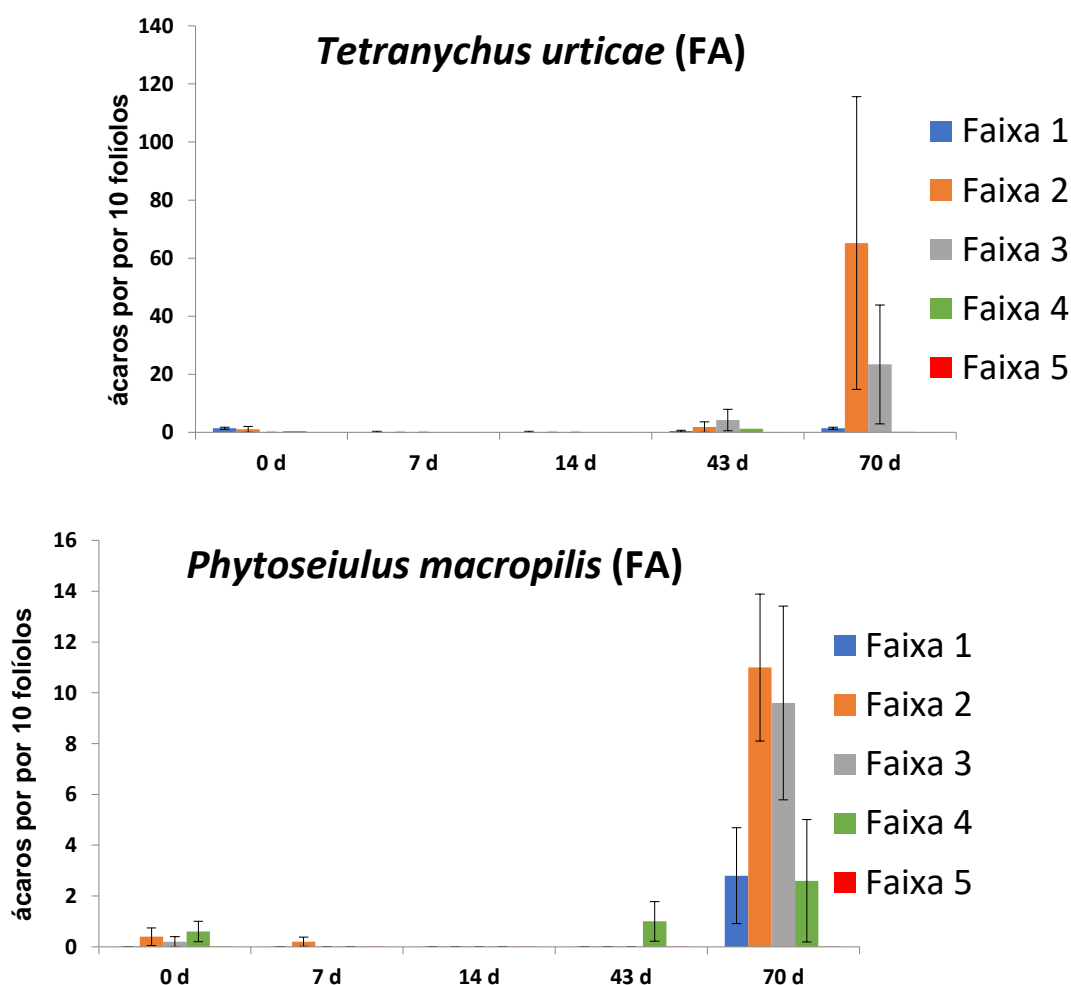


Figura 14. Densidades populacionais de formas ativas (FA) e ovos (Ov) do ácaro-rajado (*Tetranychus urticae*) e do ácaro predador *Phytoseiulus macropilis* em cultivo de morango, em estufa sem uso de controle químico. Distâncias do ponto de liberação de *P. macropilis*: 0 a 5 m (Faixa 3) (parte central dos canteiros); 5 a 10 m (Faixas 2 e 4); 10 a 15 m (Faixas 1 e 5). Pinhalzinho, SP, outubro a dezembro de 2018.

2.4 DISCUSSÃO

Nos três experimentos realizados em cultivos comerciais de morango no estado de São Paulo, observou-se nítida influência de *P. macropilis* na regulação da população do ácaro-rajado, indicando que esta espécie é um importante inimigo natural do ácaro-praga nesta cultura. A importância de *P. macropilis* para o controle biológico de *T. urticae* já foi reportada por diversos autores para morangueiro e outras culturas no Brasil (FADINI et al.,

2004; FERLA et al., 2007; POLETTI et al., 2007; SATO et al. 2007; SCHLESENER et al., 2013).

No primeiro experimento, realizado em Monte Alegre do Sul, em 2017, ficou evidente a elevada capacidade de dispersão de *P. macropilis* sobre os canteiros de morango, que em menos de uma semana se distribuíram por todo o canteiro de 50 m de comprimento, avançando para os canteiros laterais. A alta capacidade de dispersão de outra espécie do gênero *Phytoseiulus* (*P. persimilis*) também foi reportada por Takafuji (1977). O autor menciona que a dispersão do ácaro predador se torna mais intensa em condições de baixas densidades populacionais do ácaro-praga.

No último experimento, realizado em Pinhalzinho, observou-se um desaparecimento inicial dos ácaros predadores, devido à baixa infestação de *T. urticae* no cultivo de morango. Nesse caso, os predadores provavelmente migraram para outras áreas, na busca por alimento (TAKAFUJI, 1977). Aos 43 dias, quando foi detectada novamente a presença dos ácaros predadores (*P. macropilis*) no cultivo de morango, é provável que os ácaros predadores encontrados sejam de uma população diferente da liberada no início do experimento. No entanto, parte dos ácaros predadores liberados pode ter permanecido nas áreas próximas ao local de liberação, podendo retornar aos canteiros de morango, com o aumento populacional do ácaro-rajado. Nesse aspecto, com o uso de marcadores moleculares seria possível compreender melhor a dinâmica da dispersão e a estrutura das populações dos ácaros predadores no campo (HINOMOTO et al., 2011).

Apesar da baixa densidade populacional das outras espécies de ácaros predadores encontrados nas áreas de morango onde foram realizadas as liberações de *P. macropilis*, é possível que os ácaros predadores nativos tenham contribuído para a dispersão ou redução populacional deste predador nos canteiros avaliados de morango. Há evidências substanciais de que predadores generalistas podem ter impactos significativos sobre os ácaros fitoseídeos. A influência (direta ou indireta) do ataque de outras espécies de ácaros predadores sobre os ácaros fitoseídeos foi estudada em experimentos conduzidos em laboratório (GILLESPIE; QUIRING, 1992, CLOUTIER; JOHNSON, 1993; CROFT, 1996, CROFT et al., 1996, MACRAE; CROFT, 1996, WITTMANN; LEATHER, 1997, SCHAUSBERGER; CROFT, 2000), estufa (RAMAKERS, 1993, BRODSGAARD; ENKEGAARD, 1997, SCHAUSBERGER; WALZER, 2001) e campo (CROFT; MACRAE, 1992a, 1992b, 1993; CROFT, 1994, WALDE et al., 1997). Croft e MacRae (1992a) mostraram que a predação pelo ácaro predador generalista *Zetzellia mali* (Ewing) (Acari: Stigmaeidae) geralmente deslocava as populações do ácaro predador *Galendromus occidentalis* (Nesbitt), o que

algumas vezes levou a aumentos nas populações de ácaros fitófagos. Os ácaros fitoseídeos podem ser especialmente suscetíveis à predação por insetos predadores porque são relativamente pequenos em comparação com os insetos (POLIS et al., 1989), mas não há publicações de estudos de campo examinando o impacto de insetos predadores sobre ácaros fitoseídeos.

2.5 CONCLUSÕES

Os ácaros predadores, da linhagem de *P. macropilis* resistente a piretroides, apresentam elevada capacidade de dispersão nos canteiros de morango, contribuindo para a redução populacional de *T. urticae* após sua liberação no campo.

2.6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BRODSGAARD, H. F.; ENKEGAARD, A. Interactions among polyphagous anthocorid bugs used for thrips control and other beneficials in multi-species biological pest management systems. **Recent Research Developments in Entomology**, v.1, p.153- 160, 1997.
- CLOUTIER, C.; JOHNSON, S. G. Predation by *Orius tristicolor* (Hemipteran: Anthocoridae) on *Phytoseiulus persimilis* (Acarina: Phytoseiidae): testing for compatibility between biocontrol agents. **Environmental Entomology**, v.22, p. 477- 482, 1993.
- CROFT, B. A. Biological control of apple mites by a phytoseiid mite complex and *Zetzellia mali* (Acari: Stigmaeidae): Long-term effects and impact of azinphosmethyl on colonization by *Amblyseius andersoni* (Acari: Phytoseiidae). **Environmental Entomology**, v.23, p. 1317-1325, 1994.
- CROFT, B. A.; MAC RAE, I. V. Persistence of *Typhlodromus pyri* and *Metaseiulus occidentalis* (Acari: Phytoseiidae) on apple after inoculative release and competition with *Zetzellia mali* (Acari: Stigmaeidae). **Environmental Entomology**, v.21, p.1168-1177, 1992a.
- CROFT, B. A.; MAC RAE, I. V. Biological control of apple mites by mixed populations of *Metaseiulus occidentalis* (Nesbitt) and *Typhlodromus pyri* Scheuten (Acari: Phytoseiidae). **Environmental Entomology**, v.21, p.202-209, 1992b.

CROFT, B. A.; MAC RAE I. V. Biological control of apple mites: impact of *Zetzellia mali* (Acari: Stigmaeidae) on *Typhlodromus pyri* and *Metaseiulus occidentalis* (Acari: Phytoseiidae). **Environmental Entomology**, v.22, p.865-873, 1993.

CROFT, B. A.; CROFT, M. B. Intra- and interspecific predation among adult female phytoseiid mites (Acari: Phytoseiidae): effects on survival and reproduction. **Environmental Entomology**, v.25, p.853-858, 1996.

CROFT, B. A.; Kim, S. S.; Kim, D. I. Intra- and interspecific predation on four life stage groups by the adult females of *Metaseiulus occidentalis*, *Typhlodromus pyri*, *Neoseiulus fallacis* and *Amblyseius andersoni*. **Experimental and Applied Acarology**, v.20, p.435-444, 1996.

DAILY, G.C. **Nature's services**: societal dependence on natural ecosystems. Island, Washington, DC, 1997.

FADINI, M. A. M.; PALLINI, A.; VENZON, M. Controle de ácaros em sistemas de produção integrada de morango. **Ciência Rural**, v.34, n.4, p.1271-1277, 2004.

FERLA, N.J.; MARCHETTI, M.M.; GONÇALVES, D. Ácaros predadores (Acari) associados à cultura do morango (*Fragaria* sp., Rosaceae) e plantas próximas no Estado do Rio Grande do Sul. **Biota Neotropica**, v. 7, n. 2, p. 1-8, 2007.

FLAHERTY, D.L.; WILSON, L.T.; STERN, V.M.; KIDO, H. Biological control in San Joaquin Valley vineyards, pp. 501-520. In: HOY, M.A.; HERZOG, D.C. [eds.] **Biological control in agricultural IPM systems**. Academic, Orlando, FL. 1985.

GERBEN, J.; MESSELINK, J. B.; ALOMAR, O.; INGEGNO, B.L.; TAVELLA, L.; SHIPP, L.; PALEVSKY, E.; WACKERS, F. L. Approaches to conserving natural enemy populations in greenhouse crops: current methods and future prospects. **BioControl**, v.59, p.377-393, 2014.

GILLESPIE, D. R.; QUIRING, D. J. M. Competition between *Orius tristicolor* (White) (Hemipteran: Anthrocoridae) and *Amblyseius cucumeris* (Oudemans) (Acari: Phytoseiidae) feeding on *Frankliniella occidentalis* (Pergande) (Thysanoptera: Thripidae). **The Canadian Entomologist**, v.124, p.1123-1128, 1992.

GRBIĆ, M.; Van LEEUWEN, T.; CLARK, R.M.; ROMBAUTS, S.; ROUZÉ, P.; GRBIĆ, V.; OSBORNE, E.J.; DERMAUW, W.; NGOC, P.C.T.; ORTEGO, F.; HERNÁNDEZ-CRESPO,

P.; DIAZ, I.; MARTINEZ, M.; NAVAJAS, M.; et al. The genome of *Tetranychus urticae* reveals herbivorous pest adaptations. **Nature**, v.479, p.487-492, 2011.

HEINZ, K.M., Van DRIESCHE, R.G.; PARELLA, M.P. **Biocontrol in protected culture**. Ball Publishing, Batavia, Illinois, USA, 2004.

HELLE, W.; SABELIS, M.W. **World crop pests: spider mites their biology, natural enemies and control**, vol. 2b. Elsevier Publishers B.V., Amsterdam, The Netherlands, 1985.

HINOMOTO, N.; TODOKORO, Y.; HIGAKI, T. Population structure of the predatory mite *Neoseiulus womersleyi* in a tea field based on an analysis of microsatellite DNA markers. **Experimental and Applied Acarology**, v.53, p.1-15, 2011.

HOY, M. A. Aerial dispersal and field efficacy of a genetically improved strain of the spider mite predator *Metaseiulus occidentalis*. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v.32, p.205-212, 1982.

LOSEY, J. E.; VAUGHAN, M. The economic values of ecological services provided by insects. **BioScience**, v.56, p.311-323, 2006.

MAC RAE, I. V.; CROFT, B. A. Differential impact of egg predation by *Zetzellia mali* (Acari: Stigmaeidae) on *Metaseiulus occidentalis* and *Typhlodromus pyri* (Acari: Phytoseiidae). **Experimental and Applied Acarology**, v.20, p.143-154, 1996.

McMURTRY, J.A. The use of phytoseiids for biological control: progress and future prospects, p.23-48. In: HOY, M.A. [ed.] **Recent advances in knowledge of the phytoseiidae**. University of California Press, Berkeley, CA. 1982.

MILLIGAN, B.G. Total DNA isolation. p.29-64. In: HOELZEL, A.R. (ed.). **Molecular genetic analysis of populations**. A Practical Approach. Oxford University Press, 1998.

NAVAJAS, M.; THISTLEWOOD, H.; LAGNEL, J.; MARSHALL, D.; TSAGKARAKOU, A. and PASTEUR, N. Field releases of the predatory mite *Neoseiulus fallacis* (Acari: Phytoseiidae) in Canada, monitored by pyrethroid resistance and allozyme markers. **Biological Control**, v.20, p.191-198, 2001.

NYROP, J.; ENGLISH-LOEB, G.; RODA, A. Conservation biological control of spider mites in perennial cropping systems, p.307-333. In: BARBOSA, P. [ed.] **Conservation of natural enemies of pest species**. Academic Press, San Diego, CA, 1998.

OSMAN, A.A.; ZOHDI, G. Suppression of the spider mites on cotton with mass releases of *Amblyseius gossipi* (El Badry). **Zeitschrift für Angewandte Entomologie**, v.81, p.245-248, 1976.

PICKETT, C. H.; GILSTRAP, F. E. Inoculative releases of phytoseiids (Acari) for the biological control of spider mites (Acari: Tetranychidae) in corn. **Environmental Entomology**, v.15, p.790-794, 1986.

PICKETT, C. H.; GILSTRAP, F. E.; MORRISON, R. K.; BOUSE, L. F. Release of predatory mites (Acari: Phytoseiidae) by aircraft for the biological control of spider mites (Acari: Tetranychidae) infesting corn. **Journal of Economic Entomology**, v.80, p.906-910, 1987.

PILKINGTON, L.J.; MESSELINK, G.; VAN LENTEREN, J.C.; LE MOTTEE, K. “Protected biological control” biological pest management in the greenhouse industry. **Biological Control**, v.52, p.216–220, 2010.

PIMENTEL, D.; WILSON, C.; McCULLUM, C.; HUANG, R.; DWEN, P.; FLACK, J.; et al. Economic and environmental benefits of biodiversity. **BioScience**, v.47, p.747–757, 1997.

POLETTI, M.; MAIA, A.H.N.; OMOTO, C. Toxicity of neonicotinoid insecticides to *Neoseiulus californicus* and *Phytoseiulus macropilis* (Acari: Phytoseiidae) and their impact on functional response to *Tetranychus urticae* (Acari: Tetranychidae). **Biological Control**, v.40, p.30-36, 2007.

POLIS, G. A.; MYERS, C. A.; HOLT, R. D. The ecology and evolution of intraguild predation: potential competitors that eat each other. **Annual Review of Ecology and Systematics**, v.2, p.297-330, 1989.

QUEIROZ, M.C.V.; SATO, M.E. Pyrethroid resistance in *Phytoseiulus macropilis* (Acari: Phytoseiidae): cross-resistance, stability and effect of synergists. **Experimental and Applied Acarology**, v.68, n.1, p.71-82, 2016. DOI 10.1007/s10493-015-9984-2.

RAMAKERS, P. M. J. Coexistence of two thrips predators, the anthocorid *Orius insidiosus* and the phytoseiid *Amblyseius cucumeris* on sweet pepper. **Bulletin OILB/SROP** v.16, p.133-136, 1993.

ROBERTSON, G. P.; SWINTON, S. M. Reconciling agricultural productivity and environmental integrity: a grand challenge for agriculture. **Frontiers in Ecology and the Environment**, v.3, p.38–46, 2005.

ROSENHEIM, J. A. Higher-order predators and the regulation of insect herbivore populations. **Annual Review of Entomology**, v.43, p.421-447, 1998.

ROSENHEIM, J. A.; KAYA, H. K.; EHLER, L. E.; MARIOS, J. J.; JAFFEE, B. A. Intraguild predation among biological-control agents: theory and evidence. **Biological Control**, v.5, p.303-335, 1995.

SATO, M.E.; SILVA, M.Z. da; SOUZA FILHO, M.F.; MATIOLI, A.L.; RAGA, A. Management of *Tetranychus urticae* (Acari: Tetranychidae) in strawberry fields with *Neoseiulus californicus* (Acari: Phytoseiidae) and acaricides. **Experimental and Applied Acarology**, v. 42, p. 107-120, 2007.

SCHAUSBERGER, P.; WALZER, A. Combined versus single species release of predaceous mites: predator - predator interactions and pest suppression. **Biological Control**, v.20, p.269-278, 2001.

SCHAUSBERGER, P.; Croft, B. A. Cannibalism and intraguild predation among phytoseiid mites: are aggressiveness and prey preference related to diet specialization? **Experimental and Applied Acarology**, 24: 709-725, 2000.

SCHLESNER, D.C.H.; DUARTE, A.F.; GUERRERO, M.F.C.; CUNHA, U.S.; NAVA, D.E. Efeitos do nim sobre *Tetranychus urticae* Koch (Acari: Tetranychidae) e os predadores *Phytoseiulus macropilis* (Banks) e *Neoseiulus californicus* (Mcgregor) (Acari: Phytoseiidae). **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.35, n.1, p.059-066, 2013.

SUNDERLAND, K. D., AXELSEN, J. A., DROMPH, K.; FREIER, B.; HEMPTINNE, J. L.; HOLST, N. H.; MOLS, P.J.M.; PETERSEN, M. K; POWELL, W. ; RUGGLE, P.; TRILTSCH, H.; WINDER, L. Pest control by a community of natural enemies. **Acta Jutlandica**, v.72, p.271-326, 1997.

TIJERINA-CHAVEZ, A. D. Biological control of spider mites (Acari: Tetranychidae) on cotton through inoculative releases of predatory mites *Metaseiulus occidentalis* and *Amblyseius californicus* (Acari: Phytoseiidae) in the San Joaquin Valley of California. Ph. D. dissertation, University of California, Davis, CA, 1991.

VAN DEN BOSCH, R.; HAGEN, K. S. Predaceous and parasitic arthropods in California cotton fields. **California Agricultural Experiment Station Bulletin** 820, Agricultural Experiment Station, Berkeley, 1966.

VAN DRIESCHE, R.G.; BELLOW, T.S. **Biological control**. Chapman & Hall, Inc., New York, 1996.

VAN LENTEREN, J. C. The state of commercial augmentative biological control: plenty of natural enemies, but a frustrating lack of uptake. **BioControl**, v.57, p.1–20, 2012.

VAN LENTEREN, J. C.; WOETS, J. Biological and integrated pest control in greenhouses. **Annual Review of Entomology**, v.33, p.239-269, 1988.

WALDE, S. J.; HARDMAN, J. M.; MAGAGULA, C. N. Direct and indirect species interactions influencing within-season dynamics of apple rust mite, *Aculus schlechtendali* (Acari: Eriophyidae). **Experimental and Applied Acarology**, v.21, p.587-614, 1997.

WITTMANN, E. J.; LEATHER, S. R. Compatibility of *Orius laevigatus* Fieber (Hemiptera: Anthocoridae) with *Neoseiulus* (*Amblyseius*) *cucumeris* Oudemans (Acari: Phytoseiidae) and *Iphiseius* (*Amblyseius*) *degenerans* Berlese (Acari: Phytoseiidae) in the biological control of *Frankliniella occidentalis* Pergande (Thysanoptera: Thripidae). **Experimental and Applied Acarology**, v.21, p.523-538, 1997.

ZHANG, Z.Q. **Mites in greenhouse**: identification, biology and control. Cambridge: CABI Publishing, 2003. 244 p.

CAPÍTULO 3 – DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE MARCADORES MOLECULARES MICROSSATÉLITES PARA O ÁCARO PREDADOR *Phytoseiulus macropilis* E TRANSFERABILIDADE¹

RESUMO

Ácaros fitoseídeos são eficientes predadores de ácaros e pequenos insetos-praga. A utilização de linhagens de ácaros predadores resistentes a compostos de largo espectro de ação (ex.: piretroides) pode viabilizar o uso desses inimigos naturais para o controle biológico em cultivos onde o agricultor realiza aplicações eventuais de pesticidas contra artrópodes-praga. O entendimento da dispersão e padrão de distribuição dos ácaros fitoseídeos é essencial para promover a conservação desses inimigos naturais e dar suporte ao seu uso em controle biológico. Estudos genéticos populacionais usando marcadores moleculares como microsatélites provaram ser extremamente informativos para abordar questões sobre estrutura populacional e padrões de dispersão dos ácaros predadores. O objetivo desse trabalho foi desenvolver marcadores microsatélites específicos para uma linhagem do ácaro predador *Phytoseiulus macropilis* (Banks) (Acari: Phytoseiidae) resistente ao piretroide fenpropathrin, visando estudos de dispersão em campo. O DNA genômico de 260 indivíduos foi extraído com o kit Wizard (Promega) e utilizado para a construção da biblioteca genômica enriquecida com microsatélites, com uso sondas biotiniladas (CT)₈ e (GT)₈. Clones positivos, aqueles que incluíam a inserção com o microsatélite, foram selecionados via meio de cultura contendo ampicilina e β-galactosidase. De um total de 26 pares de primers sintetizados, 24 mostraram padrões de amplificação compatíveis com os tamanhos esperados para os fragmentos. O polimorfismo dos 24 novos locos de microsatélites foi testado em três populações de *P. macropilis* e sete amplificações foram bem sucedidas. Foram obtidas amplificações cruzadas com sucesso nas espécies *Phytoseiulus persimilis* Athias-Henriot, *Amblyseius swirskii* Athias-Henriot e *Proprioseiopsis* sp. (Acari: Phytoseiidae). Os marcadores moleculares obtidos serão os primeiros desenvolvidos para *P. macropilis* e poderão ser utilizados no estudo genético populacional dessa e de outras espécies do mesmo gênero e também de gêneros próximos.

¹QUEIROZ, M.C.V.; OLIVEIRA, F.A.de; SOUZA, A.P. de; SATO, M.E. Development of microsatellite markers for the predatory mite *Phytoseiulus macropilis* (ACARI: PHYTOSEIIDAE) and cross-amplification. **Experimental & Applied Acarology**, v. 83, p. 1-12, 2021.

3.1 INTRODUÇÃO

Os ácaros Phytoseiidae são predadores eficientes de ácaros e pequenos insetos (GERSON et al., 2003). Algumas espécies são comercializadas em todo o mundo para fins de controle biológico. Entre essas espécies, duas pertencem ao gênero *Phytoseiulus*: *Phytoseiulus macropilis* Banks e *Phytoseiulus persimilis* Athias-Henriot. Ambas as espécies são predadores especializados (McMURTRY et al., 2013); elas atacam com eficiência *Tetranychus urticae* Koch (Acari: Tetranychidae), que é uma espécie polífaga e cosmopolita, alimentando-se e causando danos a mais de 1.100 espécies de plantas pertencentes a mais de 140 famílias (ZHANG, 2003; GRBI et al., 2011). Outro fitoseideo, *Amblyseius swirskii*, é considerado generalista, com capacidade de atacar uma grande variedade de pragas-alvo, incluindo moscas-brancas e tripes (CROFT et al., 2004).

O ácaro predador *P. macropilis* possui atributos desejáveis para programas de controle biológico, como ciclo de vida mais curto comparado ao *T. urticae* (PRASAD, 1967; FADINI et al. 2004), alta taxa de predação em casa de vegetação e capacidade de controlar populações de ácaros no campo, mesmo quando liberado quando a praga ocorre em altas densidades populacionais da praga (OLIVEIRA et al., 2009). No entanto, um dos obstáculos ao uso de ácaros predadores no controle biológico de ácaros-praga são os efeitos nocivos de pesticidas usados no controle de pragas agrícolas, como insetos, ácaros e patógenos (SATO et al., 2002). Uma estratégia para minimizar os efeitos negativos da aplicação de produtos em ácaros predadores é a liberação de populações resistentes (HOY, 1985).

Porém, para preservar melhor os inimigos naturais das pragas agrícolas, é necessário considerar as mudanças espaciais e temporais em seus padrões de distribuição e movimento no campo. Infelizmente, na prática, é muito difícil observar direta e continuamente a dispersão de pequenos organismos, como os ácaros predadores, por gerações, embora esforços tenham sido feitos para estimar seus movimentos (HOY et al., 1985; TIXIER et al., 1998; 2000; BARBAR et al., 2006). Alternativamente, estimar o fluxo gênico usando marcadores genéticos pode fornecer informações sobre estrutura populacional e padrões de dispersão de ácaros predadores (HINOMOTO, 2011). No campo, a importância das características particulares de cada população de inimigo natural estabelecida pode ser avaliada. Introduções de espécimes de diferentes origens ou de colônias de laboratório selecionadas para diferentes características, como resistência a inseticidas, podem ser examinadas após a introdução para determinar quais fenótipos ou genótipos prevaleceram (RONDERICK; NAVAJAS, 2003). Entre os diferentes marcadores moleculares usados nos

estudos de diferenciação populacional, os microssatélites (repetições de sequência simples - SSRs) surgiram como uma poderosa ferramenta genética para responder a perguntas sobre dinâmica populacional.

Os microssatélites são definidos como fragmentos curtos de DNA, com aproximadamente 100 pares de bases (bp) que contêm padrões de 2-6 bp repetidos juntos. Durante a replicação do DNA, unidades repetidas são adicionadas ou perdidas do microssatélite, causando rápida evolução dessas regiões. Geralmente, há alta variabilidade no número de repetições em um determinado loco. Isso disponibiliza um grande número de alelos por loco de microssatélite para análise populacional (NAVAJAS; FENTO, 2000). Seus altos níveis de polimorfismo os tornam um marcador adequado para o estudo da variação intra e interpopulacional. Marcadores microssatélites foram desenvolvidos para várias espécies de ácaros (BAILLY et al., 2004; NAVAJAS et al., 1998; NISHIMURA et al., 2003; OSAKABE et al., 2000; UESUGI; OSAKABE, 2007). Porém, há um número limitado de marcadores para Acari (ABERCROMBIE et al., 2009; HINOMOTO et al., 2011). Hinomoto et al. (2011) desenvolveram marcadores moleculares microssatélites para *Neoseiulus womersleyi* (Schicha) e utilizaram essa ferramenta para investigar a estrutura genética dessa população de ácaros em um campo experimental de chá. Até então, esses marcadores não tinham sido aplicados a ácaros fitoseídeos no contexto de controle biológico conservador.

O objetivo deste estudo foi desenvolver marcadores microssatélites específicos para o ácaro predador *P. macropilis*, visando aprimorar os estudos de dispersão em campo e sobre a estrutura genética das populações de *P. macropilis*, o que pode auxiliar nos programas de manejo de *T. urticae*. Além disso, esses novos microssatélites podem ser úteis em outras espécies de ácaros predadores Phytoseiidae, como *P. persimilis* e *A. swirskii*. Marcadores moleculares, como microssatélites, podem nos ajudar a entender as relações entre os ácaros que ocorrem em um agroecossistema específico. Isso nos permitiria desenvolver estratégias de controle mais robustas contra os ácaros fitófagos no futuro.

3.2 MATERIAL E MÉTODOS

3.2.1 Ácaros e extração de DNA

Para o isolamento dos locos microssatélites, foram utilizados adultos de uma linhagem de *P. macropilis* resistente à fenpropatrina (R). Os espécimes foram coletados de uma colônia mantida no Laboratório de Acarologia do Instituto Biológico, em Campinas, SP, sob pressão de seleção com piretroides. Esta colônia foi iniciada em 2010 a partir de espécimes coletados

em plantas de morango (*Fragaria* spp.) de um cultivo comercial com uso intensivo de fenpropatrina para controle de pragas. O DNA genômico foi extraído do corpo inteiro de 260 fêmeas adultas usando o Kit de Purificação de DNA Genômico Wizard® (Promega).

Para validar os marcadores microssatélites, além da população R já mencionada, foram utilizadas mais duas populações; uma suscetível (S), coletada em plantas de chuchu, e um suscetível de morango (C) em outra localidade. Dez espécimes de cada população foram coletados, individualizados em frascos Eppendorf e preservados em etanol a 95° até a extração do DNA. Quatro espécimes de *P. persimilis* (mesma população), 6 de *A. swirskii* (duas populações) e três de *Proprioseiopsis* sp. foram utilizados para testar a transferabilidade dos microssatélites desenvolvidos para *P. macropilis* e possível utilização nessas espécies. O DNA genômico total destas espécies foi extraído de uma única fêmea usando o kit Qiagen DNeasy (Qiagen, Hilden, Alemanha), de acordo com o Protocolo Spin-Column adaptado para extrair o DNA total de ácaros (KANOUH et al., 2010b). Os procedimentos foram conduzidos conforme descrito por Tixier et al (2017). As colunas de extração foram preservadas para posterior remoção dos espécimes e montagem dos ácaros em lâminas para identificação das espécies.

Informações detalhadas sobre todas as amostras coletadas para este estudo são fornecidas na Tabela 1.

Tabela 1. Populações utilizadas no desenvolvimento e avaliação de marcadores microssatélites para *P. macropilis* e transferabilidade em *P. persimilis*, *A. swirskii* e *Proprioseiopsis* sp.

Espécie	População	Planta Hospedeira	Local	Coordenadas Geográficas	n
<i>P. macropilis</i>	R	Morango (<i>Fragaria</i> spp.)	Socorro, São Paulo (SP), Brazil	22°54'S 47°0'W, 693 m	10
	S	Chuchu (<i>Sechium edule</i>)	Amparo, São Paulo (SP), Brazil	22°44'S 46°43'W, 700 m	10
	C				10
<i>P. persimilis</i>	PP	Liberção no campo	Commercial (Spain)		4
<i>A. swirskii</i>	I	Desconhecida	Ile de La Réunion	48°56'N 2°21'E	3
	II				3
<i>Proprioseiopsis</i> sp.		Morango (<i>Fragaria</i> spp.)	Socorro, São Paulo (SP), Brazil	22° 35'S 46° 31'W, 752 m	3

3.2.2 Construção da biblioteca enriquecida com SSRs e desenho de primers

O DNA genômico da linhagem resistente de *P. macropilis* foi usado para desenvolver uma biblioteca genômica enriquecida em microssatélites usando um protocolo adaptado de Billotte et al. (1999). O procedimento de isolamento consistiu na digestão do DNA genômico com a enzima de restrição *AfaI* (10u/μL) (Invitrogen, Carlsbad, Califórnia, EUA) e ligação de fragmentos com adaptadores de fita dupla *Rsa21* (10μM) (5'-CTCTTGCTTACGCGTGGACTA-3') e *Rsa25* (10μM) (5'-TAGTCCACGCGTAAGCAAGAGAGCACA-3').

O enriquecimento foi baseado na captura de hibridação usando sondas biotecnológicas (CT)₈ e (GT)₈ e esferas magnéticas revestidas com estreptavidina (MagneSphere Magnetic Separation Products; Promega Corporation, Madison, Wisconsin, EUA). Os fragmentos de DNA enriquecidos com microssatélites foram amplificados por PCR, clonados em um pGEM-T Easy Vector (Promega Corporation) e depois inseridos em células competentes de *Escherichia coli* 10H10b usando a técnica de eletroporação. Os clones positivos foram selecionados através de um meio de cultura contendo ampicilina e p-galactosidase.

Foram selecionadas 96 colônias recombinantes por triagem azul / branco, e o sequenciamento foi realizado em um analisador automático ABI 3500xL Genetic (Applied Biosystems, Foster City, Califórnia, EUA) com os primers T7 e SP6 e o BigDye Terminator versão 3.1 Cycle Sequencing Kit (Perkin Elmer-Applied Biosystems).

Removemos os adaptadores e realizamos o corte para eliminar a contaminação dos vetores, utilizando o aplicativo 4Peaks (Apple). As seqüências de consenso foram obtidas usando CAP3 (<http://doua.prabi.fr/software/cap3>). Em seguida, as seqüências aparadas foram alinhadas usando o banco de dados NCBI não redundante (Nr), através do algoritmo BLASTN com um valor de corte e de 1e-06 usando a ferramenta BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Identificamos as seqüências contendo microssatélites com a Ferramenta de Identificação de Repetição de Sequência Simples (SSRIT) (<http://archive.gramene.org/db/markers/ssrtool>) e oligonucleotídeos complementares às seqüências genômicas que flanqueiam a região das seqüências de microssatélites foram projetados usando o software Primer3Plus (UNTERGASSER et al., 2012). Os primers foram desenhados usando de acordo com os seguintes parâmetros: tamanho dos primers preferencialmente entre 18 e 22 pb; tamanho dos produtos finais de amplificação entre 100 e 300 pb; percentual de GC mínimo 40% e máximo 60%; temperatura de anelamento do primer (T_m) variando de 57 °C a 65 °C, e a diferença máxima de T_m entre pares de primers de 1 °C.

3.2.3 Validação da biblioteca e avaliação dos marcadores

Os 24 pares de primers desenvolvidos foram avaliados usando 30 fêmeas adultas de três populações (R, S e C) de *P. macropilis*. As amplificações de PCR foram realizadas em um volume de reação de 20 µL contendo 50 ng de DNA, 1 × tampão de PCR (20 mM Tris HCl [pH 8,4] e 50 mM KCl, 1,5 mM MgCl₂, 0,2 mM de cada dNTP, 10 mg/ml albumina sérica bovina (BSA), 0,15 µM de cada primer, e 1 U de Taq DNA polymerase. As condições de ciclagem da PCR consistiram em uma desnaturação inicial a 95°C por 5 min; seguido de 30 ciclos de desnaturação a 95°C por 1 minuto, temperatura de anelamento de cada par de primer por 1 minuto e extensão a 72°C por 1 minuto; e um ciclo de extensão final a 72°C por 8 min. Os produtos amplificados foram verificados em géis de agarose a 2%. A avaliação do polimorfismo e a genotipagem foram realizadas por eletroforese em gel a 6% de poliacrilamida desnaturada corado com nitrato de prata (Creste et al., 2001). Para determinar o tamanho dos fragmentos, utilizamos escalas de DNA de 10 e 50 pb (Invitrogen, Carlsbad, California, USA).

A transferabilidade foi testada em espécies próximas usando os 7 locos polimórficos (Pmacro02, Pmacro03, Pmacro11, Pmacro12, Pmacro13, Pmacro19, Pmacro24) e um loco monomórfico (Pmacro15).

3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Das 72 sequências contendo microssatélites, 26 tinham características adequadas para desenhar pares de primers. Os motivos de repetição mais comuns foram dinucleotídeos (77%), seguidos por tetranucleotídeos (15%) e trinucleotídeos e pentanucleotídeos (4% cada).

Dos 26 pares de primers que foram sintetizados, 24 apresentaram padrões de amplificação compatíveis com os tamanhos de fragmentos esperados. Sequências de “primers”, motivos repetidos, temperaturas de anelamento e variação de tamanho dos alelos desses locos de microssatélites são mostrados na Tabela 2.

Tabela 2. Características de 24 locos microssatélites para *Phytoseiulus macropilis*.

Locos	Primer sequences (5'-3')	Motivos repetidos	T _m (°C)	Intervalo de tamanho dos alelos (pb)
Pmacro01	F: TCGAAGGTGGAAACTGGAGC R: ACTCTGATCCCCTGCTGTTGC	(GT) ₆	60 60	179
Pmacro02	F: TCAAATGACCCCGTCACTGG R: GCGAGCGTGTCAATGTTTCA	(AC) ₈	60 60	235-239
Pmacro03	F: TGTGGTGGGAATCGTTTCGAGG R: TCTCACGAATGTGCTCACGT	(CT) ₈	60 60	171-185
Pmacro04	F: GCGGATGTCATTTGGTGTCTG R: TTTGTTTCTGGGAGCTCGGG	(CA) ₉	60 60	234
Pmacro05	F: GAGTGCTTGTCCGACTCACA R: CGTTGTGGAAGGACGGAGAA	(CA) ₉	60 60	139
Pmacro06	F: ATCTGCAGCACGGGATCG R: AGAGCTGTTCCCTCGGTTTG	(AC) ₉	60 60	166
Pmacro08	F: CGGATAAACTATGCCGGGCT R: CTTGCTCGGAATCAGCTCGA	(GT) ₉	60 60	266
Pmacro09	F: TTCCGGGAAGTTTTGGGAGG R: TCCGAGAAAATCCC GGGAAC	(CA) ₁₀	60 60	147
Pmacro10	F: GCTTCTCTCCCGTGAGATCG R: CGTCACGAGTGAGGCTTCAA	(GT) ₁₀	60 60	172
Pmacro11	F: ACGCGTCGAGAATGGACTTT R: TCCCGGGATAGTGTGGGATT	(CT) ₁₄	60 60	211-225
Pmacro12	F: GAAGTGCCCCCTGGAAGAGAC R: CGCAACACATAATCCTGGCG	(AG) ₁₈	60 60	192-198
Pmacro13	F: CAGACAGCTGAACGGAGGG R: CGCGAGATGAGCTTTGCTTC	(CA) ₁₈	60 60	225-249
Pmacro14	F: GCTGAACACTCACTCTCGCT R: CGGAGCTGGATTTCGAGGATC	(AAAC) ₃	60 60	207
Pmacro15	F: TACCGGGAGACTCTGAGGTC R: CATCACGGACAACCCCTCAA	(TTAG) ₃	60 60	211
Pmacro16	F: ATAGGCGGTTGGTTGACTGG R: AGCCCGGCATAGTTTATCCG	(TGGC) ₃	60 60	197
Pmacro17	F: ATCATCTTCGGTTCGCTCGG R: GTGACACGAACCCCAAGAT	(AC) ₆ (G)(CA) ₅	60 60	170
Pmacro18	F: CAGGGATCGTGTGCTTGCTA R: GCTCTTCTTCGCTCCATGGT	(GT) ₄ (A)(TG) ₃	60 60	214
Pmacro19	F: AACTTCTGCGAGGGTCAAGG R: CCGCTGTTGGTAGGAGCTAC	(AGA) ₃ (A)(AGA)	60 60	194-204
Pmacro20	F: CCTGGTGCTGGAATGGACAT R: GGGTGGCAAACGGTGAATTC	(GT) ₃ (AA)(TG) ₄	60 60	152

Pmacro21	F:			
	TGGTGGCCCATAGCTGTAATACA	(AC) ₅ (T)(CA) ₄	59	193
	R: CGCACATTTAGCTCAAGCGA		59	
Pmacro22	F: GCCAGGGGGTCTGAAGAAGC	(TCAAC)A(TCAAC) ₃	63	112
	R: ACATCCCGGGCGGCCA		64	
Pmacro23	F: AGCGACCAATCACCATCTGG	(TG) ₈	60	162
	R: CTCTCCAGCTCGTCCCATTC		60	
Pmacro24	F: AGCGACCAATCACCATCTGG	(AG) ₃ (TC) ₃	60	190-206
	R: TCAACTGTCACAAGGCTGCT		60	

O número de alelos por loco (A), a heterozigosidade observada e esperada (H_o e H_e) de cada loco e o conteúdo de informações do polimorfismo (PIC) foram analisados usando o software CERVUS versão 3.0.3 (KALINOWSKI et al., 2007). O valor do PIC depende do número e da distribuição de frequência dos alelos medidos; é um índice de avaliação do polimorfismo de um segmento de alelo (BOTSTEIN et al., 1980).

Dos 24 marcadores testados, sete locos são polimórficos (Tabela 3), com um número de alelos por loco variando entre 2 e 6 (média: 3,71); H_o entre 0,125 e 0,577; H_e entre 0,206 e 0,725 (Tabela 3). De acordo com a classificação de Botstein et al. (1980), quatro locos são altamente informativos ($PIC > 0,5$), dois moderadamente informativos ($0,25 < PIC < 0,5$) e um pouco informativo ($PIC < 0,25$) (Tabela 3). Os marcadores moleculares descritos aqui são os primeiros locos microssatélites isolados para *P. macropilis*.

Tabela 3. Caracterização genética de 7 microssatélites em três populações de *P. macropilis*.

Locos	A	H_o	H_e	PIC
Pmacro02	3	0.125	0.625	0.520
Pmacro03	3	0.267	0.393	0.342
Pmacro11	4	0.364	0.606	0.491
Pmacro12	4	0.577	0.721	0.650
Pmacro13	6	0.192	0.725	0.660
Pmacro19	2	0.227	0.206	0.181
Pmacro24	4	0.500	0.618	0.526

A = number of alleles; H_o = observed heterozygosity;

H_e = expected heterozygosity; PIC = polymorphism information content.

Alguns dos locos microssatélites descritos neste estudo foram amplificados com sucesso em *P. persimilis* e *A. swirskii*, bem como em *Proprioseiopsis* sp, sugerindo que esses marcadores poderiam ser utilizados para apoiar programas de conservação e melhoramento de *P. macropilis*, e de outras espécies do gênero e de outros gêneros próximos. Este estudo forneceu um primeiro passo importante no desenvolvimento de um conjunto de marcadores microssatélites adequados para estudos multiespécies de ácaros Phytoseiidae (Tabela 4).

Tabela 4. Transferabilidade de oito microssatélites em três espécies de ácaros Phytoseiidae.

Espécie	<i>n</i>	Pmacro02	Pmacro03	Pmacro11	Pmacro12	Pmacro13	Pmacro15	Pmacro19	Pmacro24
<i>P. persimilis</i>	4	+	+	+	-	+	+	+	+
<i>A. swirskii</i>	6	-	-	+	-	-	+	+	-
<i>Proprioseiopsis</i> sp.	3	-	MB	MB	-	MB	-	MB	MB

–, bandas fracas ou não visíveis; +, bandas sólidas; MB, bandas sólidas com artefatos produzidos e com pelo menos uma banda no tamanho esperado do alelo.

3.4 CONCLUSÕES

De um total de 26 pares de primers sintetizados, 24 mostraram padrões de amplificação compatíveis com os tamanhos esperados para os fragmentos. O polimorfismo dos 24 novos locos de microssatélites, avaliado em três populações de *P. macropilis*, resultou em sete amplificações bem sucedidas. Foram obtidas amplificações cruzadas com sucesso nas espécies *Phytoseiulus persimilis*, *Amblyseius swirskii* e *Proprioseiopsis* sp. Os marcadores moleculares desenvolvidos para *P. macropilis* podem ser úteis no estudo genético populacional dessa e de outras espécies do mesmo gênero e também de gêneros próximos.

3.5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BAILLY, X.; MIGEON, A.; NAVAJAS, M. Analysis of microsatellite variation in the spider mite pest *Tetranychus turkestani* (Acari: Tetranychidae) reveals population genetic structure and raises questions about related ecological factors. **Biological Journal of the Linnean Society**, v.82, p.69-78, 2004.
- BARBAR, Z.; TIXIER, M.S.; CHEVAL, B.; KREITER, S. Effects of agroforestry on Phytoseiidae mite communities (Acari: Phytoseiidae) in vineyards in the South of France. **Experimental and Applied Acarology**, v.40, p.175-188, 2006.
- BILLOTE, N.; LAGODA, P.J.L.; RISTERRUCCI, A.; BAURENS, F. Microsatellite-enriched libraries: Applied methodology for the development of SSR markers in tropical crops. **Fruits**, v.54, p.277-288, 1999.
- FADINI, M.A.M.; LEMOS, W.P.; VENZON, M.; MOURÃO, S.A. Herbivoria de *Tetranychus urticae* Koch (Acari: Tetranychidae) induz defesa direta em morangueiro? **Neotropical Entomology**, v.33, n.3, p. 293-297, 2004.
- GERSON, U.; SMILEY, R.L.; OCHOA, T. **Mites (Acari) for Pest Control**. Oxford, UK: Blackwell Science, 2003.
- GRBIĆ, M.; Van LEEUWEN, T.; CLARK, R.M.; ROMBAUTS, S.; ROUZÉ, P.; GRBIĆ, V.; OSBORNE, E.J.; DERMAUW, W.; NGOC, P.C.T.; ORTEGO, F.; HERNÁNDEZ-CRESPO, P.; DIAZ, I.; MARTINEZ, M.; NAVAJAS, M.; et al. The genome of *Tetranychus urticae* reveals herbivorous pest adaptations. **Nature**, v.479, p.487-492, 2011.
- HINOMOTO, N.; TODOKORO, Y.; HIGAKI, T. Population structure of the predatory mite *Neoseiulus womersleyi* in a tea field based on an analysis of microsatellite DNA markers. **Experimental and Applied Acarology**, v.53, p.1-15, 2011.
- HOY, M.A. Recent advances in genetics and genetic improvement of the Phytoseiidae. **Annual Review of Entomology**, v.30, p.345-370, 1985.
- McMURTRY, J.A.; SOURASSOU, N.F.; DEMITE, P.R. The Phytoseiidae (Acari: Mesostigmata) as biological control agents. p.133-149. In: CARRILLO, D.; MORAES, G.J.; PEÑA, J.E. (eds.). **Prospects for biological control of plant feeding mites and other harmful organisms**. Progress in Biological Control. v.19. Springer International Publishing, 2015.

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

NAVAJAS, M.J.; THISTLEWOOD, H.M.A.; LAGNEL, J.; HUGHES, C. Microsatellite sequences are under-represented in two mite genomes. **Insect Molecular Biology**, v.7, p.249-256, 1998.

NISHIMURA, S.; HINOMOTO, N.; TAKAFUJI, A. Isolation, characterization, inheritance and linkage of microsatellite markers in *Tetranychus kanzawai* (Acari: Tetranychidae). **Experimental and Applied Acarology**, v.31, p.93-103, 2003.

OLIVEIRA, H., M.A.M. FADINI, M. VENZON, D. REZENDE, F. REZENDE ; A. PALINI. Evaluation of the predatory mite *Phytoseiulus macropilis* (Acari: Phytoseiidae) as a biological control agent of the two-spotted spider mite on strawberry plants under greenhouse conditions. **Experimental and Applied Acarology**, v.47, p.275-283, 2009.

PRASAD, V. Biology of the predatory mite *Phytoseiulus macropilis* in Hawaii (Acarina: Phytoseiidae). **Annals of the Entomological Society of America**, v.60, p.905-908, 1967.

RONDERICK, G.K.; NAVAJAS, M. Genes in a new environments: genetics and evolution in biological control. **Nature Review Genetics**, v.11, p.889-99, 2003.

SATO, M. E.; SILVA, M. Z da; GONÇALVES, L. R.; SOUZA FILHO, M. F. de; RAGA, A. Toxicidade diferencial de agroquímicos a *Neoseiulus californicus* (McGregor) (Acari: Phytoseiidae) e *Tetranychus urticae* Koch (Acari: Tetranychidae) em morangueiro. **Neotropical Entomology**, v.31, n.3, p.449-456, 2002.

TIXIER, M.S.; KREITER, S. AUGER, P. Colonization of vineyards by phytoseiid mites: their dispersal patterns in the plot and their fate. **Experimental and Applied Acarology**, v.24, p.191-211, 2000.

TIXIER, M.S.; KREITER, S.; AUGER, P.; WEBER, M. Colonization of Languedoc vineyards by phytoseiid mites (Acari: Phytoseiidae): influence of wind and crop environment. **Experimental and Applied Acarology**, v.22, p.523-542, 1998.

ZHANG, Z.Q. **Mites in greenhouse: identification, biology and control**. Cambridge: CABI Publishing, 2003. 244 p.

CAPÍTULO 4 – VARIAÇÕES MOLECULARES DAS SEQUÊNCIAS DE DNA E PROTEÍNA DO CITOCROMO B EM *Phytoseiulus macropilis* BANKS E *P. persimilis* (ATHIAS-HENRIOT) (ACARI: PHYTOSEIIDAE) E ESTRUTURA GENÉTICA DE POPULAÇÕES²

RESUMO

Os ácaros fitoseídeos são importantes inimigos naturais usados em estratégias de controle biológico. O presente estudo enfoca duas dessas espécies, *Phytoseiulus macropilis* e *Phytoseiulus persimilis*. As sequências de mtDNA CytB de diferentes populações dessas duas espécies foram comparadas para determinar se as amostras coletadas no Brasil poderiam pertencer a *P. persimilis*, considerando-se que esta espécie é relatada em outros países da América do Sul, mas não no Brasil. Não foi observada sobreposição entre distâncias genéticas intra e interespecíficas, mas as distâncias foram baixas para variações interespecíficas. Isso pode ser devido à biologia específica das espécies do gênero *Phytoseiulus*, levando a uma variação na taxa de evolução. As sequências de mtDNA CytB também foram usadas para comparar as variações no nível intraespecífico. As populações de *P. persimilis* consideradas foram muito semelhantes, talvez porque sejam todas originárias da região Paleártica Ocidental ou devido à prevalência de espécimes comercializados *in natura*. Para *P. macropilis*, foram observadas maiores distâncias genéticas e estruturação das populações de acordo com a distância geográfica e resistência aos piretroides. Pela primeira vez, para Phytoseiidae, a estrutura da proteína foi analisada para determinar a presença de mutação de aminoácidos. Não foi observada mutação diagnóstica entre populações resistentes e suscetíveis, enquanto que, quatro mutações foram encontradas entre populações de *P. macropilis* separadas por 1300 km e, portanto, vivendo em diferentes condições climáticas. O impacto de tais mutações é discutido, mas as informações na literatura ainda são insuficientes para fornecer hipóteses confiáveis. A análise de proteínas e o resultado aqui obtido abrem claramente novas perspectivas nos estudos de Phytoseiidae.

Palavras-chave: caracterização molecular, mtDNA do citocromo B, estrutura proteica, Phytoseiidae, taxonomia

² QUEIROZ, M.C.V.; DOUIN, M.; SATO, M.E.; TIXIER, M-S. Molecular variations of the Cytochrome b DNA and protein sequences in *Phytoseiulus macropilis* Banks (Acari: Phytoseiidae) and *P. persimilis* (Athias-Henriot) reflect population structuration. **Experimental & Applied Acarology** (manuscript submitted)

4.1 INTRODUÇÃO

Os ácaros Phytoseiidae são predadores eficientes de ácaros e pequenos insetos (GERSON et al. 2003). Algumas espécies são comercializadas em todo o mundo por questões de controle biológico. Entre essas espécies, duas pertencem ao gênero *Phytoseiulus*: *Phytoseiulus persimilis* Athias-Henriot e *Phytoseiulus macropilis* Banks. Ambas as espécies são predadoras especializadas (McMURTRY et al. 2013); predam eficientemente *Tetranychus urticae* Koch (Acari: Tetranychidae), que é uma espécie polífaga e cosmopolita, alimentando-se e causando danos a mais de 1.100 espécies de plantas pertencentes a mais de 140 famílias (ZHANG, 2003; GRBI et al., 2011). *Phytoseiulus persimilis* é a espécie predatória mais antiga vendida e é mais difundida que *P. macropilis* (DEMITE et al. 2020). Esta última espécie também é comercializada e é relatada em vários continentes, inclusive sendo a mais encontrada na América do Sul, a suposta origem central de ambas as espécies (KANOUH et al., 2010; DEMITE et al., 2020). Essas duas espécies são morfologicamente muito próximas, diferindo apenas pelo número de cerdas no escudo ventrianal (McMURTRY, 1983; TAKAHASHI; CHANT, 1993a, KANOUH et al., 2010). Vários estudos, incluindo abordagens morfológicas, cruzadas e moleculares, parecem mostrar que são espécies distintas, apesar de a diferença morfológica ser muito pequena (TAKAHASHI; CHANT, 1993b; OKASSA et al., 2010). No entanto, resta uma pergunta sobre a identidade dessas duas espécies, principalmente no Brasil. *Phytoseiulus persimilis* é relatado em todo o mundo, incluído em vários países da América do Sul, mas não no Brasil, enquanto *P. macropilis* está presente neste último país, assim como em outros países da América do Sul. A ausência de relato de *P. persimilis* no Brasil parece assim estranha e, portanto, podemos questionar a identidade dos espécimes de *P. macropilis* no Brasil. Alguns dos espécimes identificados como *P. macropilis* no Brasil pertencem à espécie *P. persimilis*? O primeiro objetivo do presente estudo é responder a essa questão com base em comparações moleculares de várias populações de *P. macropilis* do Brasil e *P. persimilis*.

O segundo objetivo deste estudo concentra-se na variação genética dentro dos espécimes coletados no Brasil. A variação genética dentro de uma espécie pode ser afetada por vários fatores, como plantas hospedeiras, como mostrado para *Phytoseius finitimus* Ribaga (TIXIER et al., 2017), presas como mostrado para *Phytoseiulus longipes* Evans (TIXIER et al., 2010a) e distribuição geográfica, como mostrado para *Amblyseius largoensis* (Muma) (BOWMAN; HOY 2012; NAVIA et al., 2014; BARBOSA LIMA et al., 2018). Aqui investigamos como os dados moleculares refletem a diferenciação das populações de acordo

com as distâncias geográficas e a resistência a pesticidas, uma vez que uma das populações consideradas era resistente ao piretroide. Há um grande desafio na caracterização precoce da resistência em populações de campo de inimigos naturais para a liberação em massa de predadores, bem como para determinar como a resistência se dispersa dentro de populações "naturais" e pode ser mantida ou perdida. O objetivo é, portanto, determinar como o marcador molecular utilizado pode ser um indicador de populações resistentes de *P. macropilis* aos piretroides.

4.2 MATERIAL E MÉTODOS

4.2.1 Espécies e populações estudadas

As características das espécies e populações consideradas estão descritas na Tabela 5.

Foram consideradas oito populações de *P. macropilis* coletadas em dois estados do Brasil (São Paulo e Rio Grande do Sul) e na Argentina (Figura 15). Algumas populações foram coletadas em campos e estufas de culturas e plantas ornamentais (A: em Gérbera, I e L: em morango, V: em chuchu). Uma população é comercial (P). A população R, inicialmente coletada em 2010, de um campo de morangos no Estado de São Paulo, é mantida em laboratório (Laboratório de Acarologia do Instituto Biológico, Campinas, SP). Essa população é conhecida por sua resistência à fenpropatrina (QUEIROZ; SATO, 2016) e foi mantida em laboratório sob pressão de seleção. Agora é aproximadamente 5.300 vezes, 738 vezes, 735 vezes mais resistente à fenpropatrina, bifentrina e deltametrina do que uma população suscetível, respectivamente (QUEIROZ; SATO, 2016). A população chamada C colonizou a criação de *T. urticae* no laboratório de Acarologia do Instituto Biológico. Sua origem é, portanto, desconhecida. Além disso, quatro seqüências da população de *P. macropilis* coletadas na Argentina e depositadas no Genbank também foram consideradas para comparações moleculares (OKASSA et al., 2010).

Tabela 5. Características das localidades de coleta das diferentes populações, espécies de suporte de plantas consideradas e números de acesso no banco de dados Genbank.

Popula- tion code	Plant	Locality and collection date	GPS coordinates	Genbank accession numbers
<i>Phytoseiulus macropilis</i>				
A	Gerbera	Holambra, São Paulo (SP), Brazil, 2019	22°37'S 47°02'W	A22, A23, AN1, AN3, AN5, AN7, AN8, AN10
C	Lab contaminations in <i>T. urticae</i> rearings	Campinas, São Paulo (SP), Brazil, 2019	22°54'S 47°00'W	CN2, CN11, CN12
I	<i>Fragaria</i> sp. (in greenhouse)	Pinhalzinho, São Paulo (SP), Brazil., 2019	22°46'S 46°35'W	IN1, IN2, IN3, IN4, IN5, IN6, IN7, IN8, IN9, IN10
L	Reated in the lab since 2019 and initially collected on <i>Fragaria</i> sp.	Lageado, Rio Grande do Sul (RS), Brazil	29°26'S 51°57'W	LN1, LN2, LN3, LN4, LN5, LN6, LN7, LN8, LN9, LN10
P	Mass reared population - origin unknown	Commercial population (Promip), 2019	22°29'S 47°11'W	P1, PN1, PN2, PN3, PN4, PN6, PN7, PN8, PN9, PN10
R	Population resistant to fenpropatrin (pyrethroids), and maintained under selection pressure for 10 years, initially collected on <i>Fragaria</i> sp.	Socorro, São Paulo (SP), Brazil, 2010	22°54'S 47°00'W	R1, R3, R4, RN2, RN3, RN4, RN5, RN8, RN9, RN10
V	<i>Sechium elude</i>	Amparo, São Paulo (SP), Brazil, 2019	22°44'S 46°43'W	VN2, VN3, VN4, VN5, VN6, VN7, VN8, VN9, VN10
	Solanaceae	Argentina	See Okassa et al. 2020	FJ985091, FJ985092, FJ985093, FJ985094
<i>Phytoseiulus persimilis</i>				
	Mass-reared	Rearing units		FJ985083, FJ985084, FJ985085
	Unknown	Spain		FJ985076, FJ985077, FJ985078, FJ985079, FJ985080
	<i>Phaseolus vulgaris</i>	France		FJ985069, FJ985070, FJ985071, FJ985072, FJ985073, FJ985074, FJ985075
	<i>Broussonetia papyrifera</i>	France, Cabannes de Salaison	43°35' N 4°00' E	7G
	Unknown	Sicily, Italy		GU232491, GU232492, GU232493
	Unknown	Tunisia		GU232494, GU232495, GU232496, GU232497
	<i>Solanum nigrum</i>	Cap Bon, Tunisia	37° 4'N 11° 2'E	G5
	<i>Amaranthus reflexus</i>	Cap Bon, Tunisia	37° 4'N 11° 2'E	H3, H5

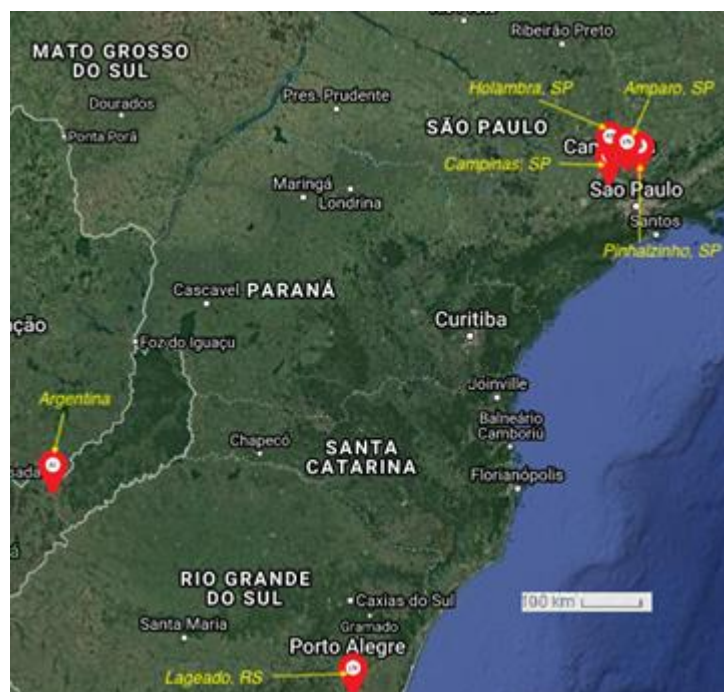


Figura 15. Mapa mostrando os locais de coleta das populações de *Phytoseius macropilis* no Brasil e na Argentina.

Os 27 espécimes de *P. persimilis* considerados foram coletados no sul da Europa e norte da África (França, Espanha, Tunísia e Itália) em culturas e plantas daninhas. Uma população é comercial. As sequências foram em parte as utilizadas na publicação de OKASSA et al. (2010).

4.2.2 Experimentos moleculares

4.2.2.1 Extração de DNA

A extração de DNA foi realizada em fêmeas individualizadas, como descrito por Kanouh et al. (2010) e Tixier et al. (2017) usando um kit Qiagen DNeasy (Qiagen, Hilden, Alemanha), de acordo com o Protocolo Spin-Column adaptado para extrair o DNA total de ácaros. Os ácaros foram recuperados após a extração do DNA e montados em lâminas como descrito por Tixier et al. (2010 b).

4.2.2.2 Amplificação do DNA e sequenciamento

O marcador de DNA aqui utilizado foi o marcador mitocondrial Citocromo B mtDNA.

O fragmento de DNA foi escolhido por ser um comprovadamente um bom marcador para avaliar a história evolutiva recente em ácaros Phytoseiidae e, portanto, adaptado às diferenças de espécies e populações (DOS SANTOS e TIXIER 2017).

“Primers” e ciclagem térmica foram utilizados como descrito em Tixier et al. (2012). As reações de PCR foram realizadas em um volume de 25 µL, contendo 4 µL de DNA de ácaros, 2,5 µL (1 mM) de tampão 10X, 0,5 µL (25 mM) de MgCl₂, 0,5 µL (2, 5 mM) de DNTPs, 0,175 µL (10 µm) para cada “primer”, 0,5 (10 mg / mL) de BSA, 0,125 µL (5 u.µL⁻¹) de Taq Qiagen e 13.375 µL de água. A eletroforese foi realizada em gel de agarose a 1,5% em tampão TBE 0,5 X por 30 min a 100 volts. Os produtos de PCR foram sequenciados usando o kit de sequenciamento de ciclo de terminador ET dinâmico. A purificação do DNA foi realizada com Exosap-IT (Amersham). O sequenciador usado foi o aparelho Megabase 1.000. Todos os fragmentos de DNA foram sequenciados ao longo de ambas as cadeias. Uma análise preliminar foi realizada nas sequências de codificação (CytB mtDNA) para verificar a ausência de códons de parada. As sequências obtidas foram comparadas com as incluídas no banco de dados GenBank para excluir possíveis contaminações. As sequências foram alinhadas e analisadas no Mega 6.0.6[®] (TAMURA et al., 2013). “Neighbour joining trees” foram construídas usando o modelo de 2 parâmetros Kimura e o suporte ao nó foi avaliado usando 1.000 “bootstraps” (Figura 16). A espécie *Neoseiulus californicus* (McGregor) foi utilizada como grupo externo (número de acesso no Genbank JF279241). As distâncias genéticas (usando o parâmetro Kimura 2) foram usadas para comparar os táxons nos níveis populacionais e de espécies.

As sequências de aminoácidos da proteína CytB também foram estudadas. As sequências de aminoácidos do fragmento parcial de CytB aqui considerado foram obtidas usando <http://insilico.ehu.es/translate/>. As sequências totais de aminoácidos de duas amostras de *T. urticae* recuperadas do Genbank (YP_001795379, ACI30848) foram alinhadas com as de uma amostra de *P. persimilis* e todas as amostras de *P. macropilis* (usando MEGA). Em seguida, foram pesquisadas mutações no aminoácido associadas à resistência a pesticidas em *T. urticae* nas sequências de aminoácidos dos espécimes de Phytoseiidae considerados. Como encontramos mutações nos aminoácidos entre dois grupos de *P. macropilis*, queríamos determinar o impacto dessas mutações na estrutura e função das proteínas. Para isso, usamos as ferramentas on-line Swissmodel (<https://swissmodel.expasy.org/>) e DynaMut (<http://biosig.unimelb.edu.au/dynamut/>) (RODRIGUES et al. 2018). A estrutura da proteína foi obtida, bem como a localização da mutação e o índice $\Delta\Delta G$ (energia livre de Gibbs) foi usado para avaliar o impacto das mutações na estabilidade e dinâmica da proteína.

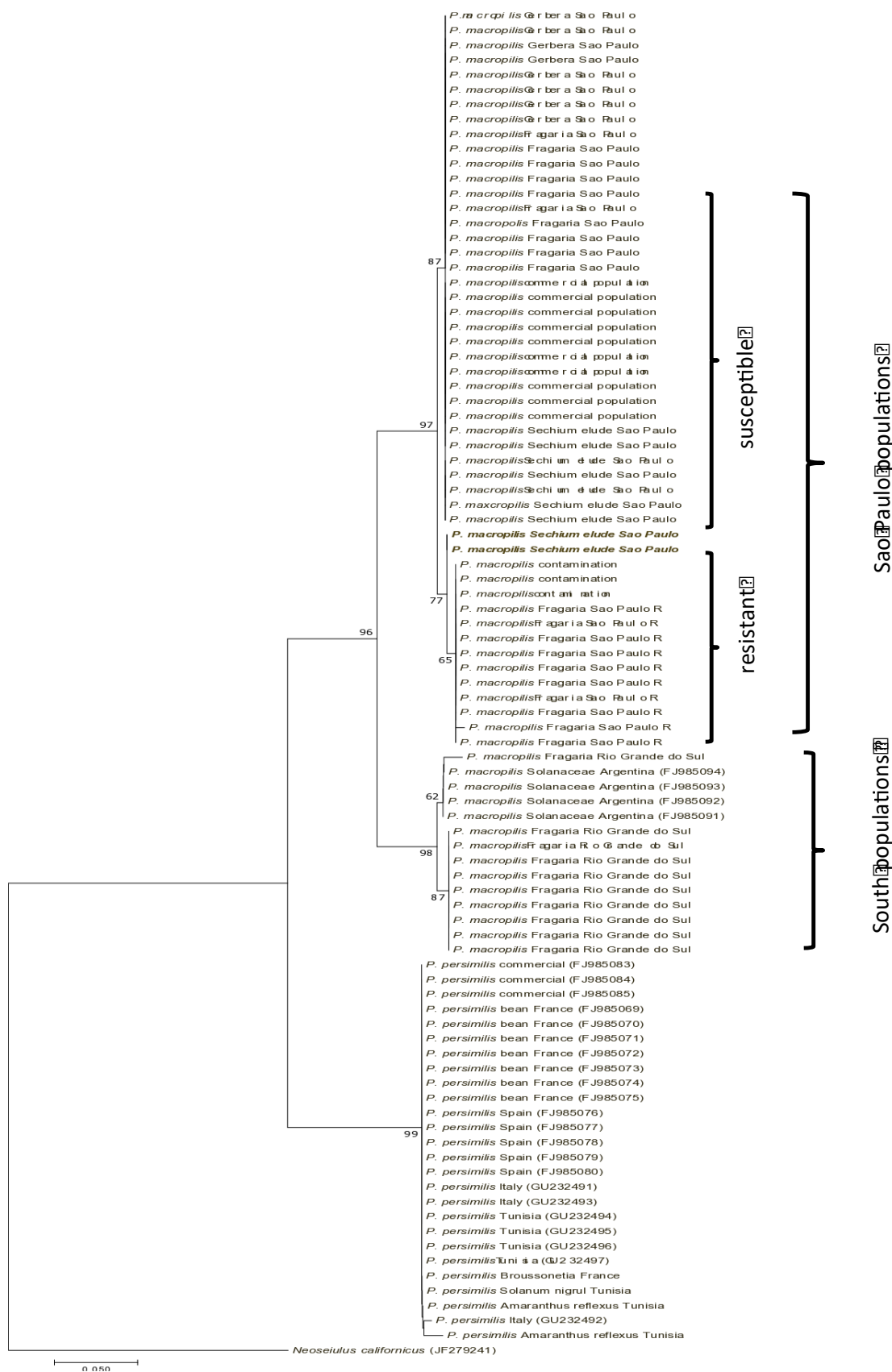


Figura 16. “Neighbour joining trees” baseadas nas distâncias genéticas K2P entre espécimens de *Phytoseiulus persimilis* e *P. macropilis* com o Cytb mtDNA. Os números correspondem aos valores de “bootstraps”.

4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.3.1 Identidade dos espécimes de *P. macropilis* do Brasil

As amostras de *P. macropilis* e *P. persimilis* estão incluídas em dois clados bem sustentados. As distâncias genéticas entre as 64 seqüências de DNA de espécimes de *P. macropilis* variam de 0 a 9,5% (com média de 3,3% e erro padrão de 0,6%). As distâncias genéticas entre as 26 seqüências de DNA das amostras de *P. persimilis* variam de 0 a 1,1% (com média de 0,1% e erro padrão de 0,07%). As distâncias genéticas entre as seqüências de DNA dessas duas espécies variam de 16,5% a 19,9% (com média de 17,7% e erro padrão de 3,06%) (Tabela 6).

Tabela 6. Distâncias genéticas médias de K2P (valores mínimo e máximo), entre e dentro das populações de *P. persimilis* e *P. macropilis*, bem como entre as populações de *P. macropilis* incluídas nos dois clados (mostradas na árvore - Neighbour Joining tree) para o marcador molecular CytB mtDNA.

	<i>P. macropilis</i>	<i>P. persimilis</i>
<i>P. macropilis</i>	3.3 (0-9.5)	
<i>P. persimilis</i>	17.7 (16.5-19.9)	0.1 (0-1.1)
	<i>P. macropilis</i> (clade 1)	<i>P. macropilis</i> (clade 2)
<i>P. macropilis</i> (clade 1)	0.5 (0-1.1)	
<i>P. macropilis</i> (clade 2)	8.4 (7.7-9.5)	0.6 (0-2.1)

As distâncias intraespecíficas são muito mais baixas que as interespecíficas e não se observa sobreposição. Este resultado mostra que os espécimes de *P. macropilis* coletados no Brasil pertencem à mesma espécie que os coletados na Argentina. Além disso, por não haver sobreposição entre distâncias genéticas entre os espécimes de *P. macropilis* e *P. persimilis* e as altas distâncias genéticas mínimas que separam esses dois táxons (min - 16,5%, máximo - 19,5%), parece que todos esses espécimes de *P. macropilis* aqui considerados não pertencem à espécie *P. persimilis*. No entanto, vários estudos mostram que, para os ácaros Phytoseiidae, a distância genética intraespecífica, usando o mesmo fragmento de DNA (CytB mtDNA), pode ser superior a 19% (23% nas espécies *P. finitimus* e 21,7% nas espécies *Typhlodromus* (*Anthoseius*) *rhenanoides* (Athias-Henriot). Além disso, para as espécies de Phytoseiidae

estudadas até agora, nenhuma distância interespecífica abaixo de 22% foi observada (TIXIER et al. 2019).

A comparação das distâncias atualmente obtidas com as disponíveis em literatura para os ácaros Phytoseiidae pode, assim, levar a uma conclusão diferente: os espécimes de *P. macropilis* e *P. persimilis* aqui comparados podem pertencer à mesma espécie e essa diferenciação molecular deve-se ao isolamento geográfico (espécimes de *P. persimilis* sendo coletados da Europa e norte da África e *P. macropilis* na América do Sul). No entanto, as altas distâncias intraespecíficas observadas para *P. finitimus* e *T. (A.) rhenanoides* referiram-se apenas a alguns espécimes, enquanto no presente caso a alta distância genética entre *P. macropilis* e *P. persimilis* diz respeito a todos os espécimes considerados. Além disso, parece difícil aplicar um mesmo limiar de decisão comum e baseado na sobreposição intra e interespecífica para toda a família, pois as características da biologia e do desenvolvimento são claramente diferentes nos táxons de uma mesma família (afetando, portanto, a variação do DNA de uma maneira diferente) (MCMUTRY e CROFT 1997).

Espécies do gênero *Phytoseiulus* constituem um grupo bastante particular da família Phytoseiidae devido à sua especificidade de presas e aos seus altos parâmetros reprodutivos (ciclo rápido, alta fecundidade). Essas características biológicas particulares podem explicar uma evolução genética mais rápida do que em outros ácaros fitoseídeos e, portanto, diminuir a distância interespecífica entre duas espécies muito próximas. Finalmente, as observações dos espécimes utilizados para experimentos moleculares mostram que todos os espécimes de *P. macropilis* tinham as cerdas JV2 no escudo ventrianal, enquanto os espécimes de *P. persimilis* não. A conclusão do presente estudo é a mesma de Okassa et al. (2010). Parece que *P. macropilis* e *P. persimilis* são dois estudos diferentes, que com base nas amostras analisadas, os espécimes de *P. macropilis* do Brasil não pertencem à espécie *P. persimilis*. No entanto, valeria a pena realizar estudos adicionais especialmente cruzados para concluir definitivamente.

4.3.2 Variação genética entre as populações de *P. persimilis* e *P. macropilis*

A variação genética entre as seqüências de DNA de *P. persimilis* é muito baixa. Todas as amostras consideradas são totalmente semelhantes entre si, incluindo as comercializadas. Apenas um espécime (da Tunísia) é um pouco diferente (distância de 1,1%). Assim, pode-se hipotetizar (i) que as amostras coletadas possam ser emitidas a partir de liberações comerciais, que se espalhem no ambiente ou (ii) que existe uma variação muito pequena entre as amostras

na área considerada. No entanto, como nossa declaração anterior, hipotetizando uma taxa de evolução mais alta em espécies do gênero *Phytoseiulus* (devido a características biológicas particulares), seria de esperar uma alta diversidade genética entre as populações. É a razão pela qual a primeira hipótese deve ser a mais provável, subjacente à dificuldade de encontrar espécimes "naturais" para espécies comercialmente lançadas em massa. Finalmente, a baixa distância genética também pode mostrar que a área Palearctica Ocidental, mesmo sendo a área onde *P. persimilis* tenha sido descrita por Athias-Henriot em 1957 (na Argélia), certamente não seja o centro de origem dessa espécie. Para testar esta hipótese, seriam necessárias seqüências de espécimes de *P. persimilis* da América do Sul.

A variação genética entre as seqüências de DNA de *P. macropilis* é muito maior que a observada para *P. persimilis*, mesmo que todas as populações tenham sido coletadas no Brasil e, às vezes, no mesmo estado ou em áreas muito próximas. Globalmente, as distâncias intrapopulacionais são muito baixas, com média variando de 0 a 0,42%, enquanto as distâncias interpopulacionais são muito maiores, conforme refletido na árvore filogenética. Esta última mostra dois clados distintos: um contém espécimes coletados na Argentina em Solanaceae e espécimes da população "L" coletados no Rio Grande do Sul em morango (Rosaceae) (clado 1) e um clado contém as demais populações coletadas no Estado de São Paulo em diferentes plantas (clado 2). A distância genética média entre esses dois clados é de 8,4% (min-máx: 7,7% -9,5%), a distância genética dentro do clado é de 0,5% (min-máx: 0-1,1%) para o clado 1 e 0,63% (min-max: 0-2,1%) para o clado 2. Não se observa sobreposição nas distâncias intra e interclado, mas as distâncias genéticas entre eles são muito baixas (em comparação com as referências anteriores para os ácaros Phytoseiidae usando o mesmo marcador) para concluir que esses dois clados pertencem a duas espécies diferentes (TIXIER et al. 2017, 2019).

Essa diferenciação genética pode ser explicada pela distância geográfica, pois as populações do clado 1, mesmo que separadas por 570 km, sejam geograficamente menos distantes do que as populações do clado 2 coletadas no estado de São Paulo (1300 km distante). A estruturação dentro desses dois clados também é observada. No clado 1, principalmente todos os espécimes das duas populações ("L" e Argentina) são separados em dois grupos (distância genética média fraca de 1,04%), que pode ser explicada novamente pelo efeito da distância e / ou pelo efeito da seleção durante o processo de criação.

No clado 2, populações coletadas em campos e presumivelmente suscetíveis a pesticidas são incluídas em um clado separado do que os espécimes resistentes aos piretroides ("R") e os espécimes da população "C" cuja origem era desconhecida. Devido à semelhança

entre os espécimes “R” e “C” (contaminação na criação de *T. urticae* no laboratório de Campinas), parece que essas duas populações são semelhantes e que a população “C” foi formada a partir da fuga de alguns espécimes da população “R” que contaminaram as criações de *T. urticae*. É importante notar que, sem pressão de seleção, os espécimes (população “C”) não perderam a resistência, certamente por não haver mistura com espécimes susceptíveis.

Croft e Whalon (1983) estudando a resistência poligênica e recessiva à permetrina em *Neoseiulus fallacis* (Garman) também observaram que a resistência permaneceu estável em condições de laboratório por 25 gerações na ausência de pressão de seleção. Dois espécimes entre os 9 da população “V” estão incluídos no clado “resistente”, mesmo que um pouco distante dos outros espécimes deste grupo. A população “V” foi coletada em uma área próxima à localidade de coleta inicial da população “R”. Esses dois espécimes podem ser da mesma população “R” coletada há 10 anos. A pequena diferença pode ser explicada pela perda de resistência após dois anos nos campos e pela mistura com populações suscetíveis, sem a pressão de seleção contínua.

Queiroz e Sato (2016), estudando a estabilidade da resistência à fenpropatrina em *P. macropilis*, observaram que essa resistência é parcialmente instável na ausência de pressão de seleção e em contato com uma população suscetível. A alta capacidade de dispersão de *P. macropilis* (ROSENHEIM et al., 2004) pode contribuir para a diluição da resistência e a rápida reversão da resistência ao piretróide em condições de campo, em culturas com alta abundância de ácaros suscetíveis, como mostrado para *Neoseiulus fallacis* (Garman) (DUNLEY; CROFT, 1992).

A distância genética média entre esses dois grupos (resistente e suscetível) é de 1,12% e as distâncias médias dentro da população são de 0% para as populações de campo e de 0,06% para a população resistente. A resistência a pesticidas pode explicar uma estrutura genética, já que nenhum efeito de planta ou efeitos de distância geográfica foram observados. Diferentes mutações foram relatadas no CytB para explicar a resistência a bifenazato, acequinocil e inibidores de Qo para *T. urticae* e *Panonychus ulmi* Koch (G132A, G126S, A133T, P262T, I136T, S141T, I260V, N326S) (VAN LEEUWEN et al., 2008, 2011; VAN NIEUWENHUYSE et al., 2009; FOTOUKKIAI et al., 2020).

Comparando a sequência de aminoácidos proteicos do fragmento de CytB aqui considerado para todas as amostras de *P. macropilis*, nenhuma das mutações incluídas no fragmento estudado é observada (G132A, A133T, P262T, I136T, S141T, I260V). Todas as amostras de *P. macropilis* têm uma sequência de aminoácidos do tipo selvagem (um “G” na posição 132, um “A” na posição 133, um “P” na posição 262, um “I” na posição 136, um “S”

na posição 141 e um "I" na posição 260). Esse resultado parece mostrar que os *P. macropilis* não são resistentes a bifenazato, acequinocil e inibidores de Qo, o que está alinhado com os ensaios de laboratório que mostram apenas a resistência da população "R" aos piretrenoídes (QUEIROZ; SATO, 2016). Além disso, nenhuma mutação diagnóstica foi observada entre as populações "suscetível" e "resistente" aqui consideradas que poderiam estar associadas a uma resistência aos piretroides através da mutação do gene CytB, o que é bastante normal, considerando o modo de ação dos piretroides. Parece que o marcador de DNA CytB é um marcador neutro que separou a população "R" não necessariamente por causa de uma mutação específica associada a esse fragmento de DNA. Além disso, devemos ter cautela ao associar os clados observados a fenótipos resistentes, pois outras pressões de seleção podem explicar a estruturação dentro do clado 2. A pressão associada à liberação desses predadores também pode afetar esse fraco isolamento, pois a população do campo é semelhante à comercial sugerindo, assim como para *P. persimilis*, uma dispersão desses espécimens para o campos. Claramente, para determinar como o marcador neutro CytB poderia agrupar populações de acordo com seu fenótipo resistente, populações resistentes adicionais devem ser analisadas.

Foram observadas quatro mutações diagnósticas entre a população do Sul do Brasil ("L" e Argentina) e as demais populações localizadas principalmente no estado de São Paulo (N180Y, Y204S, N216Y, V224M). Na posição 180, as populações sul têm uma leucina (L) (como para *T. urticae* e um T para *P. persimilis*), enquanto as demais amostras têm uma metionina (M). Na posição 204, as "populações sul" de *P. macropilis* possuem uma Serina (S) (como em *T. urticae* e F em *P. persimilis*), enquanto todas as demais amostras possuem uma Tirosina (Y). Na posição 216, as populações sul têm uma tirosina (Y), enquanto todas as demais amostras têm uma asparagina (N) (uma F para *T. urticae* e S para *P. persimilis*). Na posição 224, as populações sul têm uma metionina (M), enquanto todas as demais amostras têm uma valina (V) (como para *P. persimilis* e um L para *T. urticae*).

Quando estudos (VAN LEEUWEN et al. 2008, 2011, VAN NIEUWENHUYSE et al. 2009, FOTOUKKIAI et al. 2020) relataram que uma mutação na proteína CytB pode fornecer resistência ao inseticida para *T. urticae*, podemos nos perguntar sobre a formação de quatro mutações e seu impacto na função dessa proteína para as populações de *P. macropilis* consideradas. Não foram encontrados na literatura exemplos de tais mutações em ácaros (e artrópodes em geral) para fornecer algumas hipóteses. Parece que, em insetos, os efeitos do fundador e localizações geográficas específicas podem levar a taxas de divergência acelerada em aminoácidos, ou os estilos de vida parasitários causam um aumento nas taxas de mutação

(PAGE et al., 1998). A taxa acelerada de evolução de nucleotídeos e aminoácidos de Cyt B em abelhas pode estar correlacionada com taxas metabólicas aumentadas associadas à endotermia facultativa (SIMMON; WELLER 2001).

Devido à localização das populações de *P. macropilis* dentro dos dois clados (populações do Sul e de São Paulo) em dois climas diferentes, podemos supor que essas mutações possam estar envolvidas na energia usada para termorregulação. As Figuras 17 e 18 mostram a modificação estrutural da proteína CytB entre o tipo selvagem (populações de São Paulo) e os tipos de mutantes (populações sul). A tabela 7 mostra o índice $\Delta\Delta G$ (energia livre de Gibbs) calculado de acordo com diferentes métodos. As quatro mutações têm impactos diferentes na estabilidade da proteína. Parece, de acordo com o modelo DynaMut, que as mutações N180Y N216Y, V224M têm um efeito estabilizador na molécula onde a mutação Y204S tem um efeito desestabilizador.

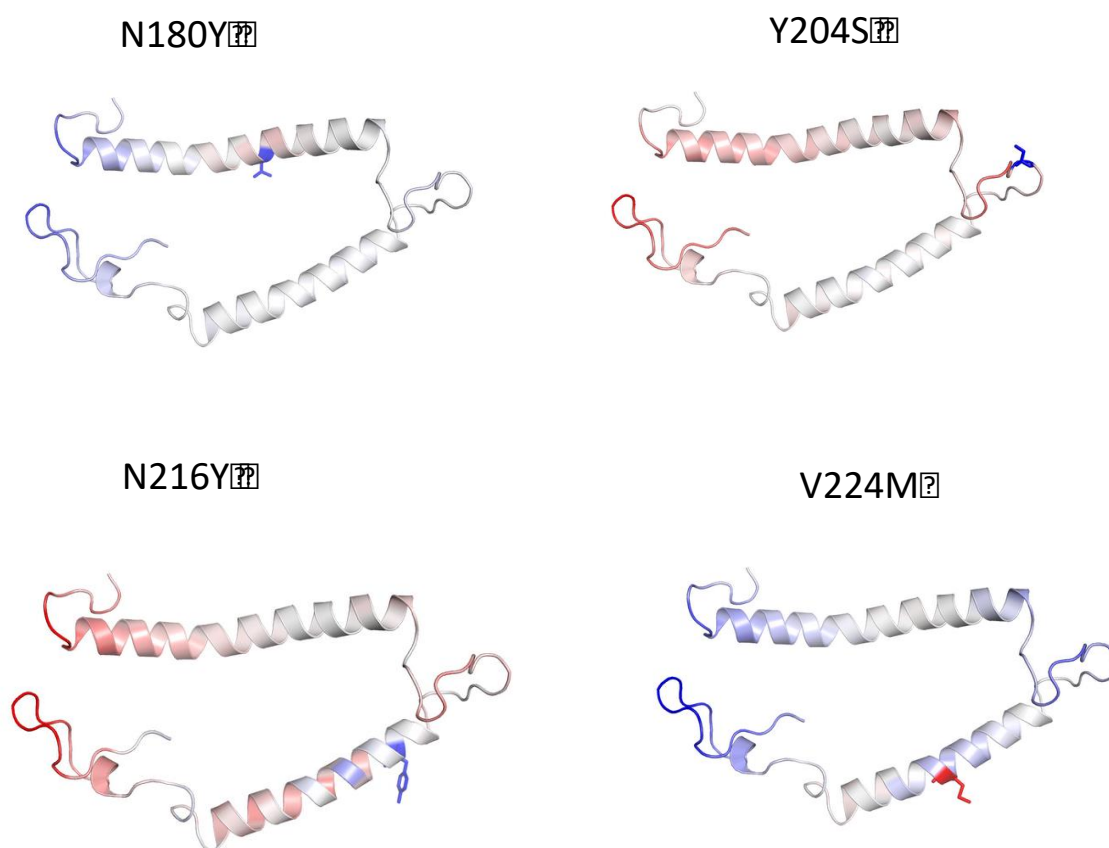


Figura 17. Representação visual da energia de entropia vibracional devido às mutações N180Y, Y204S, N216Y, V224M na proteína CytB de *Phytoseiulus macropilis*. Os aminoácidos são coloridos de acordo com a alteração da entropia vibracional após a mutação, o azul representa uma rigidificação da estrutura e o vermelho um ganho de flexibilidade.

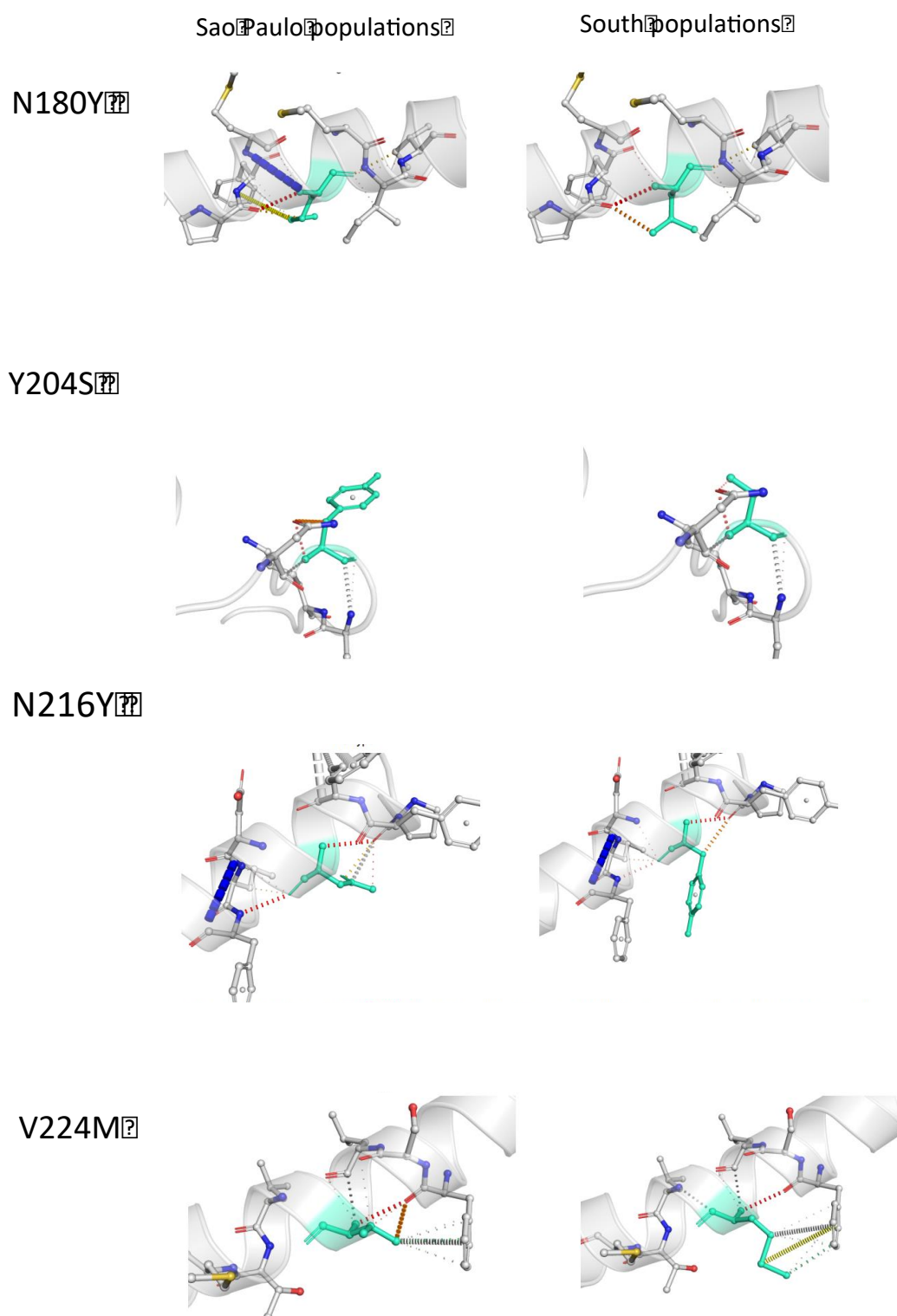


Figura 18. Previsão de interações interômicas devido às mutações N180Y, Y204S, N216Y, V224M na proteína CytB de *Phytoseiulus macropilis* entre populações coletadas no Sul (Argentina, Brasil: Rio Grande do Sul) e no estado de São Paulo. Os resíduos do Sul e São Paulo são coloridos em verde-claro e também são representados no esquema, juntamente com os resíduos ao redor, envolvidos em qualquer tipo de interação.

Tabela 7. Índices $\Delta\Delta G$ (energia livre de Gibbs) calculados de acordo com diferentes métodos utilizados.

	Mutations			
	N180Y	Y204S	N216Y	V224M
$\Delta\Delta G$	0.181 kcal/mol (Stabilizing)	-0.689 kcal/mol (Destabilizing)	0.112 kcal/mol (Stabilizing)	0.562 kcal/mol (Stabilizing)
$\Delta\Delta G_{\text{NCoM}}$	0.041 kcal/mol (Destabilizing)	-0.011 kcal/mol (Destabilizing)	0.028 kcal/mol (Destabilizing)	0.091 kcal/mol (Destabilizing)
$\Delta\Delta G_{\text{mCSM}}$	-0.808 kcal/mol (Destabilizing)	-0.120 kcal/mol (Destabilizing)	-0.222 kcal/mol (Destabilizing)	-0.251 kcal/mol (Destabilizing)
$\Delta\Delta G_{\text{SDM}}$	0.350 kcal/mol (Stabilizing)	-0.660 kcal/mol (Destabilizing)	0.010 kcal/mol (Stabilizing)	0.070 kcal/mol (Stabilizing)
$\Delta\Delta G_{\text{DUET}}$	-0.207 kcal/mol (Destabilizing)	0.033 kcal/mol (Stabilizing)	-0.172 kcal/mol (Destabilizing)	0.017 kcal/mol (Stabilizing)
$\Delta\Delta S_{\text{vib, NCoM}}$	-0.051 kcal.mol ⁻¹ .K ⁻¹ (Decrease of molecule flexibility)	0.014 kcal.mol ⁻¹ .K ⁻¹ (Increase of molecule flexibility)	-0.035 kcal.mol ⁻¹ .K ⁻¹ (Decrease of molecule flexibility)	-0.114 kcal.mol ⁻¹ .K ⁻¹ (Decrease of molecule flexibility)

Alterações na afinidade de ligação causada por mutações podem mostrar o impacto das mutações nos IBP (SEDDIGH; DARABI, 2018; GENG et al., 2019) e a estabilidade das proteínas pode afetar sua atividade funcional. Não há literatura sobre a estabilidade da modificação cytB em artrópodes. Várias mutações no citocromo b humano têm sido associadas a doenças. Aledo et al. (2012) comparam a estabilidade do CytB em mamíferos. Esses autores concluíram que, do ponto de vista termodinâmico, o citocromo b é muito mais robusto às mutações que a COX 1 e afirmaram que proteínas mais estáveis podem tolerar melhor uma diminuição da estabilidade, o que, por sua vez, lhes permite evoluir mais rapidamente. O presente estudo apóia esses achados em mamíferos com uma mutação muito mais estabilizadora do que a desestabilizadora, sugerindo assim efeitos positivos dessas mutações para as populações do Sul.

O presente trabalho parece mostrar a identidade correta de *P. persimilis* e *P. macropilis*, mesmo que baixas distâncias genéticas em comparação com outros casos em ácaros Phytoseiidae tenham sido observadas certamente devido às características biológicas singulares das espécies do gênero *Phytoseiulus* (induzindo rápidas taxas de evolução). Uma variação intraespecífica muito baixa foi observada entre os espécimes de *P. persimilis* considerados certamente por causa da “invasão” das linhagens comerciais liberadas em massa. No futuro, comparações de sequências de DNA de *P. persimilis* do sul da América permitiriam testar essa hipótese. Além disso, isso certamente forneceria informações interessantes sobre o estado das espécies de *P. persimilis* e *P. macropilis*, já que o isolamento geográfico poderia ser uma explicação para os clados separados, incluindo os espécimes de *P. macropilis* e *P. persimilis*.

4.4 CONCLUSÕES

O presente estudo, investigando a variação intraespecífica dentro de *P. macropilis*, mostra a separação das populações de acordo com fatores geográficos e fenótipos de resistência a pesticidas. É o primeiro estudo que enfatiza o diagnóstico de resistência usando marcadores de DNA, abrindo novas perspectivas para o desenvolvimento de novas ferramentas para detecção precoce de resistência. No entanto, populações resistentes adicionais devem ser testadas para determinar se outros fatores não podem afetar essa separação entre populações suscetíveis e resistentes. Além disso, não foi observada mutação diagnóstica na sequência de aminoácidos.

Por outro lado, o presente estudo permite identificar quatro mutações entre populações de *P. macropilis* geograficamente distantes. Essa descoberta abre claramente novos desenvolvimentos na análise da função das proteínas em ácaros. É a primeira vez que tais mutações são relatadas e que a estabilidade das proteínas após a mutação é investigada. Claramente, é necessário muito mais trabalho, especialmente para melhor caracterizar as características biológicas das populações (em relação aos requisitos de temperatura, por exemplo) para avaliar melhor o impacto funcional positivo ou negativo das mutações em relação às características termodinâmicas da proteína.

4.5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALEDO, J.C.; VALVERDE, H.; RUIZ-CAMACHO, M. Thermodynamic stability explains the differential evolutionary dynamics of Cytochrome b and COX I in Mammals. **Journal of Molecular Evolution**, 2012.

BARBOSA LIMA, D.; REZENDE-PUKER, D.; SANTOS DE MENDONÇA, R.; TIXIER, M.-S.; GONDIM JUNIOR, M.G.C.; MELO, J.W.S.; OLIVEIRA, D.C.; NAVIA, D. Molecular and morphological characterization of the predatory mite *Amblyseius largoensis* (Acari: Phytoseiidae) Surprising similarity between an Asian and American populations. **Experimental and Applied Acarology**, v.76, p.287-310, 2018.

BOWMAN, H. M.; HOY, M. A. Molecular discrimination of phytoseiids associated with the red palm mite *Raoiella indica* (Acari: Tenuipalpidae) from Mauritius and South Florida. **Experimental and Applied Acarology**, v.57, p.95-407, 2012.

CROFT, B.A.; WHALON, M.E. Inheritance and persistence of Permethrin resistance in the predatory mite, *Amblyseius fallacis* (Acarina: Phytoseiidae). **Environmental Entomology**, v.2, n.1, p.215–218, 1983.

DEMITE, P. R.; MORAES, G. J. de; McMURTRY, J. A.; DENMARK, H. A.; CASTILHO, R. C. Phytoseiidae Database. Disponível em: www.lea.esalq.usp.br/phytoseiidae (2020). Acesso em 15 Fev. 2020.

FOTOUKKIAII, S.M.; TAN Z.; XUE, W.; WYBOUW, N.; VAN LEEUWEN, T. Identification and characterization of new mutations in mitochondrial cytochrome b that confer resistance to bifenazate and acequinocyl in the spider mite *Tetranychus urticae*. **Pest management science**, v.73, n.3, p.1154-1163, 2020.

DOS SANTOS, V.; TIXIER, M.S. Molecular markers for analysing phylogenetic relationships within the mite family Phytoseiidae (Acari: Mesostigmata). **Cladistics**, v.28, n.5, p.1-16, 2017.

DUNLEY, J.E.; CROFT, B.A. Dispersal and gene flow of pesticide resistance traits in phytoseiid and tetranychid mites. **Experimental and Applied Acarology**, v.14, p.313–325, 1992.

GENG, C.; XUE, L.C.; ROEL-TOURIS, J.; BONVIN, A.M.J.J. Finding the $\Delta\Delta G$ spot: Are predictors of binding affinity changes upon mutations in protein–protein interactions ready for it? **WIREs Computational Molecular Science**, v.9, e1410, 2019.

GERSON, U.; SMILEY, R.L.; OCHOA, T. **Mites (Acari) for Pest Control**. Oxford, UK: Blackwell Science, 2003.

GRBI M.; VAN LEEUWEN, T.; CLARK, R. M.; ROMBAUT, S.; ROUZE, P.; GRBIC, V. et al., The genome of *Tetranychus urticae* reveals herbivorous pest adaptations. **Nature**, v.479, p.487-492, 2011.

KANOUEH, M.; TIXIER, M.S.; OKASSA, M.; KREITER, S. Phylogenetic and biogeographic analysis of the genus *Phytoseiulus* (Acari: Phytoseiidae). **Zoologica Scripta**, v.39, p.450-461. 2010. doi:10.1111/j.1463-6409.2010.00439.x

McMURTRY, J.A. Phytoseiid mites from Guatemala, with descriptions of two news species and redefinitions of the genera *Euseius*, *Typhloseiopsis*, and the *Typhlodromus occidentalis* species-group (Acari: Mesostigmata). **International Journal of Entomology**, v.25, p.249-272, 1983.

McMURTRY, J. A.; CROFT, B. A. Life-styles of Phytoseiid mites and their roles in biological control. **Annual Review of Entomology**, v.42, p.291-321, 1997.

McMURTRY, J.A.; MORAES, G.J. de, SOURASSO, N.F. Revision of the life styles of phytoseiid mites (Acari: Phytoseiidae) and implications for biological control strategies. **Systematic & Applied Acarology**, v.18, p.297-320, 2013.

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. Reproductive compatibility and genetic and morphometric variability among populations of the predatory mite, *Amblyseius largoensis* (Acari: Phytoseiidae), from Indian Ocean islands and the Americas. **Biological Control**, v.7, p.17-29, 2014.

OKASSA, M.; TIXIER, M.-S.; KREITER, S. Morphological and molecular diagnostics of *Phytoseiulus persimilis* and *Phytoseiulus macropilis* (Acari: Phytoseiidae). **Experimental and Applied Acarology**, v.52, n.3, p.291-303, 2010.

PAGE, R. D.; LEE, P. L.; BECHER, S. A.; GRIFFITHS, R.; CLAYTON, D. H. A different tempo of mitochondrial DNA evolution in birds and their parasitic lice. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v.9, p.276-293, 1998.

QUEIROZ, M.C.V.; SATO, M.E. Pyrethroid resistance in *Phytoseiulus macropilis* (Acari: Phytoseiidae): cross-resistance, stability and effect of synergists. **Experimental and Applied Acarology**, v.68, n.1, p.71-82, 2016.

RODRIGUES, C.H.M.; PIRES, D.E.V.; ASCHER, D.B. DynaMut: predicting the impact of mutations on protein conformation, flexibility and stability. W350–W355 **Nucleic Acids Research**, v.46, 2018. doi: 10.1093/nar/gky300, 2018.

ROSENHEIM, J.A.; LIMBURG, D.D.; COLFER, R.G.; FOURNIER, V.; HSU, C.L.; LEONARDO, T.E.; NELSON, E.H. Herbivore population suppression by an intermediate predator, *Phytoseiulus macropilis*, is insensitive to the presence of an intraguild predator: an advantage of small body size? **Oecologia**, v.140, p.577-585, 2004.

SEDDIGH, S.S.; DARABI, M. Functional, structural, and phylogenetic analysis of mitochondrial cytochrome b (cytb) in insects. **Mitochondrial NA Part A**, v.29, n.2, p.236-249, 2018.

SIMMONS, R.B.; WELLER, S.J. Utility and evolution of cytochrome b in insects. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v.20, n.2, p.196-210, 2001.

TAKAHASHI, F.; CHANT, D.A. Phylogenetic relationships in the genus *Phytoseiulus* Evans (Acari: Phytoseiidae). III. Cladistic analysis. **International Journal of Acarology**, v.19, n.3, p.233–241, 1993a.

TAKAHASHI, F.; CHANT, D.A. Phylogenetic relationships in the genus *Phytoseiulus* Evans (Acari: Phytoseiidae). IV. Reproductive isolation. **International Journal of Acarology**, v.19, n.4, p.305-311, 1993b.

TAMURA, K.; STECHER, G.; PETERSON, D.; FILIPSKI, A.; KUMAE, S. MEGA6: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. **Molecular Biology and Evolution**, v.30, p.2725-2729, 2013.

TIXIER, M.-S.; FERRERO, M.; OKASSA, M.; GUICHOU, S.; KREITER, S. Morphological and molecular analyses of four populations of *Phytoseiulus longipes* (Mesostigmata:

Phytoseiidae) in accordance with their feeding behaviour. **Bulletin of Entomological Research**, v.100, n.5, p.569-579, 2010a.

TIXIER, M.-S.; OKASSA, M.; LIGUORI, M.; POINSO, A.; SALERNO, B.; KREITER, S. Voucher specimens for DNA sequences of Phytoseiid mites (Acari: Mesostigmata). **Acarologia**, v.50, p.487-494, 2010b.

TIXIER, M.-S.; PRINCIPATO, D.; KREITER, S.; DOUIN, M.; TSOLAKIS, H. Phytoseiid mites of the genus *Typhlodromus* (Acari: Phytoseiidae) from Southern France: combined morphological and molecular approaches for species identification. **Zootaxa**, v.2, p.242–280, 2019.

TIXIER, M.-S.; Dos SANTOS, V.; DOUIN, M.; DUSO, C.; KREITER, S. Great molecular variation questions the status of the species *Phytoseius finitimus* (Acari: Phytoseiidae) and the barcoding decision diagnosis. **Acarologia**, v.57, n.3, p.493–515, 2017.

TIXIER, M.-S.; OKASSA, M.; KREITER, S. An integrative morphological and molecular diagnostics for *Typhlodromus pyri* (Acari: Phytoseiidae). **Zoologica Scripta**, v.41, p.68-78, 2012.

VAN LEEUWEN, T.; VANHOLME, B.; VAN POTTTELBERGE, S.; VAN NIEUWENHUYSE, P.; NAUEN, R.; TIRRY, L. et al., Mitochondrial heteroplasmy and the evolution of insecticide resistance: non-Mendelian inheritance in action. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, v.105, p.5980– 5985, 2008.

VAN LEEUWEN, T.; VAN NIEUWENHUYSE, P.; VANHOLME, B.; DERMAUW, W.; NAUEN, R.; TIRRY, L. Parallel evolution of cytochrome b mediated bifenazate resistance in the citrus red mite *Panonychus citri*. **Insect Molecular Biology**, v.20, p.135– 140, 2011.

VAN NIEUWENHUYSE, P.; VAN LEEUWEN, T.; KHAJEHALI, J.; VANHOLME, B.; TIRRY, L.; Mutations in the mitochondrial cytochrome b of *Tetranychus urticae* Koch (Acari: Tetranychidae) confer cross-resistance between bifenazate and acequinocyl. **Pest Management Science**, v.65, p.404– 412, 2009.

ZHANG, Z.Q. **Mites in greenhouse**: identification, biology and control. Cambridge: CABI Publishing, 244 pp., 2003.

CAPÍTULO 5 – ANÁLISE DE TRANSCRIPTOMA DE LINHAGENS DE *Phytoseiulus macropilis* (ACARI: PHYTOSEIIDAE) RESISTENTE E SUSCETÍVEL A PIRETROIDES

RESUMO

Detectou-se recentemente uma população de *Phytoseiulus macropilis* altamente resistente (RR > 5.000 vezes) a inseticidas piretroides. Estudos preliminares indicam o envolvimento de mais de um gene (poligênica) na resistência de *P. macropilis* ao piretroide fenpropathrin, com aumento na degradação metabólica por esterases e insensibilidade do alvo de ação (canais de sódio) na linhagem resistente do ácaro predador. O objetivo da pesquisa foi elucidar os mecanismos da resistência do fitoseídeo a piretroides, incluindo a análise de transcriptoma de linhagens S (suscetível) e R (resistente) de *P. macropilis*. Os ácaros predadores das linhagens S e R foram divididos em dois subgrupos: um controle (sem indução de resistência com fenpropathrin) e outro submetido à indução da resistência. Foram formados, portanto, quatro grupos de tratamentos: a) S controle (SC); b) R controle (RC); c) S induzido (SI); d) R induzido (RI). Foram separadas amostras com aproximadamente 450 ácaros. As amostras coletadas foram congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas em ultrafreezer a -80 °C. Amostras de RNA dos ácaros foram enviadas ao Laboratório Central de Tecnologias de Alto Desempenho em Ciências da Vida (LaCTAD) (UNICAMP) para a preparação das bibliotecas e o sequenciamento na plataforma HiSeq 2500 (Illumina). A montagem “de novo” do transcriptoma foi realizada usando o CLC Genomics Workbench (versão 6.5.2; Finlandsgade, Dk) com os seguintes parâmetros: similaridade (0,8) e comprimento (0,9). Foram utilizados os dados completos do sequenciamento, incluindo as quatro amostras para obter um genoma de referência. O total de contigs obtido foi de 48.736 ($N_{50} = 1582$). As reads de cada amostra (SC, SI, RC, RI) foram mapeadas no genoma de referência para a comparação dos níveis de expressão. Para a comparação dos tratamentos, utilizou-se o Kal’s Z-test, com dados transformados para log2. Foram observadas diferenças entre as proporções de expressão para as linhagens R e S de *P. macropilis*, indicando contrastes entre as linhagens estudadas. Os transcritos obtidos foram anotados após serem alinhados com o banco de dados de sequências não redundantes (nr) do NCBI. A identificação dos genes, ou grupos de genes, envolvidos na resistência de *P. macropilis* ao piretroide foi iniciada a partir dos resultados da anotação. Estão em andamento estudos de redes formadas por esses genes, para uma melhor compreensão das interações entre os mesmos e as respostas à exposição ao inseticida-acaricida.

Palavras-chave: Ácaro predador, resistência a inseticida, fenpropathrin

5.1 INTRODUÇÃO

A complexidade das pragas e sua dinâmica populacional têm demandado o uso de um amplo espectro de pesticidas, como piretróides, que causam mortalidade em massa de inimigos naturais. O uso de predadores resistentes é uma maneira de equilibrar pesticidas e controle biológico (CONG, 2016).

Ácaros predadores quimicamente resistentes foram relatados (SATO et al., 2000; AUGER et al., 2005; SALMAN; RECEP, 2013) e aplicados com sucesso no controle de pragas (HESSEIN et al., 1990; HOY, 1982; HLUCHY; ZACHARDA; GRADT, 1996). Alguns, inclusive, existentes à fenpropatrina já foram relatados. No entanto, o mecanismo molecular da resistência permanece desconhecido (CONG, 2016).

Estudos têm sido conduzidos sobre mecanismos de resistência química em insetos, alcançando importantes avanços. Dois mecanismos principais estão envolvidos na resistência à piretróide; resistência metabólica, envolvendo a detoxificação pelo citocromo P450s (P450s), glutathione-S-transferases (GSTs) e carboxilesterases; e alteração na proteína-alvo de ação do composto químico, como canais de sódio (VGSCs) via mutações (CASIDA, 2013).

No que se refere à resistência metabólica, a atenção tem sido focada nos genes P450 por seus papéis essenciais no metabolismo dos xenobióticos e na adaptabilidade evolutiva. Mais de 3452 genes P450 foram submetidos ao NCBI (AI et al., 2011; FEYEREISEN, 2011; YANG, 2011).

Mutações no canal de sódio, a chamada resistência ao knockdown (kdr), são essenciais para reduzir a sensibilidade do sistema nervoso dos insetos / ácaros aos piretróides. Desde que o primeiro fenômeno kdr foi observado em moscas domésticas em 1993 (WILLIAMSON, 1993) mais de 50 artrópodes foram documentados com uma ou mais mutações de sódio associadas à resistência nas últimas duas décadas (RINKEVICK; DU; DONG, 2013; DONG; DU; RINKEVICK, 2014). No entanto, apenas cinco ácaros de Acarina, *V. destructor* (GONZÁLEZ-CABRERA, 2013) *T. evansi* (NYONI et al., 2011) *T. urticae* (KWON; CLARK; LEE, 2010), *T. cinnabarinus* (FENG et al., 2011) e *Panonychus citri* (DING et al., 2015) relataram mutações no canal de sódio, sugerindo que mais pesquisas sobre resistência a kdr em ácaros são necessárias.

A análise de transcriptomas tem sido cada vez mais usada para identificar genes relacionados à resistência em muitos insetos (WEI et al., 2013). No entanto, mesmo com o avanço dessa ferramenta, a tecnologia não foi amplamente explorada na Acarologia. Apenas *Metaseiulus occidentalis* (HOY et al., 2013) e o *Phytoseiulus persimilis* (CABRERA et al.,

2011) foram seqüenciados e relatados, porém, sem uma abordagem voltada para a resistência química.

O objetivo da pesquisa foi elucidar os mecanismos da resistência do fitoseídeo a piretroides, incluindo a análise de transcriptoma de linhagens S (suscetível) e R (resistente) de *P. macropilis*.

5.2 MATERIAL E MÉTODOS

5.2.1 Criação de manutenção das populações de ácaros

A população original do predador *P. macropilis* resistente a piretroides (R), coletada em uma lavoura comercial de morango (*Fragaria* spp.) no município de Socorro (22°35'S, 46°31'W), SP, em setembro de 2010, foi mantida em laboratório sob pressão de seleção para resistência a fenpropathrin.

A população original suscetível (S), coletada em uma lavoura comercial de chuchu (*Sechium edule* Sw) no município de Amparo (22°52'S, 46°59'W), SP, livre da aplicação de pesticidas para o controle de pragas, foi mantida em local separado.

As linhagens S e R do predador foram mantidas em plantas de feijão-de-porco (*Canavalia ensiformis* L.), infestadas com *T. urticae*, cultivadas em vasos de 500 mL, em salas climatizadas ($25 \pm 1^\circ\text{C}$, $70 \pm 5\%$ de UR, fotofase de 12 horas) no Laboratório de Acarologia, do Centro Avançado de Pesquisa em Proteção de Plantas e Saúde Animal (CAPSA) do Instituto Biológico, em Campinas, SP.

A linhagem R, selecionada para resistência, mostrou-se 5.300 vezes mais resistente a fenpropathrin que a linhagem S de referência (QUEIROZ; SATO, 2016).

5.2.2 Coleta das amostras

Os ácaros predadores das linhagens S (suscetível) e R (resistente), já descritas no item 4.1, foram divididos em dois subgrupos: um controle (sem exposição à fenpropathrin) e outro induzido (com exposição) conforme descrito a seguir. Foram formados, portanto, quatro grupos de tratamentos: a) S controle (SC); b) R controle (RC); c) S induzido (SI); d) R induzido (RI).

5.2.2.1 Coleta das amostras controle SC e RC (sem exposição a fenpropathrin)

Para a captura dos ácaros, foram montadas armadilhas com garrafas PET de 350 mL e tubos tipo Falcon de 15 mL (Figura 19).



Figura 19. Armadilhas para a coleta de amostras de ácaros predadores sem indução, feitas com garrafas PET de 350 mL e tubos tipo Falcon de 15 mL.

Foram preparadas 10 armadilhas para cada linhagem (R e S). Em cada armadilha foram colocadas 4 folhas de feijão de porco infestadas com ácaros predadores. As armadilhas foram mantidas por 24 horas e os tubos foram trocados a cada 6 horas. Em seguida, os tubos foram retirados, fechados e mergulhados em LN2 (nitrogênio líquido) para congelamento. Os ácaros foram contados, separados em amostras de 250 a 600 indivíduos e colocadas em tubos tipo eppendorf de 1,5 mL. As amostras foram armazenadas em ultrafreezer a -80°C . Foram utilizadas 16 amostras, sendo 7 do grupo SC e 9 do RC.

5.2.2.2 Coleta das amostras com exposição à fenpropathrin

Para a coleta das amostras com indução, foi necessário utilizar outro modelo de armadilha, maior, com aberturas para circulação de ar, para evitar o acúmulo de umidade e vapores tóxicos, o que causaria alta mortalidade. Foi desenvolvida uma armadilha com garrafa PET de 2 litros, com aberturas nas partes inferior e superior, acoplada a um tubo tipo Falcon de 15 mL (Figura 20).

Para as amostras com indução, a quantidade de ácaros por amostra foi definida em função dos resultados obtidos nas extrações de RNA das amostras sem indução (ver item 5.2.3.1 Extração de RNA). Foram separadas amostras com 450 ácaros aproximadamente, tanto no grupo SI, quanto no RI.



Figura 20. Armadilha para a coleta das amostras de ácaros com indução, feitas com garrafas PET de 2 L e tubos tipo Falcon de 15 mL.

a) Indução e coleta de amostras na linhagem S (SI)

Para a indução na linhagem S foi necessário definir uma concentração não letal máxima do piretróide, suficiente para induzir a resposta à exposição sem causar mortalidade significativa. Para tal, foi conduzido um bioensaio preliminar utilizando-se cinco concentrações de calda: 0,018 a 0,3 mg i.a./L. Com este teste também foi possível confirmar a ausência de indivíduos R na população.

Foram montadas arenas de folhas de feijão-de-porco (4 cm de diâmetro), mantidas sobre uma camada de algodão hidrofílico úmido em uma placa de Petri (9 cm de diâmetro). A borda de cada folha foi coberta por uma faixa de algodão úmido, formando uma barreira para evitar a fuga dos ácaros. Foram transferidos 10 ácaros para cada arena e foi feita uma pulverização em torre de Potter (Burkard Scientific, Uxbridge, UK) calibrada a 68,9 kPa. Foi utilizado um volume de calda de 2 mL, o que corresponde a uma deposição média de resíduo úmido de 1,6 mg/cm² de arena. Após a pulverização, os ácaros foram transferidos para tubos de vidro de 10 x 1,2 cm de diâmetro, que foram fechados em seguida, com parafilme, para evitar a fuga dos predadores (Figura 20).

A mortalidade foi avaliada após 24 horas, com auxílio de um microscópio estereoscópico (40x), sendo considerado morto o indivíduo que se manteve imóvel ao estímulo gerado pelo toque de um pincel.

A concentração definida para a indução da resistência na linhagem S foi de 0,03 mg i.a./L.



Figura 21. Teste para definição da concentração não letal máxima em linhagem S de *Phytoseiulus macropilis*.

Para a coleta das amostras da linhagem S com indução (SI) foram colocadas, em cada armadilha, duas folhas de feijão de porco infestadas com predadores e previamente pulverizadas com a calda acaricida na concentração definida, num total de 8 armadilhas. Duas amostras foram separadas, uma com 451 e outra com 462 ácaros. As amostras foram armazenadas em ultrafreezer a -80°C .

b) Indução e coleta de amostras na linhagem R (RI)

No caso das amostras do grupo RI, foi utilizada a concentração discriminatória de 300 mg i.a./L, que elimina praticamente 100% dos indivíduos suscetíveis sem afetar os resistentes. Essa concentração foi definida baseando-se nos resultados da análise de Probit para as curvas concentração-resposta dos testes feitos com a linhagem R e a linhagem S de referência. Desse modo, juntamente com a indução, foi feita uma pressão de seleção, o que evitou a contaminação das amostras com indivíduos S.

Para a coleta das amostras da linhagem R com indução (RI) foram colocadas, em cada armadilha, duas folhas de feijão de porco infestadas com predadores e previamente pulverizadas com a calda acaricida na concentração discriminatória, num total de 8 armadilhas. As amostras foram separadas e armazenadas em ultrafreezer a -80°C .

5.2.3 Análise do transcriptoma

Esta parte do trabalho foi realizada no Laboratório de Análise Genética Molecular (LAGM), Centro de Biologia Molecular e Engenharia Genética (CBMEG), na Unicamp, sob a supervisão da Dra. Maria Augusta Crivelente Horta.

5.2.3.1 Extração de RNA

As amostras foram transportadas em caixa de isopor com gelo seco, para manter a temperatura a aproximadamente -80°C . A extração do RNA seguiu o método de extração desenvolvido por Chomczynski e Sacchi (1987).

Foi extraído o RNA de amostras com aproximadamente 450 ácaros, dos quatro grupos já descritos: a) S controle (SC); b) R controle (RC); c) S induzido (SI); d) R induzido (RI).

As amostras foram maceradas em gral com pistilo de porcelana e a extração foi feita com Trisol reagent seguindo a orientação do fabricante. Os peletes de RNA foram ressuspensos em 30 μL água ultrapura.

Nos procedimentos foi usado material novo, próprio para trabalho em biologia molecular. Todo o material foi esterilizado em autoclave e a secagem feita em estufa a 37°C .

Após a extração, foi feita a leitura da absorbância em espectrofotômetro Nanodrop, para quantificar o RNA total na amostra e obter os valores de A260/A280 e A260/A230, indicativos de qualidade e presença de contaminantes. Em seguida, foi feita a corrida em gel de agarose, para verificar a integridade do RNA.

Quatro amostras de RNA foram enviadas ao Laboratório Central de Tecnologias de Alto Desempenho em Ciências da Vida (LaCTAD) (UNICAMP) para a preparação das bibliotecas e o sequenciamento na plataforma HiSeq 2500 (Illumina).

- 1) amostra SC: 5 μL de amostra com 414 ng/ μL , resultando 2.070ng de RNA total
- 2) amostra RC: 6 μL de amostra com 392 ng/ μL , resultando 2.352ng de RNA total
- 3) amostra SI: 5 μL de amostra com 515 ng/ μL , resultando 2.575ng de RNA total
- 4) amostra RI: 5 μL de amostra com 497 ng/ μL , resultando 2.480ng de RNA total

5.2.3.2 Sequenciamento

A qualidade das amostras é um dos fatores mais críticos no sequenciamento. A qualidade do resultado do sequenciamento é diretamente proporcional à qualidade das amostras. Por isso, todas as amostras recebidas no LaCTAD são primeiramente avaliadas utilizando-se o equipamento Bioanalyser 2100 da Agilent para verificar a sua pureza e

integridade. Para amostras de RNA é obtido o RIN (RNA Integrity Number) que deve ser maior ou igual a 8.

As amostras íntegras seguem para quantificação no equipamento Qubit® da Thermo Fisher para verificar se apresentam a massa/concentração mínima necessária para a preparação das bibliotecas.

A massa/concentração mínima necessária para o preparo das bibliotecas é 2.000 ng em um volume máximo de 50 µL de água ultrapura.

O sequenciamento foi feito em equipamento Illumina HiSeq 2500, utilizando o modo paired-end, 105bp.

5.2.3.3 Transcriptoma

Os arquivos com os resultados do sequenciamento enviados pelo LaCTAD foram descompactados para obter os arquivos das reads em formato fastq.

Os dados foram transferidos para um servidor local de computação de alto desempenho no CBMEG (Unicamp) e foram feitos testes de qualidade (trimming).

A montagem “de novo” do transcriptoma foi realizada usando o *CLC Genomics Workbench* (versão 6.5.2; Finlandsgade, Dk) com os seguintes parâmetros: similaridade = 0,8 e comprimento de = 0,9. Foram utilizados os dados completos do sequenciamento, incluindo as 4 amostras para obter um genoma de referência.

As *reads* de cada amostra (SC, SI, RC, RI) foram mapeadas no genoma de referência para comparar os níveis de expressão.

5.2.3.4 Anotação funcional e ontologia gênica (GO)

A anotação funcional da proteína predita pela tradução da sequência de nucleotídeos dos transcritos obtidos foi comparada com transcritos já descritos no banco de dados não-redundantes (nr) de nucleotídeos do NCBI. Esse trabalho foi conduzido com a ajuda do Prof. Marcelo Brandão, do Laboratório de Biologia Integrativa e Sistêmica (CBMEG, Unicamp).

5.2.3.5 Análise de expressão gênica

Foi feita a análise de RNA-Seq a partir do software CLC Genomic Workbench (CLC Bio).

As *reads* provenientes do sequenciamento foram alinhadas à montagem de novo do transcriptoma, usado como referência. Esse alinhamento visa contar quantas reads provenientes de cada gene estão presentes nos dados sequenciados, gerando uma medida de

expressão relativa de todos os genes de cada subgrupo, ou seja, quantas leituras semelhantes por kilobase (kb) do alvo por milhão de leituras mapeadas (RPKM).

Foi feita a normalização usando o método TPM (transcritos por milhão), que corrige basicamente para o tamanho das bibliotecas e dos genes, em um dos 4 testes pareados. Porém, não houve grande diferença, uma vez que as bibliotecas são de tamanhos muito próximos. Então, optou-se em continuar a análise usando os valores de RPKM.

Os transcritos com expressão relativa (RPKM) diferente de zero foram usados para construir um Diagrama de Venn (HEBERLE, 2015).

Com essa análise do conjunto de dados buscamos ter uma visão geral dos transcritos expressos em cada grupo estudado (SC, RC, SI e RI).

Para analisar os dados de expressão gênica é necessário identificar genes com padrões de expressão diferentes de acordo com o fenótipo estudado ou condição experimental. O sistema de expressão gênica é um sistema bem coordenado, onde os valores de expressão de cada gene variam em conjunto, não individualmente.

A grande dimensão dos dados de expressão gênica dificulta a compreensão, além do fato de que nosso conhecimento sobre sistemas biológicos é ainda muito limitado. Muitas vezes não sabemos quais relações são importantes e devem ser estudadas.

Optou-se em verificar, em primeiro lugar, os transcritos expressos apenas em cada um dos grupos, e não nos outros, visando identificar as diferenças básicas entre os mesmos. Em seguida foram verificados os transcritos expressos somente em SC e SI, e em RC e RI. Aqui o objetivo foi focar a busca na diferença entre as linhagens R e S, somando os tratamentos controle e induzido.

5.3 RESULTADOS

5.3.1 Análise do transcriptoma de *Phytoseiulus macropilis* (ATPm)

5.3.1.1 Sequenciamento

O relatório sobre a qualidade do sequenciamento das amostras de RNA feito pelo Lactad pode ser visto na Tabela 8. Esse relatório mostra a quantidade de leituras com “score” de qualidade maior ou igual a Q30.

Tabela 8. Relatório do Lactad mostrando quantidade de leituras com “score” de qualidade maior ou igual a Q30.

Lane	Amostra	Reads	% Bases \geq Q30
8	RC	121.706.926	89,40
8	RI	148.828.786	89,78
8	SC	111.979.494	88,43
8	SI	174.775.138	89,36

O total de contigs obtido foi de 48.736 ($N_{50} = 1582$).

5.3.1.2 Anotação funcional e ontologia gênica

A partir dos 48.736 transcritos obtidos, apenas 14.605 (29,97%) puderam ser anotados, 220 dos quais possivelmente relacionados com resistência (Anexo 1 - ATPm). A designação funcional pela análise da ontologia gênica (GO) dos 14.605 transcritos anotados mostrou a seguinte divisão nas categorias: 1) Funções moleculares, com 1.389 transcritos identificados. 2) Componentes celulares, com 5.195 transcritos identificados; 3) Processos biológicos, com 5.603 transcritos identificados, totalizando 12.187. Foram identificados 97 transcritos possivelmente relacionados com resistência (Anexo 2 - ATPm).

No anexo 3 são mostrados os transcritos com expressão relativa diferente de zero que puderam ser anotados (Anexo 3 - ATPm).

A montagem do transcriptoma foi concluída. Porém, testes ainda estão sendo feitos e os resultados estudados. O volume de dados é muito grande e muitos aspectos ainda precisam ser analisados. Até agora foi feito um estudo geral para um primeiro entendimento do transcriptoma.

5.3.1.3 Níveis de expressão (RPKM)

No gráfico de Venn (Figura 22) são mostrados os transcritos com expressão relativa (RPKM) diferente de zero. Com essa análise do conjunto de dados buscamos ter uma visão geral dos transcritos expressos em cada grupo estudado (SC, RC, SI e RI).

Pode-se observar um primeiro padrão de expressão. Os subgrupos controle (SC e RC) apresentam número de transcritos expressos bem próximos (25.599 e 26.194 respectivamente), sendo que a proporção é mantida para os expressos apenas em cada um dos

subgrupos, sendo 1.977 expressos somente em SC e 2.153 em RC. Os subgrupos induzidos (SI e RI) apresentam número maior de transcritos expressos (32.109 e 29.219). O número de transcritos expressos somente em SI foi 2.555 enquanto o de RI foi 1.536. De todos os transcritos mapeados, 17.554 foram expressos nos 4 subgrupos.

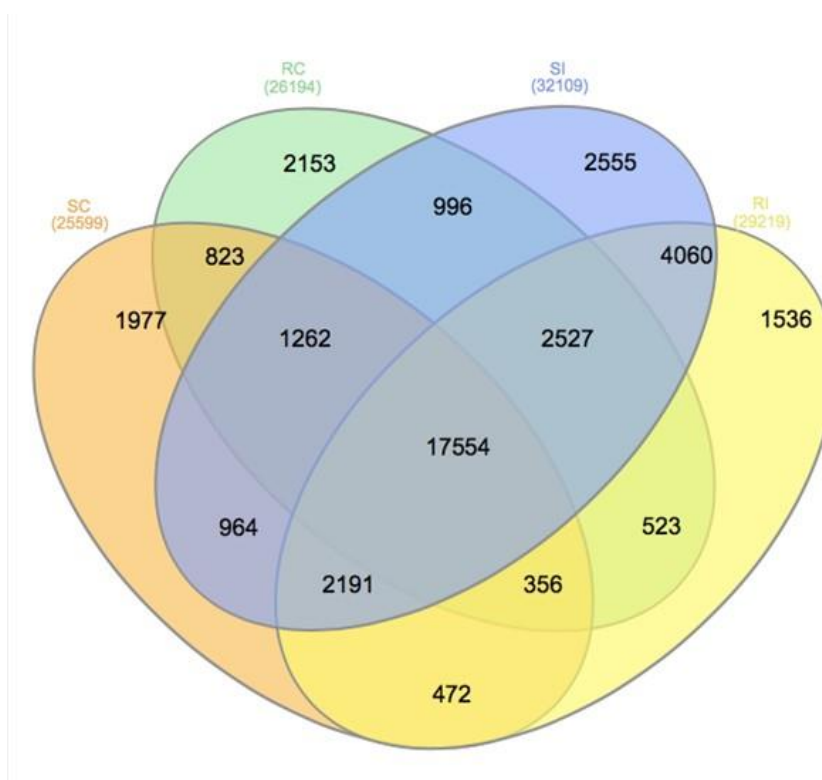


Figura 22. Distribuição de transcritos expressos nas linhagens resistente e suscetível de *P. macropilis*, com e sem indução.

Estudos preliminares (com sinergistas) indicam envolvimento de esterases na resistência de *P. macropilis* a piretroides, com possível custo adaptativo associado à linhagem R do ácaro predador. Insensibilidade do alvo de ação (canais de sódio) também parece estar envolvida nessa resistência (QUEIROZ; SATO, 2016).

5.3.1.4 Expressão diferencial

Os resultados *Kal's t-test* em pares nos dados normalizados e transformados em log2 são apresentados na Figura 23.

Observaram-se diferenças entre as proporções de expressão para as linhagens R e S de *P. macropilis*, considerando-se RC x SC [R controle (sem indução) (RC); S controle (SC)] e RI x SI [R induzido (RI); S induzido (SI)], indicando contrastes entre as linhagens estudadas,

havendo, porém, a necessidade da continuação das análises para verificação de quais fatores (genes) estão associados à resistência a piretroides.

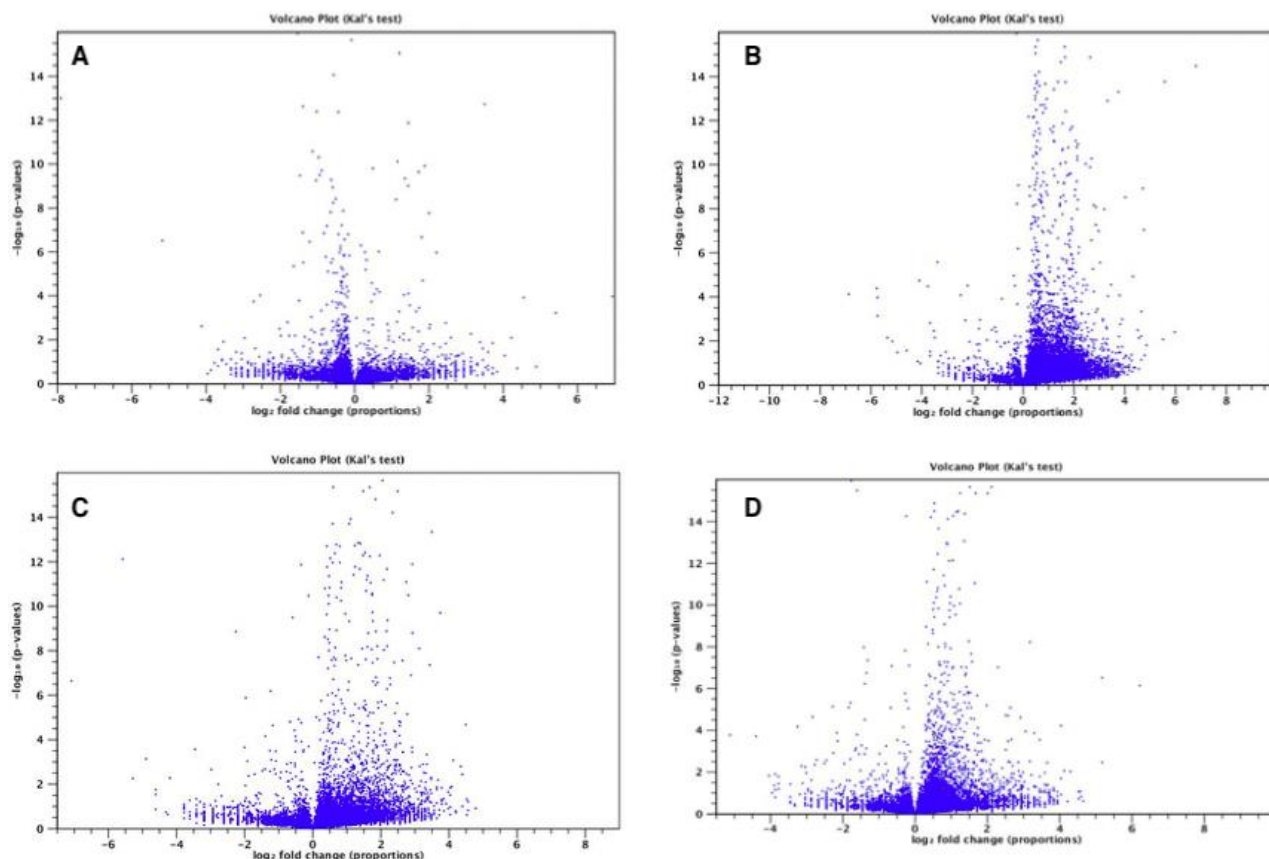


Figura 23: Kal's *t*-test: A) RC x SC [R controle (RC); S controle (SC)]; B) RI x SI [R induzido (RI); S induzido (SI)]; C) SC x SI [S controle (SC); S induzido (SI)]; D) RI x RC [R induzido (RI); R controle (RC)].

Observando a figura acima, verifica-se que a maioria dos transcritos tem expressão diferencial na faixa entre -2 e 2 (\log_2 "fold change"). Ainda para um estudo mais refinado, visando enxergar os genes diferencialmente mais expressos, foi usado um filtro excluindo os valores de "fold change" entre -2 e 2, o que significa diferença de pelo menos 2x nos níveis de expressão entre os pares testados.

Foram identificados 1.502 transcritos com expressão diferencial ($P \leq 0,05$, *t*- test; fold change > 2), nos 4 pares testados, conforme descrito a seguir:

- RC x SC: 68 transcritos superexpressos em RC (2 a 240 vezes) e 83 supressos (2 a 123 vezes).
- RI x RC: 99 transcritos superexpressos em RI (2 a 40 vezes) e 276 supressos (2 a 874 vezes).

- RI x SI: 52 transcritos superexpressos em RI (2 a 4.149 vezes) e 688 supressos (2 a 640 vezes).
- SC x SI: 236 transcritos superexpressos em SI (4 a 470 vezes).

A distribuição dos transcritos diferencialmente expressos nos 4 pares testados é mostrada na Figura 24.

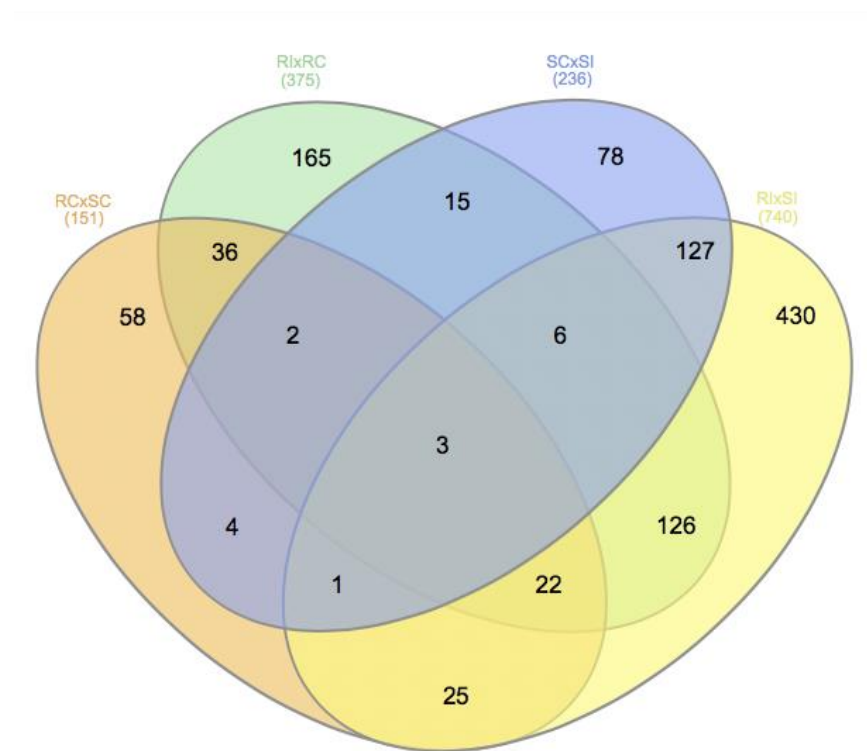


Figura 24. Distribuição de transcritos diferencialmente expressos nos pares RC x SC, RI x SC, SC x SI, RI x SI.

5.4 DISCUSSÃO

A partir de 48.736 transcritos obtidos na análise do transcriptoma de *P. macropilis*, apenas 14.605 (29,97%) puderam ser anotados, 220 dos quais são possivelmente relacionados com resistência a pesticidas.

A designação funcional pela análise da ontologia gênica (GO) dos 14.605 transcritos anotados mostrou 1.389 transcritos identificados na categoria “funções moleculares”, 5.192 na categoria “componentes celulares” e 5.195 na categoria “processos biológicos”. Foram identificados 97 transcritos possivelmente relacionados com a resistência de *P. macropilis* a

piretróides. Aproximadamente 70% dos transcritos são desconhecidos ou não caracterizados, o que deixa uma base de análise muito reduzida.

Citocromo P450 foi o grupo enzimático relacionado à resistência com maior número de transcritos expressos, com um total de 93. Foi também o mais representado nos sub-grupos individualmente, com expressão maior na linhagem S (3 em SC e 5 em SI) do que na R (2 em RC e 1 em RI), o que sugere ser o CYP450 mais importante para a detoxificação de fenpropatrin na população susceptível.

Pouco se sabe sobre CYP450 em ácaros predadores. Cong, 2016 identificou 43 genes CYP450 em uma linhagem de *Neoseiulus barkeri* (Acari: Phytoseiidae) selecionada para resistência a fenpropatrin, número inferior ao encontrado, por exemplo, em *T. urticae* (Acari: Tetranychidae) e *Panonychus citri* (Acari: Tetranychidae), 86 (GRBIC et al., 2011) e 121 (LIU et al., 2011) respectivamente. O número reduzido de transcritos encontrados no nosso estudo deve-se, provavelmente, ao fato de 70 % do transcriptoma ser desconhecido ou não caracterizado.

Há fortes indícios de que as enzimas desse grupo estejam envolvidas na resistência química devido a seus altos níveis de expressão em populações resistentes de ácaros e insetos praga. Altos níveis de expressão de CYP4M6, CYP4M7, CYP4L5 e CYP4L11 foram demonstrados como a principal causa de resistência à deltametrina em *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) (BRUN-BARALE et al., 2010). Porém, parece não ser o caso da linhagem resistente de *P. macropilis* aqui estudada. Foram identificados 5 transcritos relacionados ao grupo enzimático das Citocromo-oxidases apenas no sub-grupo RC.

Diferentes mutações foram relatadas no CytB para explicar a resistência a bifenazato, acequinocil e inibidores de Qo para *T. urticae* e *Panonychus ulmi* Koch (VAN LEEUWEN et al. 2008, 2011; VAN NIEUWENHUYSE et al., 2009; FOTOUKKIAII et al., 2020), nada tendo sido relatado em relação à piretróides.

Em estudo sobre estrutura populacional com o marcador Cytb mtDNA observamos diferenças entre populações R e S, conforme demonstrado capítulo 4. Porém, as mutações, mesmo identificando populações resistentes, não estão necessariamente relacionadas à expressão da resistência em si, sendo esse fragmento mais provavelmente um marcador de DNA neutro.

Transcritos relacionados ao canal de sódio foram identificados nos dois subgrupos da linhagem S. No subgrupo SI foram identificadas duas esterases.

A resistência à fenpropatrina pode envolver uma diminuição da sensibilidade do local direcionado à fenpropatrina e um aumento na taxa de desintoxicação ao mesmo tempo, como

descrito em *N. barkeri* (Cong, 2016) e em *T. cinnabarinus* (FENG et al., 2011; SHEN et al., 2014). No entanto, a resistência química permite aos artrópodes a chance de sobreviver, mas é preciso considerar os custos em termos de fecundidade e / ou tempo de vida.

Estudos preliminares (com sinergistas) indicam envolvimento de esterases na resistência de *P. macropilis* a piretroides, com possível custo adaptativo associado à linhagem R do ácaro predador. Insensibilidade do alvo de ação (canais de sódio) também parece estar envolvida nessa resistência (QUEIROZ; SATO, 2016).

Analisando os resultados de expressão diferencial, observamos uma grande diferença entre os subgrupos (RI e SI). Um total de 52 transcritos estão superexpressos em RI (2 a 4.149 vezes) e 688 em SI (2 a 640). Esses resultados indicam que a resistência a fenpropatrin é determinada por um número não muito grande de genes, com uma grande diferencial de expressão, concordando com resultados obtidos por outros autores para insetos e ácaros (MARTINEZ-TORRES et. al, 1998; RANSON et al., 2000; CHENG et al., 2019).

A montagem do transcriptoma foi concluída. Porém, testes ainda estão sendo feitos e os resultados estudados. O volume de dados é muito grande e muitos aspectos ainda precisam ser analisados. Até agora foi feito um estudo geral para um primeiro entendimento do transcriptoma.

Uma melhor compreensão da genética e dos mecanismos evolutivos da resistência aos piretróides em *P. macropilis* proporcionará um melhor manejo de populações resistentes do ácaro predador a pesticidas.

5.5 CONCLUSÕES

A partir de 48.736 transcritos obtidos na análise do transcriptoma de *P. macropilis*, apenas 14.605 (29,97%) puderam ser anotados, 220 dos quais são possivelmente relacionados com resistência a pesticidas. Aproximadamente 70% dos transcritos são desconhecidos ou não caracterizados, o que deixa uma base de análise muito reduzida.

As linhagens R e S apresentaram resultados diferentes quanto aos grupos enzimáticos diferencialmente expressos.

Na linhagem R foram identificados poucos transcritos com alto nível de expressão diferencial, indicando que provavelmente poucos genes estão envolvidos na resistência de *P. macropilis* a piretróides.

5.6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AI, J. W.; ZHU, Y.; DUAN, J.; YU, Q. Y.; ZHANG, G. J.; WAN, F.; XIANG, Z. H. Genome-wide analysis of cytochrome P450 monooxygenase genes in the silkworm, *Bombyx mori*. **Gene**, v.480, p.42-50, 2011.
- AUGER, P.; BONAFOS, R.; KREITER, S.; DELORME, R. A genetic analysis of mancozeb resistance in *Typhlodromus pyri* (Acari: Phytoseiidae). **Experimental and Applied Acarology**, v.37, p.83–91, 2005
- BRUN-BARALE, A.; HÈMA, O.; MARTIN, T.; SURAPORN, S.; AUDANT, P.; SEZUTSU, H.; FEYEREISEN, R. Multiple P450 genes overexpressed in deltamethrin-resistant strains of *Helicoverpa armigera*. **Pest Management Science**, v.66, p.900-909, 2010.
- CABRERA, A. R.; DONOHUE, K. V.; KHALIL, S. M. S.; SCHOLL, E.; OPPERMAN, C.; SONENSHINE, D. E.; ROE, R. M. New approach for the study of mite reproduction: The first transcriptome analysis of a mite, *Phytoseiulus persimilis* (Acari: Phytoseiidae). **Journal Insect Physiology**, v.57, p.52–61, 2011.
- CASIDA, J. E.; DURKIN, K. A. Neuroactive insecticides: Targets, selectivity, resistance, and secondary effects. **Annual Review of Entomology**, v. 58, p.99-117, 2013.
- CHENG, X.; UMINA, P. A.; LEE, S. F.; HOFFMANN, A. A. Pyrethroid resistance in the pest mite, *Halotydeus destructor*: Dominance patterns and a new method for resistance screening. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v.159, p.9-16, 2019.
- CONG L., Chen F.; YU, S.; DING, L.; YANG, J.; LUO R.; TIAN, H. ; Li, H.; Liu, H.; CHUN Ran, C. Transcriptome and difference analysis of fenpropathrin resistant predatory mite, *Neoseiulus barkeri* (Hughes) **International Journal of Molecular Sciences**, v.17, p.704, 2016 doi:10.3390/ijms17060704
- DING, T. B.; ZHONG, R.; JIANG, X. Z.; LIAO, C. Y.; XIA, W. K.; LIU, B.; DOU, W.; WANG, J. J. Molecular characterisation of asodiumchannelgene and identification of a Phe1538 to Ile mutation in citrus red mite, *Panonychus citri*. **Pest Management Science**, v.71, p.266-277, 2015.
- DONG, K.; DU, Y. Z.; RINKEVICH, F.; NOMURA, Y.; XU, P.; WANG, L. X.; KRISTOPHER, S.; BORIS, S. Z. Molecular biology of insect sodium channels and pyrethroid resistance. **Insect Biochemistry Molecular Biology**, v.50, p.1-17, 2014.

FENG, Y. N.; ZHAO, S.; SUN, W.; LI, M.; LU, W.C.; HE, L. The sodium channel gene in *Tetranychus cinnabarinus* (Boisduval): Identification and expression analysis of a mutation associated with pyrethroid resistance. **Pest Management Science**, v.67, p.904-912, 2011.

FEYEREISEN, R. Arthropod CY Pomes illustrate the tempo and mode in P450 evolution. *Biochimica et Biophysica Acta*, v.1814, p.19-28., 2011.

FOTOUKKIAII, S. M.; TAN Z.; XUE, W.; WYBOUW, N.; VAN LEEUWEN, T. Identification and characterization of new mutations in mitochondrial cytochrome b that confer resistance to bifenazate and acequinocyl in the spider mite *Tetranychus urticae*. **Pest management science**, v.73, n.3, p.1154-1163, 2020.

GONZÁLEZ-CABRERA, J.; DAVIES, T. G.; FIELD, L. M.; KENNEDY, P. J.; WILLIAMSON, M. S. An amino acid substitution (L925V) associated with resistance to pyrethroids in *Varroa destructor*. **PLoS ONE**, v.8, e0082941, 2013.

GRBIC', M.; VAN LEEUWEN, T.; CLARK, R. M.; ROMBAUTS, S.; ROUZÉ, P.; GRBIC', V.; OSBORNE, E. J.; DERMAUW, W.; THI NGOC, P. C.; ORTEGO, F.; *et al.* The genome of *Tetranychus urticae* reveals herbivorous pest adaptations. **Nature**, v.479, p.487–492, 2011.

HEBERLE, H.; MEIRELLES, G.V.; DA SILVA, F. R.; TELLES, G.P.; MINGHIM, R. Interact Venn: a web-based tool for the analysis of sets through Venn diagrams. **BMC Bioinformatics**, v.16, p.169, 2015.

HESSEIN, N. A.; PARRELLA, M. P. Predatory mites help control thrips on floriculture crops. **California Agriculture**, v.44, p.19–21, 1990.

HLUCHÝ, M.; ZACHARDA, M.; GRADT, P. Results of large-scale releases of predatory phytoseiid mite, *Typhlodromus pyri*, an OP-resistance population Mikulov, in apple or chards in South Tyrol and France. **Acta Horticulturae**, v.422, p.223-225, 1996.

HOY, M.A. Large-scale releases of pesticide-resistant spider mite predators. **California Agriculture**, v.36, p.8-10, 1982.

HOY, M.A.; YU, F.H.; MEYER, J.M.; TARAZONA, O.A.; JEYAPRAKASH, A.; WU, K. Transcriptome sequencing and annotation of the predatory mite *Metaseiulus occidentalis*

(Acari: Phytoseiidae): A cautionary tale about possible contamination by prey sequences. **Experimental and Applied Acarology**, v.59, p.283-296, 2013.

KWON, D.H.; CLARK, J.M.; LEE, S.H. Cloning of a sodium channel gene and identification of mutations putatively associated with fenpropathrin resistance in *Tetranychus urticae* **Biochemistry and Physiology** v.97, p.93-100, 2010.

LIU, B.; JIANG, G. F.; ZHANG, Y. F.; LI, J. L.; LI, X. J.; YUE, J. S.; CHEN, F.; LIU, H. Q.; LI, H. J.; RAN, C. Analysis of transcriptome differences between resistant and susceptible strains of the citrus red mite *Panonychus citri* (Acari: Tetranychidae). **PLoS ONE**, v.6, e0028516, 2011.

LIU, Y.; WU, H. Y.; XIE, Q.; BU, W. J. Novel detection of insecticide resistance related P450 genes and transcriptome analysis of the hemimetabolous pest *Erthesina fullo* (Thunberg) (Hemiptera: Heteroptera). **PLoS ONE**, v.10, e0125970, 2015.

MARTINEZ-TORRES, D.; CHANDRE, F.; WILLIAMSON, M. S.; DARRIET, F.; BERGÉ, J.B.; DEVONSHIRE, A. L.; GUILLET, P.; PASTEUR, N.; PAURON, D. Molecular characterization of pyrethroid knockdown resistance (kdr) in the major malaria vector *Anopheles gambiae* s.s. **Insect Molecular Biology**, v.7, n.2, p.179-184, 1998.

NYONI, B. N.; GORMAN, K.; MZILAHOWA, T.; WILLIAMSON, M. S.; NAVAJAS, M.; FIELD, L. M.; BASS, C. Pyrethroid resistance in the tomato red spider mite, *Tetranychus evansi*, is associated with mutation of the *para*-type sodium channel. **Pest Management Science**, v.7, p.891-89, 2011.

QUEIROZ, M.C.V.; SATO, M.E. Pyrethroid resistance in *Phytoseiulus macropilis* (Acari: Phytoseiidae): cross-resistance, stability and effect of synergists. **Experimental and Applied Acarology**, v.68, n.1, p.71-82, 2016.

RANSON, H.; JENSEN, B.; VULULE, J. M.; WANG, X.; HEMINGWAY, J.; COLLINS, F. H. Identification of a point mutation in the voltage-gated sodium channel gene of Kenyan *Anopheles gambiae* associated with resistance to DDT and pyrethroids. **Insect Molecular Biology**, v.9, n.5, p.391-497, 2000.

RINKEVICH, F. D.; DU, Y. Z.; DONG, K. Diversity and convergence of sodium channel mutations involved in resistance to pyrethroids. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v.106, p.93-100, 2013.

SALMAN, S. Y.; RECEP, A. Y. Analysis of hexythiazox resistance mechanisms in a laboratory selected predatory mite *Neoseiulus californicus* (Acari: Phytoseiidae). **Turkiye Entomologi Dergisi-Turkish**, v.37, p.409-422, 2013.

SATO, M. E.; MIYATA, T.; KAWAI, A.; NAKANO, O. Selection for resistance and susceptibility to methidathion and cross resistance in *Amblyseius wormersleyi* Schicha (Acari: Phytoseiidae). **Applied Entomology Zoology**, v.35, p.393-399, 2000.

SHEN, G. M.; SHI, L.; XU, Z. F.; HE, L. Inducible expression of Mu-class glutathione S-transferases is associated with fenpropathrin resistance in *Tetranychus cinnabarinus*. **International Journal of Molecular Science**, v.15, p.22626-22641, 2014.

VAN LEEUWEN, T.; VAN NIEUWENHUYSE, P.; VANHOLME, B.; DERMAUW, W.; NAUEN, R.; TIRRY, L. Parallel evolution of cytochrome b mediated bifenazate resistance in the citrus red mite *Panonychus citri*. **Insect Molecular Biology**, v.20, p.135-140, 2011.

VAN LEEUWEN, T.; VANHOLME, B.; VAN POTTTELBERGE, S.; VAN NIEUWENHUYSE, P.; NAUEN, R.; TIRRY, L. et al., Mitochondrial heteroplasmy and the evolution of insecticide resistance: non-Mendelian inheritance in action. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, v.105, p.5980-5985, 2008.

VAN NIEUWENHUYSE, P.; VAN LEEUWEN, T.; KHAJEHALI, J.; VANHOLME, B.; TIRRY, L.; Mutations in the mitochondrial cytochrome b of *Tetranychus urticae* Koch (Acari: Tetranychidae) confer cross-resistance between bifenazate and acequinocyl. **Pest Management Science**, v.65, p.404-412, 2009.

WEI, D. D.; CHEN, E. H.; DING, T. B.; CHEN, S. C.; DOU, W.; WANG, J. J. *De novo* assembly, gene annotation, and marker discovery in stored-product pest *Liposcelis entomophila* (Enderlein) using transcriptome sequences. **PLoS ONE** v.8, e0080046, 2013.

WILLIAMSON, M. S.; DENHOLM, I.; BELL, C. A.; DEVONSHIRE, A. L. Knockdown resistance (*kdr*) to DDT and pyrethroid insecticides maps to a sodium channel gene locus in the housefly (*Musca domestica*). **Molecular and General Genetics**, v. 240, p.17-22, 1993.

YANG, T.; LIU, N. N. Genome analysis of cytochrome P450s and their expression profiles in insecticide resistant mosquitoes, *Culex quinquefasciatus*. **PLoS ONE**, 6, e0029418, 2011.

6. CAPÍTULO FINAL

A importância dos inimigos naturais como base do manejo integrado de pragas (MIP) é amplamente aceita, mas poucos estudos conduzem os experimentos de campo necessários para quantificar diretamente seu impacto sobre as populações de pragas neste contexto (FURLONG, 2015).

Com as mudanças nas políticas governamentais para uma redução da dependência de insumos externos na agricultura, identificar opções de manejo que melhoram os serviços de controle de pragas se tornou uma questão crítica (SCHERR; McNEELY, 2008).

Técnicas moleculares empregadas para identificar e monitorar o estabelecimento e dispersão de biotipos de inimigos naturais (TIPVADEE, 2002) têm um papel significativo na expansão dos mercados para o bioprodutos.

O objetivo principal deste projeto foi, em uma visão bem ampla, iniciar uma linha de pesquisa no Laboratório de Acarologia envolvendo ferramentas moleculares (marcadores de DNA e RNA-Seq) com possibilidade de uso em suporte ao desenvolvimento e implantação de programas de Manejo Integrado de Pragas na Agricultura, uma combinação de estratégias de controle com intuito de manter a densidade populacional de pragas abaixo do limite econômico, considerando também critérios ecológicos e sociais. Sua grande importância reside no fato de que cada vez mais precisamos lançar mão de tecnologias avançadas para aprimorar o processo de produção agrícola, até então tão dependente do uso de pesticidas para controle de pragas, o que, sabidamente traz grande risco à saúde humana e dos animais, bem como prejuízos ao meio ambiente.

Neste trabalho como um todo foram realizados estudos sobre o emprego de uma linhagem de *P. macropilis*, resistente a piretroides, sendo este um predador especialista, efetivo no controle de *T. urticae*. A utilização de inimigos naturais em sistemas de produção comercial é prejudicada pelo uso intensivo de pesticidas, o que justifica a introdução de uma linhagem resistente.

Estudos preliminares foram publicados em 2015 (QUEIROZ; SATO, 2015). Os resultados apresentados lançaram a primeira luz sobre os mecanismos de resistência em *P. macropilis*. A presença de mais de um fator poderia explicar os dois padrões de variação nas frequências de resistência, na ausência de pressão de seleção (estabilidade da resistência):

O primeiro fator é o aumento na degradação metabólica. Dose dependente, envolvendo alteração do metabolismo para detoxificação e com custo adaptativo, explica a

queda inicial na frequência de resistência ao piretroide fenpropatrina (de 75% para 30%, em três meses) detectada no estudo.

O segundo é a insensibilidade do alvo de ação, no caso os canais de sódio, qualitativo, explica a fase de estabilidade na frequência de resistência, em torno de 30% (após a rápida queda inicial na frequência de ácaros resistentes associada ao custo adaptativo da resistência metabólica), demonstrada no mesmo estudo.

Em predadores é interessante a permanência de indivíduos resistentes no campo, mesmo na ausência de pressão de seleção com pesticidas.

A eficiência do ácaro predador *P. macropilis* no controle biológico de ácaro rajado foi constatada no experimento de campo já descrito (Capítulo 2). Buscando mais esclarecimentos sobre os mecanismos de resistência ao inseticida em *P. macropilis*, foram conduzidos os estudos moleculares, descritos nos Capítulos 3, 4 e 5.

Com intuito de identificar populações resistentes, trabalhos foram conduzidos com marcadores de DNA (microsatélites e MtCytB).

Foi feita, também, análise de transcriptoma, para verificar as alterações na expressão gênica quando os ácaros são expostos a fenpropatrina.

O primeiro trabalho foi sobre o desenvolvimento e a caracterização de marcadores moleculares microsatélites para o ácaro predador *P. macropilis* e a transferabilidade para outras espécies de predadores (Capítulo 3).

Foi observada a ocorrência de quatro alelos exclusivos, dois deles presentes apenas na população R, e os outros dois em duas populações S. Esses resultados possibilitam o uso da ferramenta para o monitoramento da liberação da linhagem R no campo e as possíveis interações com as populações selvagens, uma vez que torna possível separar as populações S das populações R. A importância da ferramenta está na possibilidade de avaliar a persistência de uma característica, no caso, resistência a piretroides. Foi o primeiro passo importante no desenvolvimento de um conjunto de marcadores microsatélites adequado para estudos multiespécies de ácaros Phytoseiidae.

O segundo trabalho foi sobre as variações moleculares das sequências de DNA e proteína do Citocromo B em *P. macropilis* e *P. persimilis* e estrutura genética de populações (Capítulo 4). Para *P. macropilis* foram avaliadas diversas populações coletadas em diferentes regiões brasileiras. Para *P. persimilis*, bem como para as populações argentinas de *P. macropilis*, foram utilizadas sequências disponíveis no GenBank.

Este estudo demonstrou a utilidade da ferramenta para separar duas espécies muito próximas (crípticas), *P. macropilis* e *P. persimilis*, além de evidenciar a variação

intraespecífica em *P. macropilis*, mostrando a separação das populações de acordo com fatores geográficos e fenótipos da resistência.

Este é o primeiro estudo que enfatiza o diagnóstico da resistência de *P. macropilis* a inseticidas, usando marcadores de DNA, abrindo novas perspectivas para o desenvolvimento de novas ferramentas para detecção precoce de resistência.

Vale ressaltar que os estudos com os dois marcadores moleculares são complementares. Trata-se de marcadores neutros, ou seja, não são passíveis de seleção, não estando diretamente associados à resistência. Assim sendo, permanecem nas gerações futuras mantendo claras as diferenças no “genetic background” entre as populações. Cabe ressaltar aqui que a resistência é apenas uma das características dentro de uma base genética muito maior.

O terceiro e último estudo foi sobre a análise de transcriptoma das linhagens de *P. macropilis*, resistente e suscetível a piretroides (Capítulo 5).

Foi feita a montagem “de novo” do transcriptoma, uma vez que não havia genoma de referência para *P. macropilis*. As “reads” de cada amostra (SC, SI, RC, RI) foram mapeadas no transcriptoma de referência para comparar os níveis de expressão.

Como resultado do mapeamento, foi possível observar a diferença na expressão relativa (RPKM). Nos tratamentos controle, os resultados referentes ao número total dos transcritos expressos foram próximos entre si. O mesmo ocorreu com os tratamentos induzidos.

Analisando os resultados de expressão diferencial, observou-se uma grande diferença entre os subgrupos com exposição à fenpropatrina (RI e SI). Um total de 52 transcritos foi superexpresso em RI (2 a 4.149 vezes), sendo que a expressão diferencial máxima de 4.149 vezes foi encontrada em apenas um transcrito, estando a segunda maior em 130 vezes. Em SI, 688 transcritos apresentaram superexpressão (2 a 640 vezes). Observou-se na linhagem S, que seria a selvagem, uma movimentação gênica muito grande, reunindo esforços para fazer frente à ameaça química, sem sucesso. Já na linhagem R, a presença de um transcrito superexpresso em 4.149 vezes possibilitaria a detoxificação da molécula do piretroide. Esses resultados estão relacionados ao primeiro mecanismo de resistência identificado no estudo, ou seja, a alteração no metabolismo e detoxificação da molécula do piretroide.

Outro aspecto a salientar é que dos 29 transcritos anotados como relacionados a uma proteína do canal de sódio, oito foram identificados em *Neoseiulus barkeri* (CONG et al, 2016), com 100% de similaridade, e outros com alta similaridade com sequências de *Metaseiulus occidentalis* e *Varroa destructor* disponíveis no GenBank. Esses resultados

referem-se ao segundo mecanismo de resistência identificado, a alteração no alvo de ação da molécula química.

Esses resultados indicam que a resistência de *P. macropilis* a fenpropatrina é determinada por um número não muito grande de genes, com grande diferencial de expressão, concordando com resultados obtidos por outros autores para insetos e ácaros (MARTINEZ-TORRES et al., 1998; RANSON et al., 2000; CHENG et al., 2019).

6.1. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

CHENG, X.; UMINA, P. A.; LEE, S. F.; HOFFMANN, A. A. Pyrethroid resistance in the pest mite, *Halotydeus destructor*: Dominance patterns and a new method for resistance screening. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v.159, p.9-16, 2019.

CONG, L.; CHEN, F.; YU, S.; YANG, J.; LUO, R.; TIAN, H.; LI, H.; LIU, H.; RAN, C. Transcriptome and Difference Analysis of Fenpropathrin Resistant Predatory Mite, *Neoseiulus barkeri* (Hughes) **International Journal of Molecular Sciences**, v. 17, p.15-17, 2016.

FURLONG, M.J; Knowing your enemies: Integrating molecular and ecological methods to assess the impact of arthropod predators on crop pests. **Insect Science**, v.22, p.6–19, 2015.

MARTINEZ-TORRES, D.; CHANDRE, F.; WILLIAMSON, M. S.; DARRIET, F.; BERGÉ, J.B.; DEVONSHIRE, A. L; GUILLET, P.; PASTEUR, N.; PAURON, D. Molecular characterization of pyrethroid knockdown resistance (kdr) in the major malaria vector *Anopheles gambiae* s.s. **Insect Molecular Biology**, v.7, n.2, p.179-184, 1998.

QUEIROZ, M.C.V.; SATO, M.E. Pyrethroid resistance in *Phytoseiulus macropilis* (Acari: Phytoseiidae): cross-resistance, stability and effect of synergists. **Experimental and Applied Acarology**, v.68, n.1, p.71-82, 2016.

RANSON, H.; JENSEN, B.; VULULE, J. M.; WANG, X.; HEMINGWAY, J.; COLLINS, F. H. Identification of a point mutation in the voltage-gated sodium channel gene of Kenyan *Anopheles gambiae* associated with resistance to DDT and pyrethroids. **Insect Molecular Biology**, v.9, n.5, p.391-497, 2000.

SCHERR, S.J.; MCNEELY, J.A. Biodiversity conservation and agricultural sustainability: Towards a new paradigm of ‘ecoagriculture’ landscapes. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, v.363, p. 477–494, 2008.

TIPVADEE, A. Biotechnology for insect control. In **Proceedings of Saturday Forum**, p. 74-85, 2002.

7. ANEXOS (Análise de Transcriptoma – *Phytoseiulus macropilis*) (ATPm)

Anexo 1 (ATPm). Anotação funcional dos transcritos possivelmente relacionados com resistência em *P. macropilis*

Transcrito	Anotação
3049	cytochrome b (CYTB) [taxid: 44414]
30507	cytochrome b (CYTB) [taxid: 9606]
33145	cytochrome b (CYTB) [taxid: 9606]
8665	cytochrome b reductase 1 (LOC100905980) [taxid: 34638] PFAM: Eukaryotic cytochrome b561(PF03188.15:Cytochrom_B561)
5339	cytochrome b-c1 complex subunit 2, mitochondrial (LOC100900634) [taxid: 34638] peptidase)
1252	cytochrome b-c1 complex subunit 6, mitochondrial-like (LOC100901038) [taxid: 34638] PFAM: Ubiquinol-cytochrome C reductase)
2560	cytochrome b-c1 complex subunit 7-like (LOC100902961) [taxid: 34638] PFAM: Ubiquinol-cytochrome C reductase complex 14kD subunit
5745	cytochrome b-c1 complex subunit 8 (LOC100907752) [taxid: 34638] PFAM: UcrQ family(PF02939.15:UcrQ)
414	cytochrome b-c1 complex subunit Rieske, mitochondrial (LOC100907466) [taxid: 34638] PFAM: Ubiquinol cytochrome reductase transmembrane
3903	cytochrome b5 (LOC100898381) [taxid: 34638] PFAM: Cytochrome b5-like Heme/Steroid binding domain(PF00173.27:Cyt-b5)
4631	cytochrome b5 (LOC100898381) [taxid: 34638] PFAM: Cytochrome b5-like Heme/Steroid binding domain(PF00173.27:Cyt-b5)
10928	cytochrome b5 reductase 4-like (LOC111246834) [taxid: 109461] PFAM: Cytochrome b5-like Heme/Steroid binding domain(PF00173.27:Cyt-b5)
4025	cytochrome b5 reductase 4-like (LOC111246834) [taxid: 109461] PFAM: Oxidoreductase FAD-binding domain(PF00970.23:FAD_binding_6)
6886	cytochrome B5-like protein (LOC100904899) [taxid: 34638] PFAM: Cytochrome b5-like Heme/Steroid binding domain(PF00173.27:Cyt-b5)
8978	cytochrome b561 (LOC100899013) [taxid: 34638] PFAM: Eukaryotic cytochrome b561(PF03188.15:Cytochrom_B561)
12071	cytochrome b561 (LOC100900057) [taxid: 34638] PFAM: Eukaryotic cytochrome b561(PF03188.15:Cytochrom_B561)
12568	cytochrome b561 (LOC100904680) [taxid: 34638] PFAM: Eukaryotic cytochrome b561(PF03188.15:Cytochrom_B561)
1669	cytochrome b561 (LOC100907586) [taxid: 34638] PFAM: Eukaryotic cytochrome b561(PF03188.15:Cytochrom_B561)
2089	cytochrome b561 domain-containing protein 2 (LOC100897638) [taxid: 34638] PFAM: Eukaryotic cytochrome b561(PF03188.15:Cytochrom_B561)
48699	cytochrome b561-like (LOC100901701) [taxid: 34638] PFAM: Eukaryotic cytochrome b561(PF03188.15:Cytochrom_B561)
3307	cytochrome c oxidase assembly factor 6 homolog (LOC100907109) [taxid: 34638] PFAM: Cytochrome oxidase c subunit VIb (PF02297.16:COX6B)
12069	cytochrome c oxidase assembly factor 7 homolog (LOC100905239) [taxid: 34638]
12520	cytochrome c oxidase assembly protein COX15 homolog (LOC100899601) [taxid: 34638] PFAM: Cytochrome oxidase assembly protein (PF02628.14:COX15-CtaA)
3813	cytochrome c oxidase assembly protein COX16 homolog, mitochondrial (LOC100898681) [taxid: 34638] PFAM: Cytochrome c oxidase assembly protein COX16(PF14138.5:COX16)
14814	cytochrome c oxidase III (COX3) [taxid: 9606]
1099	cytochrome c oxidase subunit 4 isoform 1, mitochondrial (LOC100899551) [taxid: 34638] PFAM: Cytochrome c oxidase subunit IV(PF02936.13:COX4)
5140	cytochrome c oxidase subunit 5A, mitochondrial (LOC100897186) [taxid: 34638] PFAM: Cytochrome c oxidase subunit Va (PF02284.15:COX5A)
5865	cytochrome c oxidase subunit 5B, mitochondrial-like (LOC100906082) [taxid: 34638] PFAM: Cytochrome c oxidase subunit Vb (PF01215.18:COX5B)
433	cytochrome c oxidase subunit 6A1, mitochondrial-like (LOC100904052) [taxid: 34638] PFAM: Cytochrome c oxidase subunit VIa (PF02046.14:COX6A)
5230	cytochrome c oxidase subunit 6B2-like (LOC111613443) [taxid: 218467] PFAM: Cytochrome oxidase c subunit VIb (PF02297.16:COX6B)

538	cytochrome c oxidase subunit I (COX1) [taxid: 44414] PFAM: Cytochrome C and Quinol oxidase polypeptide I(PF00115.19:COX1)
18388	cytochrome c oxidase subunit I (COX1) [taxid: 63221]
26940	cytochrome c oxidase subunit I (COX1) [taxid: 63221]
10109	cytochrome c oxidase subunit II (COX2) [taxid: 9606] PFAM: Cytochrome C oxidase subunit II, transmembrane domain (PF02790.14:COX2_TM)
3111	cytochrome c oxidase subunit III (COX3) [taxid: 44414]
5010	cytochrome c oxidase subunit NDUF44 (LOC100908020) [taxid: 34638] PFAM: NADH-ubiquinone reductase complex 1 MLRQ subunit (PF06522.10:B12D)
291	cytochrome c-2 (LOC100908582) [taxid: 34638] PFAM: Cytochrome c(PF00034.20:Cytochrom_C)
9814	cytochrome c-like (LOC100904809) [taxid: 34638] PFAM: Cytochrome c(PF00034.20:Cytochrom_C)
3340	cytochrome c1, heme protein, mitochondrial (LOC100903242) [taxid: 34638] PFAM: Cytochrome C1 family (PF02167.14:Cytochrom_C1)
6445	cytochrome P450 1A1 (LOC100901737) [taxid: 34638] PFAM: Cytochrome P450(PF00067.21:p450)
140	cytochrome P450 1A2 (LOC100908724) [taxid: 34638] PFAM: Cytochrome P450(PF00067.21:p450)
11281	cytochrome P450 2C23 (LOC100902609) [taxid: 34638]
35055	cytochrome P450 2F2-like (LOC100906680) [taxid: 34638]
42435	cytochrome P450 2F2-like (LOC100906680) [taxid: 34638]
35039	cytochrome P450 2F2-like (LOC100906680) [taxid: 34638] PFAM: Cytochrome P450(PF00067.21:p450)
45158	cytochrome P450 2F3-like (LOC100906689) [taxid: 34638]
47034	cytochrome P450 2F3-like (LOC100906769) [taxid: 34638]
8230	cytochrome P450 2J6 (LOC100906940) [taxid: 34638] PFAM: Cytochrome P450(PF00067.21:p450)
19435	cytochrome P450 2J6-like (LOC100900347) [taxid: 34638]
7190	cytochrome P450 2J6-like (LOC100900347) [taxid: 34638] PFAM: Cytochrome P450(PF00067.21:p450)
41971	cytochrome P450 2J6-like (LOC100905449) [taxid: 34638]
33891	cytochrome P450 2J6-like (LOC100905886) [taxid: 34638]
36108	cytochrome P450 2J6-like (LOC100905886) [taxid: 34638] PFAM: Cytochrome P450(PF00067.21:p450)
21750	cytochrome P450 307a1-like (LOC100906667) [taxid: 34638] PFAM: Cytochrome P450(PF00067.21:p450)
44161	cytochrome P450 307a1-like (LOC100906667) [taxid: 34638] PFAM: Cytochrome P450(PF00067.21:p450)
19860	cytochrome P450 315a1, mitochondrial (LOC100900401) [taxid: 34638] PFAM: Cytochrome P450(PF00067.21:p450)
38784	cytochrome P450 315a1, mitochondrial (LOC100900401) [taxid: 34638] PFAM: Cytochrome P450(PF00067.21:p450)
15900	cytochrome P450 3A14 (LOC100901413) [taxid: 34638]
4420	cytochrome P450 3A16 (LOC100900413) [taxid: 34638] PFAM: Cytochrome P450(PF00067.21:p450)
8124	cytochrome P450 3A16 (LOC100900413) [taxid: 34638] PFAM: Cytochrome P450(PF00067.21:p450)
8815	cytochrome P450 3A16 (LOC100900413) [taxid: 34638] PFAM: Cytochrome P450(PF00067.21:p450)
9754	cytochrome P450 3A16 (LOC100900413) [taxid: 34638] PFAM: Cytochrome P450(PF00067.21:p450)
13310	cytochrome P450 3A16 (LOC100900413) [taxid: 34638] PFAM: Cytochrome P450(PF00067.21:p450)
13971	cytochrome P450 3A16 (LOC100900413) [taxid: 34638] PFAM: Cytochrome P450(PF00067.21:p450)
13061	cytochrome P450 3A24 (LOC100905379) [taxid: 34638]
14359	cytochrome P450 3A24 (LOC100905379) [taxid: 34638]
20439	cytochrome P450 3A24 (LOC100905379) [taxid: 34638]
8968	cytochrome P450 3A24 (LOC100905379) [taxid: 34638] PFAM: Cytochrome P450(PF00067.21:p450)
14598	cytochrome P450 3A24 (LOC100905379) [taxid: 34638] PFAM: Cytochrome P450(PF00067.21:p450)
27478	cytochrome P450 3A24-like (LOC100900073) [taxid: 34638]
5790	cytochrome P450 3A24-like (LOC100900073) [taxid: 34638] PFAM: Cytochrome P450(PF00067.21:p450)
11902	cytochrome P450 3A24-like (LOC100900073) [taxid: 34638] PFAM: Cytochrome P450(PF00067.21:p450)
18741	cytochrome P450 3A24-like (LOC100900073) [taxid: 34638] PFAM: Cytochrome P450(PF00067.21:p450)
19235	cytochrome P450 3A24-like (LOC100900073) [taxid: 34638] PFAM: Cytochrome P450(PF00067.21:p450)
12150	cytochrome P450 3A28 (LOC100901963) [taxid: 34638] PFAM: Cytochrome P450(PF00067.21:p450)
22091	cytochrome P450 3A29-like (LOC100897421) [taxid: 34638]
591	cytochrome P450 3A29-like (LOC100897421) [taxid: 34638] PFAM: Cytochrome P450(PF00067.21:p450)
7792	cytochrome P450 3A29-like (LOC100897421) [taxid: 34638] PFAM: Cytochrome P450(PF00067.21:p450)
16747	cytochrome P450 3A29-like (LOC100897421) [taxid: 34638] PFAM: Cytochrome P450(PF00067.21:p450)
8178	cytochrome P450 3A29-like (LOC100905002) [taxid: 34638] PFAM: Cytochrome P450(PF00067.21:p450)
5818	cytochrome P450 3A31 (LOC100907032) [taxid: 34638] PFAM: Cytochrome P450(PF00067.21:p450)
6876	cytochrome P450 3A31 (LOC100907032) [taxid: 34638] PFAM: Cytochrome P450(PF00067.21:p450)
9407	cytochrome P450 3A31 (LOC100907032) [taxid: 34638] PFAM: Cytochrome P450(PF00067.21:p450)
17462	cytochrome P450 3A31 (LOC100907032) [taxid: 34638] PFAM: Cytochrome P450(PF00067.21:p450)
11841	cytochrome P450 3A31-like (LOC100907234) [taxid: 34638] PFAM: Cytochrome P450(PF00067.21:p450)

8610	cytochrome P450 3A4 (LOC100897252) [taxid: 34638] PFAM: Cytochrome P450(PF00067.21:p450)
10249	cytochrome P450 3A4 (LOC100897252) [taxid: 34638] PFAM: Cytochrome P450(PF00067.21:p450)
6246	cytochrome P450 3A56 (LOC100907177) [taxid: 34638] PFAM: Cytochrome P450(PF00067.21:p450)
9975	cytochrome P450 3A56 (LOC100907177) [taxid: 34638] PFAM: Cytochrome P450(PF00067.21:p450)
10564	cytochrome P450 3A56 (LOC100907177) [taxid: 34638] PFAM: Cytochrome P450(PF00067.21:p450)
10844	cytochrome P450 3A56 (LOC100907177) [taxid: 34638] PFAM: Cytochrome P450(PF00067.21:p450)
19640	cytochrome P450 3A56 (LOC100907177) [taxid: 34638] PFAM: Cytochrome P450(PF00067.21:p450)
32975	cytochrome P450 3A56 (LOC100907177) [taxid: 34638] PFAM: Cytochrome P450(PF00067.21:p450)
5643	cytochrome P450 3A56-like (LOC111247963) [taxid: 109461] PFAM: Cytochrome P450(PF00067.21:p450)
10732	cytochrome P450 3A6 (LOC100908757) [taxid: 34638]
11847	cytochrome P450 3A6 (LOC100908757) [taxid: 34638]
13501	cytochrome P450 3A6 (LOC100908757) [taxid: 34638] PFAM: Cytochrome P450(PF00067.21:p450)
3020	cytochrome P450 3A6-like (LOC100899475) [taxid: 34638] PFAM: Cytochrome P450(PF00067.21:p450)
34916	cytochrome P450 3A6-like (LOC100899475) [taxid: 34638] PFAM: Cytochrome P450(PF00067.21:p450)
31706	cytochrome P450 3A9 (LOC100908678) [taxid: 34638]
33435	cytochrome P450 3A9 (LOC100908678) [taxid: 34638]
11760	cytochrome P450 4C1 (LOC100897877) [taxid: 34638] PFAM: Cytochrome P450(PF00067.21:p450)
17743	cytochrome P450 4C1 (LOC100897877) [taxid: 34638] PFAM: Cytochrome P450(PF00067.21:p450)
9133	cytochrome P450 4C1-like (LOC100897367) [taxid: 34638] PFAM: Cytochrome P450(PF00067.21:p450)
9718	cytochrome P450 4C1-like (LOC100902596) [taxid: 34638]
20263	cytochrome P450 4C1-like (LOC100902596) [taxid: 34638] PFAM: Cytochrome P450(PF00067.21:p450)
21532	cytochrome P450 4c3 (LOC100906637) [taxid: 34638] PFAM: Cytochrome P450(PF00067.21:p450)
4235	cytochrome P450 4c3 (LOC100907426) [taxid: 34638]
17742	cytochrome P450 4c3 (LOC100907426) [taxid: 34638] PFAM: Cytochrome P450(PF00067.21:p450)
14934	cytochrome P450 4c3-like (LOC100899251) [taxid: 34638]
7557	cytochrome P450 4c3-like (LOC100899251) [taxid: 34638] PFAM: Cytochrome P450(PF00067.21:p450)
11317	cytochrome P450 4c3-like (LOC100899251) [taxid: 34638] PFAM: Cytochrome P450(PF00067.21:p450)
18951	cytochrome P450 4c3-like (LOC100899251) [taxid: 34638] PFAM: Cytochrome P450(PF00067.21:p450)
9094	cytochrome P450 4c3-like (LOC100902253) [taxid: 34638] PFAM: Cytochrome P450(PF00067.21:p450)
9095	cytochrome P450 4c3-like (LOC100902253) [taxid: 34638] PFAM: Cytochrome P450(PF00067.21:p450)
24794	cytochrome P450 4V2 (LOC100557625) [taxid: 28377] PFAM: Cytochrome P450(PF00067.21:p450)
8840	cytochrome P450 4V2 (LOC100901625) [taxid: 34638] PFAM: Cytochrome P450(PF00067.21:p450)
30245	cytochrome P450 4V2-like (LOC100902886) [taxid: 34638]
38067	cytochrome P450 4V2-like (LOC100902886) [taxid: 34638]
8379	cytochrome P450 4V2-like (LOC100902886) [taxid: 34638] PFAM: Cytochrome P450(PF00067.21:p450)
32186	cytochrome P450 4V2-like (LOC100902886) [taxid: 34638] PFAM: Cytochrome P450(PF00067.21:p450)
32253	cytochrome P450 4V2-like (LOC100902886) [taxid: 34638] PFAM: Cytochrome P450(PF00067.21:p450)
39349	cytochrome P450 4V2-like (LOC100902886) [taxid: 34638] PFAM: Cytochrome P450(PF00067.21:p450)
41675	cytochrome P450 4V2-like (LOC100906171) [taxid: 34638]
5475	cytochrome P450 4V2-like (LOC100906171) [taxid: 34638] PFAM: Cytochrome P450(PF00067.21:p450)
9180	cytochrome P450 4V2-like (LOC108863658) [taxid: 34638] PFAM: Cytochrome P450(PF00067.21:p450)
9196	cytochrome P450 4V2-like (LOC108863658) [taxid: 34638] PFAM: Cytochrome P450(PF00067.21:p450)
15631	cytochrome P450 4V2-like (LOC108863658) [taxid: 34638] PFAM: Cytochrome P450(PF00067.21:p450)
25285	cytochrome P450 4V2-like (LOC108864240) [taxid: 34638] PFAM: Cytochrome P450(PF00067.21:p450)
45273	cytochrome P450 71B22-like (LOC100905596) [taxid: 34638]
44838	cytochrome P450 71B22-like (LOC100905596) [taxid: 34638] PFAM: Cytochrome P450(PF00067.21:p450)
45228	cytochrome ubiquinol oxidase subunit I (PPA_RS03590) [taxid: 267747] PFAM: Cytochrome C and Quinol oxidase polypeptide I(PF00115.19:COX1)
4583	glutathione S-transferase 1 (LOC100902787) [taxid: 34638]
15550	glutathione S-transferase 1 (LOC100902787) [taxid: 34638] PFAM: Glutathione S-transferase, N-terminal domain (PF13417.5:GST_N_3)
2897	glutathione S-transferase 1 (LOC100904965) [taxid: 34638] PFAM: Glutathione S-transferase, N-terminal domain (PF13417.5:GST_N_3)
35153	glutathione S-transferase 1-like (LOC111269580) [taxid: 62625]
23641	glutathione S-transferase 1, isoform C-like (LOC107359332) [taxid: 32264] PFAM: Glutathione S-transferase, N-terminal domain (PF13417.5:GST_N_3)
16550	glutathione S-transferase 4-like (LOC111253932) [taxid: 109461]
9259	glutathione S-transferase C-terminal domain-containing protein (LOC100908334) [taxid: 34638]
3113	glutathione S-transferase class-mu 26 kDa isozyme 47-like (LOC100907056) [taxid: 34638] PFAM: Glutathione S-transferase, C-terminal domain (PF14497.5:GST_C_3)

5058	glutathione S-transferase kappa 1 (LOC100899773) [taxid: 34638] PFAM: DSBA-like thioredoxin domain (PF01323.19:DSBA)
3457	glutathione S-transferase kappa 1 (LOC100907064) [taxid: 34638] PFAM: DSBA-like thioredoxin domain (PF01323.19:DSBA)
9026	glutathione S-transferase Mu 1 (LOC100897557) [taxid: 34638] PFAM: Glutathione S-transferase, N-terminal domain (PF02798.19:GST_N)
549	glutathione S-transferase Mu 1 (LOC100900681) [taxid: 34638] PFAM: Glutathione S-transferase, N-terminal domain (PF02798.19:GST_N)
11453	glutathione S-transferase Mu 1 (LOC100900681) [taxid: 34638] PFAM: Glutathione S-transferase, N-terminal domain (PF02798.19:GST_N)
9098	glutathione S-transferase Mu 1 (LOC100904919) [taxid: 34638] PFAM: Glutathione S-transferase, C-terminal domain (PF14497.5:GST_C_3)
4179	glutathione S-transferase Mu 1-like (LOC106474236) [taxid: 6850] PFAM: Glutathione S-transferase, N-terminal domain (PF02798.19:GST_N)
9203	glutathione S-transferase Mu 1-like (LOC111245011) [taxid: 109461] PFAM: Glutathione S-transferase, C-terminal domain (PF14497.5:GST_C_3)
5354	glutathione S-transferase omega-1 (LOC100900328) [taxid: 34638]
11662	multidrug resistance protein 1-like (LOC111250671) [taxid: 109461]
6742	multidrug resistance protein 1B (LOC100904023) [taxid: 34638]
10189	multidrug resistance protein 1B (LOC100904023) [taxid: 34638]
24924	multidrug resistance protein 1B (LOC100904023) [taxid: 34638]
29408	multidrug resistance protein 1B (LOC100904023) [taxid: 34638]
29408	multidrug resistance protein 1B (LOC100904023) [taxid: 34638]
29408	multidrug resistance protein 1B (LOC100904023) [taxid: 34638]
33510	multidrug resistance protein 1B (LOC100904023) [taxid: 34638]
25617	multidrug resistance protein 1B (LOC100904023) [taxid: 34638] PFAM: ABC transporter transmembrane region (PF00664.22:ABC_membrane)
1089	multidrug resistance protein 2-like (LOC100900210) [taxid: 34638] PFAM: Major Facilitator Superfamily (PF07690.15:MFS_1)
15894	multidrug resistance protein 2-like (LOC100900210) [taxid: 34638] PFAM: Major Facilitator Superfamily (PF07690.15:MFS_1)
30554	multidrug resistance-associated protein 1 (LOC100900612) [taxid: 34638]
30925	multidrug resistance-associated protein 1 (LOC100900752) [taxid: 34638]
13164	multidrug resistance-associated protein 1 (LOC100900752) [taxid: 34638] PFAM: ABC transporter transmembrane region (PF00664.22:ABC_membrane)
14215	multidrug resistance-associated protein 1 (LOC100900752) [taxid: 34638] PFAM: ABC transporter transmembrane region (PF00664.22:ABC_membrane)
16879	multidrug resistance-associated protein 1 (LOC100900752) [taxid: 34638] PFAM: ABC transporter transmembrane region (PF00664.22:ABC_membrane)
23238	multidrug resistance-associated protein 1 (LOC100900752) [taxid: 34638] PFAM: ABC transporter transmembrane region (PF00664.22:ABC_membrane)
7421	multidrug resistance-associated protein 1 (LOC100900752) [taxid: 34638] PFAM: ABC transporter (PF00005.26:ABC_tran)
7439	multidrug resistance-associated protein 1 (LOC100900752) [taxid: 34638] PFAM: ABC transporter (PF00005.26:ABC_tran)
5710	multidrug resistance-associated protein 1 (LOC100901531) [taxid: 34638]
10162	multidrug resistance-associated protein 1 (LOC100901531) [taxid: 34638]
40934	multidrug resistance-associated protein 1 (LOC100901531) [taxid: 34638]
12810	multidrug resistance-associated protein 1 (LOC100901531) [taxid: 34638] PFAM: ABC transporter (PF00005.26:ABC_tran)
642	multidrug resistance-associated protein 1 (LOC100905468) [taxid: 34638] PFAM: ABC transporter transmembrane region (PF00664.22:ABC_membrane)
7799	multidrug resistance-associated protein 1-like (LOC100903554) [taxid: 34638] PFAM: ABC transporter transmembrane region (PF00664.22:ABC_membrane)
27664	multidrug resistance-associated protein 1-like (LOC100903554) [taxid: 34638] PFAM: ABC transporter (PF00005.26:ABC_tran)
32111	multidrug resistance-associated protein 1-like (LOC100903697) [taxid: 34638] PFAM: ABC transporter transmembrane region (PF00664.22:ABC_membrane)
3557	multidrug resistance-associated protein 1-like (LOC100904293) [taxid: 34638] PFAM: ABC transporter transmembrane region (PF00664.22:ABC_membrane)
19693	multidrug resistance-associated protein 4-like (LOC100902606) [taxid: 34638]
19876	multidrug resistance-associated protein 4-like (LOC100902606) [taxid: 34638]
10396	multidrug resistance-associated protein 4-like (LOC100902606) [taxid: 34638] PFAM: ABC transporter transmembrane region (PF00664.22:ABC_membrane)

22598	multidrug resistance-associated protein 4-like (LOC100902606) [taxid: 34638] PFAM: ABC transporter transmembrane region (PF00664.22:ABC_membrane)
394	multidrug resistance-associated protein 7 (LOC100901200) [taxid: 34638] PFAM: ABC transporter transmembrane region (PF00664.22:ABC_membrane)
14155	NADPH--cytochrome P450 reductase (LOC100907450) [taxid: 34638]
1222	NADPH--cytochrome P450 reductase (LOC100907450) [taxid: 34638] PFAM: FAD binding domain (PF00667.19:FAD_binding_1)
13758	peroxidase (LOC100905976) [taxid: 34638] PFAM: Animal haem peroxidase (PF03098.14:An_peroxidase)
7286	peroxidase (LOC100905996) [taxid: 34638] PFAM: Animal haem peroxidase (PF03098.14:An_peroxidase)
15896	peroxidase (LOC100905996) [taxid: 34638] PFAM: Animal haem peroxidase (PF03098.14:An_peroxidase)
22261	peroxidase (LOC100905996) [taxid: 34638] PFAM: Animal haem peroxidase (PF03098.14:An_peroxidase)
18731	peroxidase (LOC100906638) [taxid: 34638]
10907	peroxidase (LOC100906638) [taxid: 34638] PFAM: Animal haem peroxidase (PF03098.14:An_peroxidase)
23713	peroxidase mlt-7-like (LOC111258683) [taxid: 62625] PFAM: Animal haem peroxidase (PF03098.14:An_peroxidase)
7564	peroxidase skpo-1-like (LOC100898313) [taxid: 34638] PFAM: Animal haem peroxidase (PF03098.14:An_peroxidase)
22462	peroxidase-like (LOC100906069) [taxid: 34638] PFAM: Animal haem peroxidase (PF03098.14:An_peroxidase)
3832	sodium channel protein para (LOC100901347) [taxid: 34638]
18079	sodium channel protein para (LOC100901347) [taxid: 34638]
28940	sodium channel protein para (LOC100901347) [taxid: 34638]
29247	sodium channel protein para (LOC100901347) [taxid: 34638]
31988	sodium channel protein para (LOC100901347) [taxid: 34638]
13997	sodium channel protein para (LOC100901347) [taxid: 34638] PFAM: Cytoplasmic domain of voltage-gated Na+ ion channel (PF11933.7:Na_trans_cytopl)
11156	sodium channel protein para (LOC100901347) [taxid: 34638] PFAM: Ion transport protein (PF00520.30:Ion_trans)
16024	sodium channel protein para (LOC100901347) [taxid: 34638] PFAM: Ion transport protein (PF00520.30:Ion_trans)
21072	sodium channel protein para (LOC100901347) [taxid: 34638] PFAM: Ion transport protein (PF00520.30:Ion_trans)
35483	sodium channel protein para-like (LOC111250971) [taxid: 109461]
16555	sodium channel protein para-like (LOC111250971) [taxid: 109461] PFAM: Ion transport protein (PF00520.30:Ion_trans)
36974	sodium channel protein para-like (LOC111250971) [taxid: 109461] PFAM: Ion transport protein (PF00520.30:Ion_trans)
41151	sodium channel protein para-like (LOC111250971) [taxid: 109461] PFAM: Ion transport protein (PF00520.30:Ion_trans)
3694	sodium- and chloride-dependent GABA transporter 1 (LOC100901675) [taxid: 34638] PFAM: Sodium:neurotransmitter symporter Family (PF00209.17:SNF)
8708	sodium- and chloride-dependent GABA transporter 1 (LOC100909063) [taxid: 34638] PFAM: Sodium:neurotransmitter symporter Family (PF00209.17:SNF)
22153	sodium- and chloride-dependent GABA transporter ine (LOC100908338) [taxid: 34638]
31724	sodium- and chloride-dependent GABA transporter ine (LOC100908338) [taxid: 34638]
4509	sodium- and chloride-dependent GABA transporter ine (LOC100908338) [taxid: 34638] PFAM: Sodium:neurotransmitter symporter Family (PF00209.17:SNF)
11770	sodium- and chloride-dependent GABA transporter ine (LOC100908338) [taxid: 34638] PFAM: Sodium:neurotransmitter symporter Family (PF00209.17:SNF)
7442	sodium- and chloride-dependent glycine transporter 1-like (LOC111250878) [taxid: 109461] PFAM: Sodium:neurotransmitter symporter Family (PF00209.17:SNF)
11009	sodium- and chloride-dependent glycine transporter 2-like (LOC100898228) [taxid: 34638] PFAM: Sodium:neurotransmitter symporter Family (PF00209.17:SNF)
38642	sodium- and chloride-dependent glycine transporter 2-like (LOC100898228) [taxid: 34638] PFAM: Sodium:neurotransmitter symporter Family (PF00209.17:SNF)
17265	sodium- and chloride-dependent glycine transporter 2-like (LOC108863659) [taxid: 34638] PFAM: Sodium:neurotransmitter symporter Family (PF00209.17:SNF)

Anexo 2 (ATPm). Transcritos identificados pela análise da ontologia gênica, possivelmente relacionados com resistência em *P. macropilis*.

Transcrito	GO	Categoria	Anotação
7244	45162	P	clustering of voltage-gated sodium channels
10291			
11161			
15291			
17507			
20777			
14408			
26216			
30745			
33687			
277	4104	F	cholinesterase activity
873			
2063			
2087			
2326			
2767			
3023			
3238			
3914			
4639			
4811			
5182			
6622			
6939			
7622			
7814			
9396			
9577			
11487			
12447			
13239			
14125			
14204			
14666			
15851			
15852			
15915			
16176			
17075			
18730			
21388			
26403			
27472			
27733			
29724			
35685			
36853			
5602	4453	F	juvenile-hormone esterase activity
5814			
5939			
6084			
6612			
6622			
6939			
7262			
8874			
9396			
9577			
10274			

11487			
12447			
12924			
14125			
14204			
14698			
14986			
15204			
15476			
15851			
15852			
15915			
16176			
17075			
17808			
18100			
18730			
21388			
22196			
22300			
23134			
25322			
25359			
26403			
26766			
27146			
27374			
27472			
27733			
28415			
32705			
33916			
35575			
36853			
39278			
41657			
42071			

Anexo 3 (ATPm). Transcritos com expressão relativa diferente de zero, possivelmente relacionados com resistência, em cada um dos 4 subgrupos testados.

grupo	transcrito	anotação
SC	39202	acetylcholinesterase-like (LOC100908822) [taxid: 34638]
SC	29009	acetylcholinesterase-like (LOC100908822) [taxid: 34638] peptidase: Acetylcholinesterase (MER0039141:S09.UPW) PFAM: Carboxylesterase Family (PF00135.27:COesterase)
SC	44067	cholinesterase 1 (LOC100906245) [taxid: 34638] peptidase: hypothetical protein (MER0536286:S09.UNW) PFAM: Carboxylesterase Family (PF00135.27:COesterase)
SC	48070	cytochrome P450 2F3-like (LOC100906769) [taxid: 34638]
SC	47916	cytochrome P450 315a1, mitochondrial (LOC100900401) [taxid: 34638] PFAM: Cytochrome P450(PF00067.21:p450)
SC	40319	cytochrome P450 3A24 (LOC100905379) [taxid: 34638]
SC	45022	potassium voltage-gated channel subfamily KQT member 1 (LOC100903861) [taxid: 34638] PFAM: KCNQ voltage-gated potassium channel (PF03520.13:KCNQ_channel)
SC	31916	sodium channel protein para (LOC100901347) [taxid: 34638]
SC	41488	sodium channel protein para (LOC100901347) [taxid: 34638]
SC	48001	uncharacterized LOC100901289 (LOC100901289) [taxid: 34638] PFAM: Amiloride-sensitive sodium channel (PF00858.23:ASC)
SC	42215	voltage-dependent calcium channel type A subunit alpha-1-like (LOC100901544) [taxid: 34638] PFAM: Ion transport protein (PF00520.30:Ion_trans)
SC	27242	voltage-dependent calcium channel type A subunit alpha-1-like (LOC100901686) [taxid: 34638] PFAM: Ion transport protein (PF00520.30:Ion_trans)
RC	8437	acetylcholinesterase-like (LOC100904215) [taxid: 34638] peptidase: hypothetical protein (MER0523868:S09.UNW) PFAM: Carboxylesterase family (PF00135.27:COesterase)
SI	21773	acetylcholinesterase-1-like (LOC100903073) [taxid: 34638]
SI	10680	carboxylesterase 1C-like (LOC108864237) [taxid: 34638] peptidase: hypothetical protein (MER0536417:S09.UNW) PFAM: Carboxylesterase family (PF00135.27:COesterase)
SI	17744	cytochrome P450 3A24-like (LOC100900073) [taxid: 34638] PFAM: Cytochrome P450(PF00067.21:p450)
SI	22372	cytochrome P450 4C1-like (LOC100902596) [taxid: 34638] PFAM: Cytochrome P450(PF00067.21:p450)
SI	32282	cytochrome P450 4c3-like (LOC100899251) [taxid: 34638]
SI	30047	cytochrome P450 4V2-like (LOC100902886) [taxid: 34638]
SI	9357	cytochrome P450 4V2-like (LOC100906171) [taxid: 34638]
SI	34485	esterase FE4 (LOC100907084) [taxid: 34638] peptidase: hypothetical protein (MER0320003:S09.UNW) PFAM: Carboxylesterase family (PF00135.27:COesterase)
SI	6859	esterase FE4-like (LOC111251327) [taxid: 109461] peptidase: hypothetical protein (MER0536417:S09.UNW)
SI	42970	peroxidasin homolog (LOC105676864) [taxid: 83485] PFAM: Animal haem peroxidase (PF03098.14:An_peroxidase)
SI	43599	sodium channel protein para-like (LOC111250971) [taxid: 109461] PFAM: Ion transport protein (PF00520.30:Ion_trans)
SI	20093	uncharacterized LOC100904029 (LOC100904029) [taxid: 34638] PFAM: Amiloride-sensitive sodium channel (PF00858.23:ASC)
SI	42301	uncharacterized LOC100908312 (LOC100908312) [taxid: 34638] PFAM: Cytochrome P450(PF00067.21:p450)
SI	48073	voltage-dependent calcium channel gamma-5 subunit (LOC108864871) [taxid: 34638]
RI	9095	cytochrome P450 4c3-like (LOC100902253) [taxid: 34638] PFAM: Cytochrome P450(PF00067.21:p450)
RI	23078	glycosyl transferase family 2 (PPA_RS08585) [taxid: 267747]
RI	41006	glycosyltransferase WbuB (PPA_RS00810) [taxid: 267747]
RI	45039	PFAM: Sodium:neurotransmitter symporter family (PF00209.17:SNF)
RI	41063	voltage-dependent T-type calcium channel subunit alpha-1H (LOC100898353) [taxid: 34638] PFAM: Ion transport protein (PF00520.30:Ion_trans)