

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS RURAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA

Lauren Brondani Castilhos

**IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DO ÁCARO-
AZUL-DAS-PASTAGENS (*Penthaleus major*) NO BRASIL**

Santa Maria, RS
2023

Lauren Brondani Castilhos

IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DO ÁCARO-AZUL-DAS-PASTAGENS (*Penthaleus major*) NO BRASIL

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Agronomia, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Agronomia**.

Orientador: Prof. Jonas André Arnemann, PhD

Santa Maria, RS
2023

This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Finance Code 001

Castilhos, Lauren Brondani
Identificação e caracterização molecular do ácaro-azul das-pastagens (*Penthaleus major*) no Brasil / Lauren Brondani Castilhos.- 2023.
38 p.; 30 cm

Orientador: Jonas André Arnemann
Coorientador: Alberto Cargnelutti Filho
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Maria, Centro de Ciências Rurais, Programa de Pós Graduação em Agronomia, RS, 2023

1. Identificação molecular 2. *Penthaleus major* 3. Pragas invasivas I. Arnemann, Jonas André II. Cargnelutti Filho, Alberto III. Título.

Sistema de geração automática de ficha catalográfica da UFSM. Dados fornecidos pelo autor(a). Sob supervisão da Direção da Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca Central. Bibliotecária responsável Paula Schoenfeldt Patta CRB 10/1728.

Declaro, LAUREN BRONDANI CASTILHOS, para os devidos fins e sob as penas da lei, que a pesquisa constante neste trabalho de conclusão de curso (Dissertação) foi por mim elaborada e que as informações necessárias objeto de consulta em literatura e outras fontes estão devidamente referenciadas. Declaro, ainda, que este trabalho ou parte dele não foi apresentado anteriormente para obtenção de qualquer outro grau acadêmico, estando ciente de que a inveracidade da presente declaração poderá resultar na anulação da titulação pela Universidade, entre outras consequências legais.

Lauren Brondani Castilhos

IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DO ÁCARO-AZUL-DAS-PASTAGENS (*Penthaleus major*) NO BRASIL

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Agronomia, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Agronomia**.

Aprovada em 9 de outubro de 2023:

Alberto Cargnelutti Filho, Prof. Dr. (UFSM)
(Presidente/Coorientador)

José Domingos Jacques Leão, Prof. Dr. (UFSM)

Deivid Araujo Magano, Prof. Dr. (UNIJUÍ)

Santa Maria, RS
2023

*Dedico essa dissertação aos meus pais, Luiz Mar e Joscelaine,
e ao meu irmão Felipe.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço, em primeiro lugar, a Deus por me iluminar nesta trajetória.

Aos meus pais, Luiz Mar e Joscelaine, que sempre apoiaram e incentivaram meus estudos durante todos esses anos, e por todo esforço para me proporcionarem a melhor educação possível.

Ao meu irmão Felipe, e minha cunhada Ágatha, agradeço por todo apoio, conselhos e incentivo.

Ao meu namorado Pedro Vitor, por todo amor, paciência, companheirismo, e por sempre acreditar no meu potencial e estar ao meu lado me apoiando nos momentos mais difíceis.

Ao meu orientador Jonas André Arnemann, e aos meus colegas do grupo de pesquisa Manejo e Genética de Pragas, e demais pessoas próximas ao grupo pelo companheirismo, ajuda e aprendizado ao longo deste período.

Ao técnico laboratorial Gustavo Ugalde, por toda ajuda e auxílio para a realização deste trabalho.

Ao meu coorientador Alberto Cargnelutti Filho, por me ajudar e orientar na condução deste trabalho na reta final. E aos demais membros da banca, José Domingos Jacques Leão e Deivid Araujo Magano, por aceitarem o convite em fazer parte da banca.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa.

E a todos que de alguma forma contribuíram direta ou indiretamente para a construção deste trabalho, muito obrigada!

RESUMO

IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DO ÁCARO-AZUL-DAS-PASTAGENS (*Penthaleus major*) NO BRASIL

AUTORA: Lauren Brondani Castilhos
ORIENTADOR: Prof. PhD. Jonas André Arnemann

O ácaro-azul-das-pastagens, *Penthaleus major* (Dugés) (Penthaleidae), é uma praga amplamente distribuída no mundo. O dano causado por este ácaro se deve ao seu hábito alimentar, causando a laceração da epiderme e remoção de clorofila das células, implicando aparência prateada às plantas e altura reduzida. No Brasil, *Penthaleus major* foi detectado atacando plantas de aveia para pastejo em uma propriedade privada localizada entre os municípios de André da Rocha e Protásio Alves, estado do Rio Grande do Sul (RS), no ano de 2009. Após um intervalo de tempo sem relatos de ocorrência, em 2020, nos municípios de André da Rocha e Cachoeira do Sul, RS, ácaros foram encontrados em propriedades privadas, também em pastagens de aveia. Este trabalho teve como objetivo realizar e documentar a identificação e caracterização molecular desta espécie, a fim de confirmar a presença do ácaro-azul-das-pastagens no Brasil. Para isso, espécimes destes ácaros foram coletados e submetidos a extração de DNA genômico e técnicas de PCR para a amplificação do gene mitocondrial citocromo oxidase I (COI). O estudo confirmou a introdução e presença da espécie *Penthaleus major* no Brasil por meio da identificação molecular, garantindo maior precisão e confiabilidade na identificação desta espécie.

Palavras-chave: Penthaleidae. DNA genômico. Praga invasiva.

ABSTRACT

MOLECULAR IDENTIFICATION AND CHARACTERIZATION OF THE BLUE OAT MITE (*Penthaleus major*) IN BRAZIL

AUTHOR: Lauren Brondani Castilhos
ADVISOR: Prof. PhD. Jonas Andre Arnemann

The blue oat mite, *Penthaleus major* (Dugés) (Penthaleidae), is a widely distributed pest worldwide. The damage caused by this mite is due to its feeding habits, causing laceration of the epidermis and removal of chlorophyll from the cells, resulting in a silver appearance in plants and reduced height. In Brazil, *Penthaleus major* was detected attacking oat plants for grazing on a private property located between the municipalities of André da Rocha and Protásio Alves, Rio Grande do Sul, in the year 2009. After a period without reports of occurrence, in 2020, in the municipalities of André da Rocha and Cachoeira do Sul (RS), mites were found again on private properties, also in oat pastures. This work aimed to document and performed the identification and molecular characterization of this species in order to confirm the presence of the blue grass mite in Brazil. Therefore, specimens of these mites were collected and subjected to genomic DNA extraction and PCR techniques for the amplification of the mitochondrial gene cytochrome oxidase I (COI). The study confirmed the introduction and presence of the species *Penthaleus major* in Brazil through molecular identification, ensuring greater accuracy and reliability in the identification of this species.

Keywords: Penthaleidae. Genomic DNA. Invasive pest.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Ácaro-azul-das-pastagens, <i>Penthaleus major</i>	14
Figura 2 – Aparência prateada em planta de aveia devido ao dano causado por <i>Penthaleus major</i>	16
Figura 3 – Dano causado por <i>Penthaleus major</i> em pastagem de aveia branca no Rio Grande do Sul, Brasil	16
Figura 4 – Adultos de <i>Penthaleus major</i> em plantas e de aveia, no município de Cachoeira do Sul, Rio Grande do Sul, Brasil.....	23
Figura 5 - Termociclador (equipamento para realizar a PCR)	25
Figura 6 – Eletroforese em gel agarose para verificar a amplificação genética do genoma mitocondrial.....	26
Figura 7 – Sequenciamento do gene mitocondrial citocromo oxidase I (COI) dos ácaros coletados em Cachoeira do Sul e André da Rocha, Rio Grande do Sul, Brasil	27
Figura 8 – Árvore filogenética representando a similaridade entre ácaros coletados no Brasil (<i>Penthaleus major</i> LB RC) e ácaros coletados na China (<i>Penthaleus major</i> PMH1-China), e comparados às demais sequencias de <i>Penthaleus</i> sp. disponíveis no GenBank.....	27

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	10
2	REFERENCIAL TEÓRICO	12
2.1	PRAGAS INVASIVAS NAS PASTAGENS DO RIO GRANDE DO SUL	12
2.2	ÁCARO-AZUL-DAS-PASTAGENS, <i>Penthaleus major</i>	13
2.3	USO DE MARCADORES MOLECULARES PARA IDENTIFICAÇÃO E ESTUDO DE PRAGAS INVASIVAS	17
3	OBJETIVOS	20
3.1	OBJETIVO GERAL	20
3.2	OBJETIVO ESPECÍFICO	20
4	ARTIGO	21
4.1	INTRODUÇÃO	22
4.2	MATERIAL E MÉTODOS	24
4.2.1	Coleta e preservação de espécimes de <i>Penthaleus major</i>	24
4.2.2	Extração de DNA, amplificação por PCR e sequenciamento do gene COI	24
4.3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	26
4.4	CONCLUSÃO	30
4.5	REFERÊNCIAS	30
5	CONCLUSÃO	33
	REFERÊNCIAS	34

1 INTRODUÇÃO

O estado do Rio Grande do Sul tem sua dinâmica de desenvolvimento fortemente relacionada à agropecuária, a qual se constitui como um elo do importante complexo agroindustrial presente na economia gaúcha (PINTO; CORONEL, 2016). A agropecuária está presente em todo o estado, sendo geradora de renda em grande parte dos pequenos e médios municípios (FOCHEZATTO; GHINIS, 2012).

De acordo com os dados do Censo Agropecuário divulgados pelo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) em 2020, 42% dos 21,7 milhões de hectares ocupados pelos 365.094 estabelecimentos agropecuários do Rio Grande do Sul são compostos por pastagens. As pastagens naturais predominam, totalizando 7,5 milhões de hectares (correspondendo a 82,2% do total) e sendo o principal recurso utilizado para a criação de gado de corte no estado gaúcho. O restante das pastagens é composto por pastagens plantadas, que estão em boas condições (representando 16,8%) ou degradadas (representando 1,0%) (FEIX et al., 2022).

Portanto, destaca-se que a base forrageira da pecuária de corte sul-brasileira é a pastagem nativa, formada basicamente de espécies que crescem bem durante a primavera-verão, mas entram em dormência ou produzem muito pouco durante o inverno, devido às baixas temperaturas e geadas. Diante disso, os animais perdem peso e ocorre aumento na taxa de mortalidade, uma vez que a oferta de pastejo se torna escassa e de baixa qualidade (MEIER et al., 2017).

A semeadura de gramíneas e de leguminosas anuais de inverno, isoladamente ou em misturas, como, por exemplo, as aveias, o centeio, o azevém, a ervilhaca e os trevos para cobertura de solo e para pastejo, é uma alternativa econômica que proporciona a oportunidade de se conciliar na mesma área a produção de bovinocultura de corte no inverno, com a produção de grãos no verão. Desta forma, a produção de forragem para cobertura é importante tanto para conservação dos solos, quanto para alimentação dos animais (GONÇALVES; BORGES; FERREIRA, 2009).

Em regiões de clima tropical e subtropical, as práticas inadequadas de manejo do pastejo são apontadas como uma das principais causas de degradação das pastagens (DIAS-FILHO, 2014). No Brasil, a degradação de pastagens decorre principalmente do mau manejo do pastejo, da falta de reposição de nutrientes nos solos e da ocorrência de insetos pragas e doenças (TORRES, 2022). São várias as espécies de insetos pragas possíveis de estarem presentes em pastagens, contudo

os danos normalmente se tornam relevantes quando ocorre aumento da população de determinado inseto como cigarrinha, pulgões, formigas, cochonilhas, cupins e lagartas desfolhadoras (SARTOR; GOUVEA, 2009).

Apesar de haver uma ampla variedade de pragas associadas às gramíneas forrageiras, o manejo destas recebe pouca atenção, mesmo considerando sua importância. É comum observar um interesse tardio por parte dos produtores, que só percebem os danos quando estes se tornam muito evidentes. Essa demora na busca por uma solução e tomada de decisão de controlar as pragas pode resultar na perda significativa da pastagem e, conseqüentemente, da produção (TORRES, 2022).

No Brasil, *Penthaleus major*, conhecido como ácaro-azul-das-pastagens, foi detectado atacando plantas de aveia (*Avena strigosa* Schreb) para pastejo em uma propriedade privada localizada entre os municípios de André da Rocha e Protásio Alves no estado do Rio Grande do Sul, em 2 de julho de 2009 (PEREIRA et al., 2017). Após um intervalo de tempo sem relatos de ocorrência, em 13 de agosto e 31 de julho de 2020, nos municípios de Cachoeira do Sul (30°18'13" S; 53°18'54" O) e André da Rocha (-28°41'33.8"S; -51°32'17.3"O), respectivamente, ácaros desta espécie foram encontrados novamente em propriedades privadas, também em pastagens de aveia.

Para um melhor entendimento e conhecimento sobre a presença do ácaro-azul-das-pastagens no Brasil, são necessários estudos mais aprofundados além da morfologia externa e ecologia, sendo de extrema importância estudos utilizando marcadores moleculares.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 PRAGAS INVASIVAS NAS PASTAGENS DO RIO GRANDE DO SUL

As forrageiras de clima temperado são muito importantes para os sistemas agropastoris na região sul do Brasil, sobretudo para o suprimento de forragem aos rebanhos durante o inverno. Elas podem ser cultivadas individualmente, consorciadas com outras culturas de verão ou sobressemeadas em pastagens naturais melhoradas. No Rio Grande do Sul, apesar da importância do setor da agropecuária, uma proporção significativa das sementes utilizadas para pastejo são informais e não passaram pelo sistema oficial de produção de sementes, o que aumenta o risco de introdução de pragas, doenças e inviabilização do sistema produtivo. A pouca disponibilidade de sementes forrageiras temperadas de cultivares melhorados no comércio local do estado leva os agricultores a explorar alternativas, como adquirir sementes de países vizinhos, como Uruguai e Argentina. Embora essas sementes possam ser de qualidade satisfatória, sua aquisição e uso trazem consigo riscos para a agricultura, pois muitas vezes não têm uma origem garantida e podem introduzir pragas invasoras (SARMENTO, 2016).

Os organismos envolvidos no processo de invasão biológica são referidos como “Espécies Invasoras Exóticas” (EIEs). De acordo com a Convenção Internacional de Diversidade Biológica (CBD), uma espécie é classificada como exótica quando está localizada fora de sua região endêmica (CBD, 1992). Se a espécie introduzida é capaz de gerar uma prole fértil e sobreviver em um novo habitat, ela é considerada estabelecida. E, se a espécie estabelecida se expandir em sua distribuição, colocando em risco a diversidade biológica de um determinado ambiente ou a sua produção agropecuária, ela é classificada como uma espécie invasiva (MACK et al., 2000). Condições ambientais mais favoráveis podem facilitar e propiciar maior número de gerações da praga por safra, aumentando os danos e facilitando o estabelecimento.

Apesar de aproximadamente 80% das espécies exóticas serem intencionalmente introduzidas para uso humano direto ou indireto, a maioria dos insetos, ácaros, fungos, bactérias, vírus, nematoides e outros similares que são pragas de plantas cultivadas ou silvestres, são geralmente introduzidos acidentalmente (FIDELIS et al., 2018). Portanto, as atividades humanas, como

turismo, tráfego aéreo, comércio internacional e introdução intencional para fins recreativos ou de controle biológico, podem estar associadas à introdução de espécies invasivas (MICHEREFF FILHO; VILELA, 2001; RAMALHO; SANTOS, 1994; SHORT; SMITH, 1994).

A introdução de espécies invasoras no Brasil é especialmente preocupante devido às suas dimensões continentais, fronteiras extensas (mais de 16 mil km com dez países), grande variedade de condições climáticas e intenso fluxo de importações e exportações (IBGE, 2015; OLIVEIRA et al., 2013). Ademais, o país abriga mais de 43 mil espécies vegetais, tornando-o altamente suscetível ao risco de invasões de pragas (FIDELIS et al., 2018). As espécies invasivas são a segunda maior causa de perda de biodiversidade global, podendo causar danos ambientais, prejuízos econômicos e impactos sociais negativos (BASKIN, 2002; VÁZQUEZ; ARAGON, 2002).

No caso das espécies invasoras que impactam os agroecossistemas, a principal via de introdução ocorre por meio do comércio de produtos vegetais, tanto no transporte de sementes ou mudas como na movimentação de lotes comerciais (SUGAYAMA et al., 2015).

2.2 ÁCARO-AZUL-DAS-PASTAGENS, *Penthaleus major*

Houve muita confusão em torno da identidade das espécies do gênero *Penthaleus* no decorrer dos anos. Em 1834, Dugés descreveu a espécie na França como *Tetranychus majeure*, que posteriormente foi latinizada para *Tetranychus major*. Em 1835, a espécie foi denominada como *Penthaleus haematopus* e, em 1838, como *Penthaleus erythropus*. O primeiro registro fora da Europa foi feito por Banks (1902) em trigo no oeste da América do Norte, inicialmente descrito como *Notophallus dorsalis* e mais tarde como uma nova espécie, *Notophallus viridis*. E, posteriormente, Chada et al. (1956) criaram o nome "ácaro do cereal de inverno" (UMINA; HOFFMANN; WEEKS, 2004).

Também conhecido como ácaro-azul-das-pastagens, *Penthaleus major* (Penthaleidae) é uma praga amplamente distribuída no mundo. Há relatos de sua ocorrência na Oceania (Austrália, Nova Gales do Sul, Victoria e Tasmânia), Europa (Alemanha, Espanha, França, Groenlândia, Islândia, Itália, Noruega e Portugal), África (Marrocos e África do Sul), América do Norte (Estados Unidos e Canadá), América

Central (México), América do Sul (Argentina e Brasil) e Ásia (China) (GRASSO, 1958; GUDLEIFSSON; OLAFSSON, 1987; GUDLEIFSSON et al., 2002; HALLAS; GUDLEIFSSON, 2004; JOHANSEN et al., 2002; PEREIRA et al., 2017; QIN; HALLIDAY, 1996; REN et al., 2008; UMINA, 2007; WALLACE; MAHON, 1971; WEEKS; TURELLI; HOFFMANN, 2000).

O gênero *Penthaleus* é distinguido de outros gêneros da família Penthaleidae pela posição dorsal de seu ânus. Os adultos de *Penthaleus* têm tamanho entre 700-1100 µm de comprimento e 550-920 µm de largura, e podem chegar a 15.000 ácaros por m² (RIDSDILL-SMITH, 1991; WEEKS; HOFFMANN, 1999). O corpo é de forma globular, de cor azul-escuro, e possui uma marca de cor vermelho-laranja em torno do ânus (NARAYAN, 1962). Os quatro pares de pernas e o gnatossoma (ápice da cabeça, onde estão localizadas as peças bucais e a abertura bucal) também são de cor laranja-vermelho (Figura 1).

Figura 1 – Ácaro-azul-das-pastagens, *Penthaleus major*



Fonte: (PEREIRA et al., 2017).

Narayan (1962) concluiu que a espécie *Penthaleus major* passa por quatro estágios antes do estágio adulto (ovo, larva, protoninfa, deutoninfa e adulto). Entretanto, alguns autores afirmam que existe um estágio pré-larval (*deutovum*), dois

estágios ninfais nesta espécie, e posteriormente há um período de incubação para um terceiro estágio ninfal (JEPPSON; KEIFER; BAKER, 1975). As larvas possuem cerca de 300 µm de comprimento, são ovais e possuem três pares de pernas. Quando emergem, são de cor laranja-rosada, que muda rapidamente para marrom, e depois para verde. As ninfas são maiores, com um comprimento corporal variando entre 450 e 540 µm, também possuem quatro pares de pernas (geralmente vermelhas), e variam em cor de marrom claro a verde (NARAYAN, 1962).

As espécies de *Penthaleus* são ativas no campo durante o inverno. Na primavera, os ácaros produzem ovos em diapausa para sobreviver às condições desfavoráveis do verão, os quais eclodem assim que as condições favoráveis estiverem presentes no outono seguinte (WEEKS; HOFFMANN, 1999). Todavia, as espécies de *Penthaleus* diferem entre si no momento em que produzem ovos em diapausa (UMINA; HOFFMANN, 2003). *Penthaleus major* produz ovos de diapausa no outono, quase imediatamente após a emergência, e continua produzindo esses ovos durante todo o período em que os adultos estão ativos (UMINA; HOFFMANN; WEEKS, 2004).

Na Austrália, onde *Penthaleus major* é uma praga agrícola importante, há duas ou três gerações por ano, dependendo das condições, enquanto na América do Norte ocorrem apenas duas gerações por ano (JEPPSON; KEIFER; BAKER, 1975; NARAYAN, 1962). O tempo de geração no campo é de 8 a 10 semanas (UMINA; HOFFMANN; WEEKS, 2004). Entretanto, Weeks e Hoffmann (1999) encontraram um tempo de geração (de adulto a adulto) de menos de 7 semanas para *Penthaleus major* quando analisado em laboratório.

O ácaro-azul-das-pastagens tem preferência por solos arenosos e é encontrado em folhas próximas ao solo (UMINA, 2007). O dano causado por este ácaro é devido ao seu hábito alimentar, pois ao perfurar e sugar a seiva das folhas, resulta em lacerações da epiderme e remoção da clorofila das células. Isso pode causar uma aparência prateada às plantas (Figura 2) e redução de altura (CHADA et al., 1956; HALLAS; GUDLEIFSSON, 2004; NARAYAN, 1962). As infestações deste ácaro muitas vezes resultam em manchas irregulares verdes ou acinzentadas na lavoura, conforme a Figura 3 (DHOORIA, 2016). De acordo com Kobayashi et al. (1991), *Penthaleus major* reduz o rendimento de gramíneas perenes.

Figura 2 – Aparência prateada em planta de aveia devido ao dano causado por *Penthaleus major*



Fonte: CASTILHOS, 2020.

Figura 3 – Dano causado por *Penthaleus major* em pastagem de aveia branca no Rio Grande do Sul, Brasil



Fonte: CASTILHOS, 2020.

Este ácaro polífago é encontrado principalmente na aveia (*Avena* spp.) e em pastagens. Contudo, ocorre esporadicamente em trigo (*Triticum aestivum* L.), cevada (*Hordeum vulgare* L.), ervilhas (*Pisum* spp.), lentilha (*Lens culinaris* M.), alfafa (*Medicago sativa* L.), e muito raramente em canola (*Brassica napus* L.) (ROBINSON; HOFFMANN, 2001; UMINA, 2007; WEEKS; HOFMANN, 1999).

2.3 USO DE MARCADORES MOLECULARES PARA IDENTIFICAÇÃO E ESTUDO DE PRAGAS INVASIVAS

O desenvolvimento de novas técnicas de análise molecular proporcionou grandes avanços na pesquisa entomológica aplicada às pragas. A caracterização molecular complementa a caracterização morfológica, garantindo maior confiabilidade e precisão na identificação de espécies, além de facilitar estudos posteriores (CABRERA; GOMEZ; MICHELI, 2008).

Um marcador molecular é uma sequência de DNA que geralmente possui um local conhecido em um determinado cromossomo, associado a um determinado gene ou característica de um indivíduo ou de uma espécie (AL-SAMARAI; AL-KAZAZ, 2015). Desta forma, para estudos de genética de população de pragas, o DNA mitocondrial (mtDNA) tem sido amplamente empregado como marcador molecular, devido à facilidade de manipulação, ausência de recombinação significativa, e facilidade de isolamento e replicação por meio de primers universais (AVISE et al., 2000). Além do mais, alguns estudos apontam que o emprego de marcadores mitocondriais tem se mostrado adequado para a análise de pragas emergentes nos estágios iniciais de invasão (BOUBOU et al., 2011; SOSA-GÓMEZ et al., 2012).

O DNA mitocondrial (mtDNA) consiste em uma molécula circular, compacta e com conteúdo gênico altamente conservado, possuindo um menor número de genes quando comparado ao DNA nuclear (1-2% do tamanho do genoma nuclear). O DNA mitocondrial é organizado em um filamento duplo circular, em vez de uma dupla hélice como no DNA nuclear, e apresenta uma alta taxa de mutação devido à sua proximidade com a cadeia respiratória, resultando em uma grande diversidade entre e dentro de populações. Além disso, é transmitido exclusivamente pela linhagem materna (haploide), no entanto, este aspecto foi questionado por alguns autores (DOKIANAKIS; LADOUKAKIS, 2014; NUNES; DOLEZAL; SCHLOTTERER, 2013).

Ademais, os genes mitocondriais estão presentes em maior número de cópias nas células e demandam um tamanho populacional menor que os genes nucleares para estudos genéticos (MOORE, 1995; PALUMBI; CIPRIANO; HARE, 2001; ROLLINS et al., 2011). Em vista disso, determinados segmentos do mtDNA têm sido utilizados internacionalmente como o “código de barras” de diferentes espécies, devido a agilidade na identificação molecular de diferentes populações quando comparado a identificação de espécies com genes nucleares (DNA Barcoding) (ARNEMANN et al., 2016).

O DNA Barcoding é um instrumento de investigação para reconhecimento de espécies e verificação da categorização na qual o organismo está inserido, utilizando sequenciamento de DNA e avaliação da diversidade genética. Esta técnica pode ser empregada para a rápida e eficiente identificação de espécies.

Os segmentos do mtDNA mais comumente utilizados para a identificação de espécies são as regiões citocromo oxidase sub-unidade I (COI), citocromo oxidase sub-unidade II (COII), citocromo B (Cytb), 28S-D2 e ND4, devido ao alto nível de conservação desses genes (ARNEMANN et al., 2016; GEBIOLA; BERNARDO; BURKS, 2010; SIMON et al., 1994). O gene COI é amplamente distribuído entre os diferentes grupos taxonômicos e apresenta uma grande diversidade genética, permitindo a identificação precisa de espécies (BOEHME et al., 2010; KIM et al., 2017; OLIVEIRA et al., 2013). Análises de variabilidade dentro da região COI podem auxiliar na compreensão dos padrões de dispersão da praga e fornecer indicadores de diversidade genética, como o número de haplótipos (ou seja, linhagens maternas) (KANG et al., 2019; MADDEN et al., 2019; PIPER et al., 2019).

Os fragmentos de mtDNA são facilmente extraídos dos indivíduos utilizando-se uma série de reagentes específicos, para em seguida serem replicados na ordem de milhões de cópias por meio de uma reação em cadeia da polimerase (PCR). Após a obtenção dos produtos amplificados de mtDNA, estes podem ser sequenciados e, então, a identidade da espécie pode ser determinada mediante a comparação da sequência desconhecida com uma base de dados de sequências padrões, utilizando métodos semelhantes ao utilizado no BLAST no GenBank, podendo posteriormente ser disponibilizada para uso público (SOSA-GÓMEZ et al., 2012).

A caracterização molecular tem sido aplicada para identificar pragas quarentenárias e monitorar a entrada de pragas de outros países no Brasil. Essa técnica é especialmente útil em situações em que há poucos indivíduos disponíveis,

o que pode dificultar a identificação baseada apenas em características morfológicas. Além disso, em casos de introdução de pragas, essa técnica pode ser uma alternativa quando não há especialistas em taxonomia disponíveis para realizar a identificação correta ou quando o processo de identificação pode ser demorado devido à escassez de tempo dos especialistas (SOSA-GÓMEZ et al., 2012).

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Confirmar a presença da espécie de ácaro *Penthaleus major* no Rio Grande do Sul, Brasil, por meio da identificação molecular.

3.2 OBJETIVO ESPECÍFICO

Caracterização molecular de *Penthaleus major* no Rio Grande do Sul, Brasil.

4 ARTIGO

IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DO ÁCARO-AZUL-DAS-PASTAGENS (*Penthaleus major*) NO BRASIL

MOLECULAR IDENTIFICATION AND CHARACTERIZATION OF THE BLUE OAT MITE (*Penthaleus major*) IN BRAZIL

RESUMO

O ácaro-azul-das-pastagens, *Penthaleus major* (Dugés) (Penthaleidae), é uma praga amplamente distribuída no mundo. O dano causado por este ácaro se deve ao seu hábito alimentar, causando a laceração da epiderme e remoção de clorofila das células, implicando aparência prateada às plantas e altura reduzida. No Brasil, *Penthaleus major* foi detectado atacando plantas de aveia para pastejo em uma propriedade privada localizada entre os municípios de André da Rocha e Protásio Alves, estado do Rio Grande do Sul (RS), no ano de 2009. Após um intervalo de tempo sem relatos de ocorrência, em 2020, nos municípios de André da Rocha e Cachoeira do Sul, RS, ácaros foram encontrados em propriedades privadas, também em pastagens de aveia. Este trabalho teve como objetivo realizar e documentar a identificação e caracterização molecular desta espécie, a fim de confirmar a presença do ácaro-azul-das-pastagens no Brasil. Para isso, espécimes destes ácaros foram coletados e submetidas a extração de DNA genômico e técnicas de PCR para a amplificação do gene mitocondrial citocromo oxidase I (COI). O estudo confirmou a introdução e presença da espécie *Penthaleus major* no Brasil por meio da identificação molecular, garantindo maior precisão e confiabilidade na identificação desta espécie.

Palavras-chave: Penthaleidae. DNA genômico. Praga invasiva.

4.1 INTRODUÇÃO

O ácaro-azul-das-pastagens, *Penthaleus major* (Penthaleidae), é uma praga agrícola ativa no campo durante o inverno, sendo amplamente distribuída no mundo. *Penthaleus major* é uma praga polífoga, encontrada principalmente em pastagens e plantas de aveia (*Avena* spp.) (WEEKS; HOFMANN, 1999). Possui preferência por solos arenosos e é encontrado em folhas próximas ao solo (UMINA, 2007). O dano causado por este ácaro é devido ao seu hábito alimentar, pois ao perfurar e sugar a seiva das folhas causa lacerações da epiderme e remoção da clorofila das células, reduzindo a altura e causando aparência prateada às plantas (CHADA et al., 1956; NARAYAN, 1962; HALLAS; GUDLEIFSSON, 2004).

Os adultos de *Penthaleus major* têm tamanho entre 700-1100 µm de comprimento e 550-920 µm de largura (RIDSILL-SMITH, 1991). O corpo é de forma globular, de cor azul-escuro, e possui uma marca de cor vermelho-laranja em torno do ânus (NARAYAN, 1962). Os quatro pares de pernas e o gnatossoma também são de cor laranja-vermelho. As larvas possuem cerca de 300 µm de comprimento, são ovais e possuem três pares de pernas. Quando emergem, são de cor laranja-rosada, que muda rapidamente para marrom, e depois para verde. As ninfas são maiores, com um comprimento corporal variando entre 450 e 540 µm, também possuem quatro pares de pernas (geralmente vermelhas), e variam em cor de marrom claro a verde (NARAYAN, 1962).

Penthaleus major produz ovos em diapausa para sobreviver às condições desfavoráveis do verão, os quais eclodem assim que as condições favoráveis estiverem presentes. O tempo de geração no campo é de 8 a 10 semanas (UMINA; HOFFMANN; WEEKS, 2004; WEEKS; HOFFMANN, 1999). A reprodução desta espécie é feita por partenogênese telítoca, com populações compostas por clones femininos (WEEKS; FRIPP; HOFFMANN, 1995).

No Brasil, *Penthaleus major* foi detectado pela primeira vez em 2009 atacando plantas de aveia (*Avena strigosa* Schreb) para pastejo em uma propriedade privada localizada entre os municípios de André da Rocha e Protásio Alves no estado do Rio Grande do Sul, sendo identificado por meio do estudo de sua morfologia externa e taxonomia (PEREIRA et al., 2017). Após um intervalo de tempo sem relatos de ocorrência, em 13 de agosto e 31 de julho de 2020, nos municípios de Cachoeira do Sul (30°18'13" S; 53°18'54" O) e André da Rocha (-28°41'33.8"S; -51° 32'17.3"O),

respectivamente, ácaros desta espécie foram encontrados novamente em propriedades privada, também em pastagens de aveia (Figura 4).

Figura 4 – Adultos de *Penthaleus major* em plantas e de aveia, no município de Cachoeira do Sul, Rio Grande do Sul, Brasil



Fonte: CASTILHOS, 2020.

Penthaleus major estava presente na lista de pragas quarentenárias ausentes do Brasil, na Instrução Normativa nº 41/2008/MAPA (Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento), sendo considerado, portanto, uma praga de importância econômica potencial para determinada área em perigo. Desta forma, para obter um entendimento mais aprofundado sobre ácaro-azul-das-pastagens, o qual é considerado uma praga invasiva ao Brasil, é essencial realizar estudos que vão além da morfologia externa e ecologia, para obter maior precisão e confiabilidade a respeito de sua introdução no país. Nesse contexto, o uso de marcadores moleculares desempenha um papel fundamental para confirmar a espécie.

Dentre os diversos marcadores moleculares disponíveis, o gene COI (citocromo oxidase C subunidade I) foi selecionado para o desenvolvimento deste estudo. Esse

gene está amplamente distribuído entre os diferentes grupos taxonômicos e apresenta uma grande diversidade genética (BOEHME et al., 2010; KIM et al., 2017). A utilização dessa região do mtDNA (DNA mitocondrial) em estudos tem se mostrado especialmente útil na identificação de espécies (OLIVEIRA et al., 2013). Portanto, para confirmar a presença de *Penthaleus major* no Brasil, este trabalho teve como objetivo realizar e documentar a identificação molecular desta espécie, bem como sua caracterização molecular para facilitar estudos posteriores.

4.2 MATERIAL E MÉTODOS

4.2.1 Coleta e preservação de espécimes de *Penthaleus major*

Ao todo, foram coletados trinta ácaros nas pastagens de aveia nos municípios de André da Rocha e Cachoeira do Sul, estado do Rio Grande do Sul (RS), em 31 de julho e 13 de agosto de 2020, respectivamente. Os ácaros foram manualmente removidos da pastagem e colocados em tubos de 1,5 mL contendo etanol a 98% para preservar seu DNA, e enviados ao Laboratório de Manejo Integrado de Pragas (LabMIP), na Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), em Santa Maria, RS, Brasil, onde foram armazenados a -20 °C até a extração do DNA genômico.

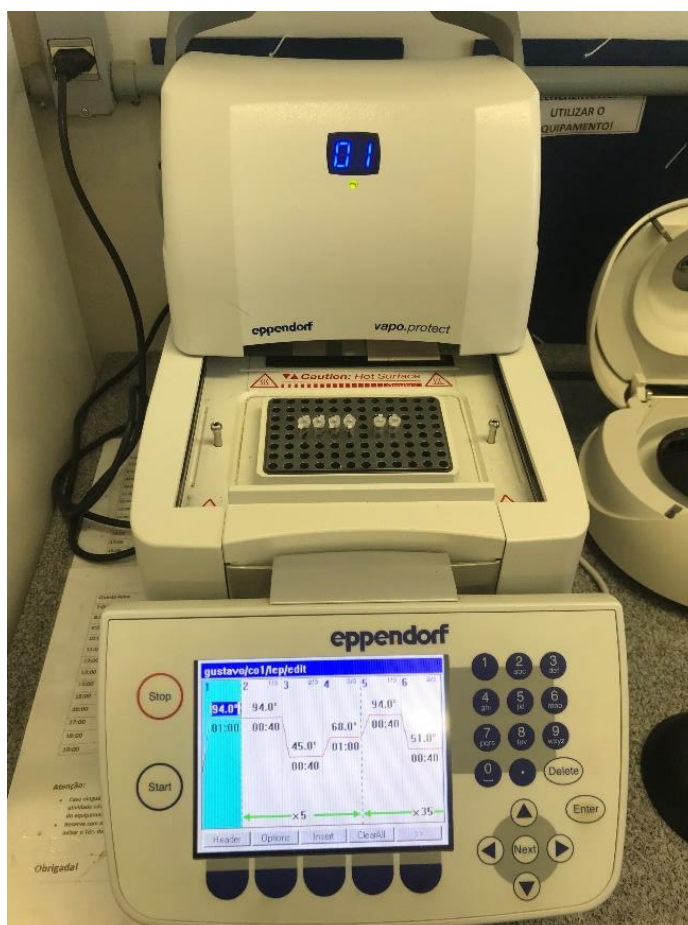
4.2.2 Extração de DNA, amplificação por PCR e sequenciamento do gene COI

Os espécimes individuais foram submetidos à extração de DNA genômico (gDNA), usando o Qiagen DNasy Blood and Tissue DNA Extraction Kit (Qiagen, Hilden, Alemanha) segundo as recomendações do fabricante para obter o material genético.

Cada ácaro preservado em etanol foi removido do frasco de amostra e deixado secar ao ar em papel absorvente. O corpo inteiro do ácaro foi macerado individualmente em um tubo de 1,5 mL contendo 180 µL de tampão ATL e 20 µL de proteinase K, e incubado a 37°C por 24 horas. Em seguida, o DNA genômico foi purificado em uma matriz de sílica e eluído em 30 µL de tampão AE. A concentração de DNA foi avaliada em um espectrofotômetro (NanoDrop™ 1000, Thermo Scientific, Wilmington, DE, EUA).

A amplificação do gene mitocondrial citocromo oxidase I (COI) foi realizada via Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), utilizando primer Lep. Cada reação de PCR foi realizada em um volume final de 25 μL composto por 2,5 μL de tampão de reação JumpStart™ (10X), 0,5 μL de dNTP (10 mM), 0,5 μL de primer Lepf1 (ATT CAA CCA ATC ATA AAG ATA T) (10 μM), 0,5 μL de primer Lepr1 (TAA ACT TCT GGA TGT CCA AAA A) (10 μM), 0,1 μL de Platinum™ Taq DNA Polimerase (5 U/ μL), 1 μL de gDNA (30 ng), 0,1 μL de MgSO_4 (50 mM), e 18,9 μL de água ultrapura. A amplificação por PCR consistiu em uma etapa inicial de desnaturação a 95°C por 5 minutos, seguida de 34 ciclos a 95°C por 30 segundos, 61°C por 30 segundos e 72°C por 30 segundos, e uma extensão final a 72°C por 5 minutos (Figura 5).

Figura 5 - Termociclador (equipamento para realizar a PCR)



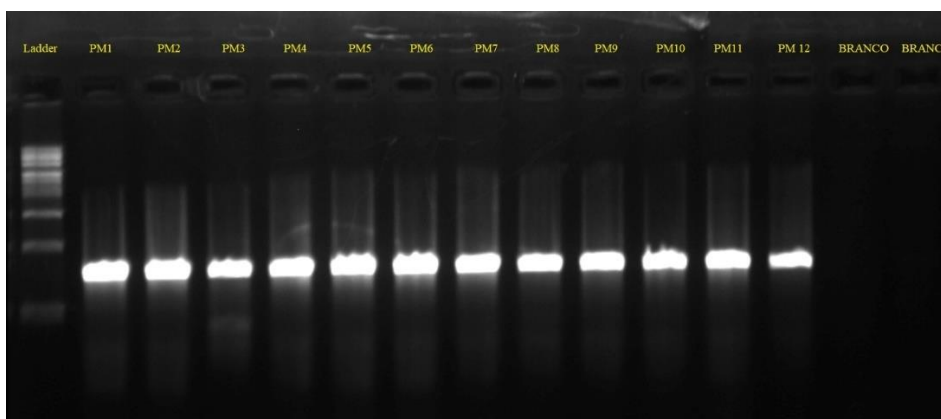
Fonte: CASTILHOS, 2023.

As amostras amplificadas foram atestadas por eletroforese, por meio da visualização em gel de agarose TAE a 1,5%. Todos os produtos de PCR foram amplificados com sucesso e sequenciados pela ACTGene Molecular Analyses (Alvorada, RS, Brasil), utilizando o método de terminação BigDye em um analisador genético ABI 3500 (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA). A avaliação da qualidade, a edição e a análise de cada sequência de DNA foram realizadas utilizando os softwares Pregap4 e Gap4 dentro do pacote Staden (Staden e Bonfield 2000).

4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A metodologia utilizada no trabalho para a extração e amplificação do gene mitocondrial citocromo oxidase I (COI) foi eficiente e adequada quando analisada na eletroforese em gel agarose (Figura 6), pois todas as bandas analisadas de cada espécime de ácaro coletado foram amplificadas, o que permitiu obter o sequenciamento genético dos ácaros (Figura 7).

Figura 6 – Eletroforese em gel agarose para verificar a amplificação genética do genoma mitocondrial



Fonte: CASTILHOS, 2020.

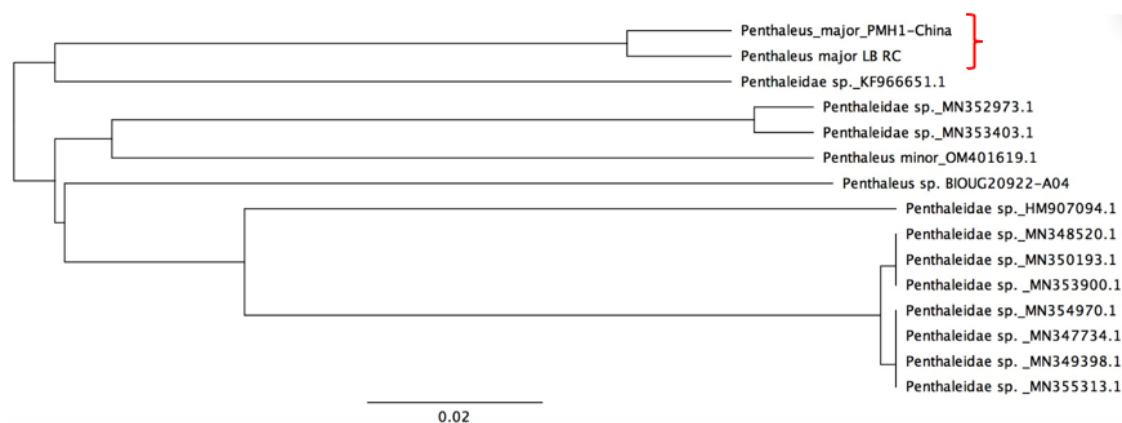
Figura 7 – Sequenciamento do gene mitocondrial citocromo oxidase I (COI) dos ácaros coletados em Cachoeira do Sul e André da Rocha, Rio Grande do Sul, Brasil

```
CCTCCAGCTGGATCAAAAAATGAGGTGTTAAAATTCGATCCGTTAATAATATTGTAATTGCTCCTGCTAAAAACAGGTAATG
ATAAGAGTAATAAAATAGCTGTAATTACTGATCAAACAAATAGTGAATTCGTTCAAATTTATTATAAAAGGTCGTATAT
TTAAAATAGTAGTAATAAAATTAATTGCTCCTAAAATTGAAGAAATTCCTGCTATATGTAATGAGAAAATAGTTAAGTCTACT
GATCTTCCATTATGAAATATTTGACTAGATAAAGGTGGATATACTGTTTCATCCTGTCCTCTTCTGAGTCAGTAAAAGCAGA
TAAAATAAAAGAGTCAGAGAAGGAGGAAGTAATCAGAACTTATATTATTATACGAGGAAAAGCTATATCAGGGGCTCT
AATTATTATTGGTACTAATCAATTTCAAATCCTCCAATTATAATAGGTATAACTATAAAAAAAATATTACAAATGCGTGAGCT
GTTACTACTACATTATAAATTTGATCGTTTTGCCCTATTAAGGATGGATTTCTAGTTTTATTGCAATAAAACCTTTATAGATG
ATCCTAGGAGTGCTGCATAGACCAAATCCAAAATATATAGTTCCAATATCTTTATG
```

Fonte: CASTILHOS, 2020

Conforme a árvore filogenética, a análise molecular das amostras coletadas nos municípios de Cachoeira do Sul e André da Rocha, (*Penthaleus major* LB RC) identificou e confirmou a espécie como *Penthaleus major*, com base em sua semelhança com a amostra desta espécie encontrada na China, (*Penthaleus major* PMH1-China) (Figura 8) (WANG et al., 2023). No entanto, as amostras coletadas no Brasil não mostraram semelhanças com as sequências de *Penthaleus* sp. disponíveis no GenBank. Essa falta de similaridade com sequências do GenBank também foi observada no estudo de Wang et al. (2023).

Figura 8 – Árvore filogenética representando a similaridade entre ácaros coletados no Brasil (*Penthaleus major* LB RC) e ácaros coletados na China (*Penthaleus major* PMH1-China), e comparados às demais sequências de *Penthaleus* sp. disponíveis no GenBank



Fonte: CASTILHOS, 2020.

Penthaleus major se reproduzem por partenogênese telítoca, com populações compostas por clones femininos. A partenogênese telítoca é um tipo de partenogênese em ácaros que envolve a produção de ovos femininos sem fertilização (WEEKS; FRIPP; HOFFMANN, 1995) Nesse processo, o desenvolvimento embrionário ocorre a partir de um ovo não fertilizado, resultando na reprodução assexuada da espécie. Os descendentes gerados por partenogênese telítoca são geneticamente idênticos à progenitora e não há contribuição genética masculina na formação desses indivíduos. Esse mecanismo reprodutivo permite a rápida colonização de novos habitats, bem como a rápida expansão populacional.

Estudos apontam que há uma redução na diversidade clonal em direção à margem da distribuição de uma espécie de ácaro terrestre (ROBINSON; WEEKS; HOFFMANN, 2002). Esse padrão pode ser atribuído à seleção em resposta a fatores climáticos ou à descontinuidade do habitat. Conseqüentemente, à medida que as populações se tornam mais marginais, ocorre uma diminuição na diversidade genética. Desta forma, a reprodução por partenogênese telítoca associada à recente introdução deste ácaro no Brasil (PEREIRA et al., 2017), pode ser a explicação para a pouca diversidade genética observada entre as populações de *Penthaleus major* coletadas no Rio Grande do Sul.

As informações sobre a invasão do *Penthaleus major* no Brasil ainda são limitadas. Acredita-se que a introdução desta praga no Rio Grande do Sul ocorreu provavelmente por meios naturais (PEREIRA et al., 2017). A dispersão de ácaros terrestres não foi amplamente estudada (UMINA; HOFFMANN; WEEKS, 2004). No entanto, os adultos de *Penthaleus major* não se deslocam além de 10 metros ao longo de sua vida em qualquer direção dentro de um ambiente de pastagem (WEEKS; TURELLI; HOFFMANN, 2000).

A principal via de introdução de espécies invasoras que afetam os agroecossistemas é por meio do intercâmbio de produtos, como germoplasmas ou lotes comerciais. Pragas podem estar diretamente associadas à parte da planta que é intercambiada ou podem estar presentes nos produtos como contaminantes, sendo que os lotes de sementes representam um meio de dispersão para ácaros fitófagos (GONZAGA et al., 2015). Nesse sentido, existe a possibilidade de introdução de *Penthaleus major* no Brasil por meio do uso de sementes não certificadas no estado do Rio Grande do Sul para a produção de pastagens, as quais frequentemente são

importadas da Argentina (SARMENTO, 2016), pois é um país onde *Penthaleus major* já foi detectado por Grasso (1958).

A invasão biológica é um processo complexo que envolve estágios sequenciais, nos quais o sucesso em cada estágio é crucial para avançar para o próximo. As espécies não-nativas devem passar por pelo menos três estágios antes de causar impactos econômicos ou ecológicos significativos. Esses estágios incluem transporte, entrada, estabelecimento e disseminação (SUGAYAMA et al., 2015). No caso de *Penthaleus major*, a espécie está atualmente na fase de estabelecimento, uma vez que foi detectada no Brasil em 2009 e encontrada novamente 11 anos depois, em 2020, em apenas dois municípios. Portanto, ainda não ocorreu uma disseminação ampla da espécie.

Um dos desafios principais para estimar a disseminação de espécies não-nativas em áreas receptoras é o período de latência, que se refere ao intervalo entre o estabelecimento e o início da disseminação, quando a espécie começa a expandir sua área de ocorrência. Os períodos de latência podem ocorrer devido à necessidade de adaptação evolutiva após o estabelecimento. Mudanças adaptativas, morfológicas ou fisiológicas, podem ser necessárias no novo ambiente e, somente quando essas mudanças ocorrem, a espécie não-nativa poderá se expandir com sucesso (SUGAYAMA et al., 2015).

Para evitar a disseminação de *Penthaleus major* no Brasil e prevenir potenciais problemas, é recomendável realizar a erradicação dessa espécie. Após o período de latência, existe o risco de sua dispersão e o surgimento de sérios impactos. A utilização de agrotóxicos é uma estratégia comumente adotada no manejo de *Penthaleus major*, sendo suscetível a piretroides, organofosforados e neonicotinoides (UMINA; HOFFMANN, 1999; ROBINSON; HOFFMANN, 2000; UMINA et al., 2010). A eficácia da aplicação por pulverização é altamente dependente do momento adequado (UMINA; HOFFMANN, 2003). Estudos realizados por James et al. (1995) identificaram um complexo de inimigos naturais que atuam contra as espécies de *Penthaleus*. Os predadores mais importantes pertencem às famílias de ácaros Anystidae, Bdellidae, Erythraeidae, Parasitidae e Cunaxidae. Portanto, é fundamental considerar esses agentes de controle biológico na implementação de estratégias de manejo para minimizar a proliferação e os danos causados por *Penthaleus major*.

4.4 CONCLUSÃO

O estudo confirmou a introdução e presença da espécie *Penthaleus major* no Brasil, por meio da identificação molecular. A caracterização molecular complementa a caracterização morfológica de *Penthaleus major*, garantindo maior confiabilidade e precisão na identificação da espécie, além de facilitar estudos posteriores. Pesquisas devem ser realizadas para monitorar a possível propagação deste ácaro para outros municípios e estados do país.

4.5 REFERÊNCIAS

- BOEHME, P. et al. Molecular identification of carrion-breeding scuttle flies (Diptera: Phoridae) using COI barcodes. **International Journal of Legal Medicine**, v. 124, p. 577-581, 2010.
- CHADA, H. L. et al. Biology of the winter grain mite and its control in small grains. **Journal of Economic Entomology**, v. 49, n. 4, p. 515-520, 1956.
- GONZAGA, V. et al. Quarentena vegetal no Brasil. In: VILELA, E. F.; ZUCCHI, R. A. (Ed.). **Pragas introduzidas no Brasil: insetos e ácaros**. p. 67-108, 2015.
- GRASSO, A. I. Sobre dos acaros de interes agricola nuevos para la Argentina, *Penthaleus major* (Dugés) y *Petrobia latens* (Müller). **Sociedad Científica Argentina**, v. 166, p. 41-44, 1958.
- HALLAS, T. E.; GUDLEIFSSON, B. E. Life cycles of *Penthaleus major* (Dugés) (Acari, Prostigmata) in hayfields in northern Iceland. **Icelandic Agricultural Sciences**, v. 16, n. 17, p. 39-44, 2004.
- JAMES, D. G. et al. Biological control of earth mites in pasture using endemic natural enemies. **Plant Protection Quarterly**, v. 10, p. 58-58, 1995.
- KIM, S.; LEE, W.; LEE, S. Estimation of a new molecular marker of the genus *Stathmopoda* (Lepidoptera: Stathmopodidae): Comparing EF1a and COI sequences. **Journal of Asia-Pacific Entomology**, v. 20, p. 269-280, 2017.
- NARAYAN D.S. Morphological, biological and ecological studies on the winter grain mite, *Penthaleus major* (Duge's), Penthaleidae; Acarina Part 1. **Zoological Journal Society of India**, v. 14, p. 45-63, 1962.
- OLIVEIRA, J. A. et al. Mitochondrial gene sequences for identification of animal species. **Revista Colombiana de Ciencia Animal**, v. 5, n. 2, p. 396-407, 2013.

PEREIRA, P. R. V. S. et al. First Record of *Penthaleus major* (Acari: Penthaleidae) in Brazil. **Proceedings of the Entomological Society of Washington**, v. 119, n. 1, p. 157-161, 2017.

RIDSDILL-SMITH, T. J. **Biology and ecology of redlegged earth mite, blue oat mite and lucerne flea**, v. 4, p. 159-161, 1991.

ROBINSON, M. T.; HOFFMANN, A. A. Additional tests on the effects of pesticides on cryptic species of blue oat mite (*Penthaleus* spp.) and the redlegged earth mite (*Halotydeus destructor*). **Australian Journal of Experimental Agriculture**, v. 40, n. 5, p. 671-678, 2000.

ROBINSON, M. T.; WEEKS, A. R.; HOFFMANN, A. A. Geographic patterns of clonal diversity in the earth mite species *Penthaleus major* with particular emphasis on species margins. **Evolution**, v. 56, n. 6, p. 1160-1167, 2002.

SARMENTO, M. B. Cadeia de sementes forrageiras temperadas no Rio Grande do Sul. **Revista Científica Agropampa**, v. 2, n. 2, p.158-168, 2016.

SUGAYAMA, R. L. et al. **Defesa vegetal: fundamentos, ferramentas, políticas e perspectivas**. 1. ed. Belo Horizonte: Sociedade Brasileira de Defesa Agropecuária, p. 27-55, 2015.

UMINA, P. A.; HOFFMANN, A. A. Tolerance of cryptic species of blue oat mites (*Penthaleus* spp.) and the redlegged earth mite (*Halotydeus destructor*) to pesticides. **Australian Journal of Experimental Agriculture**, v. 39, n. 5, p. 621-628, 1999.

UMINA, P. A.; HOFFMANN, A. A. Diapause and implications for control of *Penthaleus* species and *Halotydeus destructor* (Acari: Penthaleidae) in southeastern Australia. **Experimental & applied acarology**, v. 31, p. 209-223, 2003.

UMINA, P. A.; HOFFMANN, A. A.; WEEKS, A. R. Biology, ecology and control of the *Penthaleus* species complex (Acari: Penthaleidae). **Experimental & applied acarology**, v. 34, p. 211-237, 2004.

UMINA, P. A. Pyrethroid resistance discovered in a major agricultural pest in southern Australia: the redlegged earth mite *Halotydeus destructor* (Acari: Penthaleidae). **Pest Management Science: formerly Pesticide Science**, v. 63, n. 12, p. 1185-1190, 2007.

UMINA, P. A. et al. Selective control of mite and collembolan pests of pastures and grain crops in Australia. **Crop Protection**, v. 29, n. 2, p. 190-196, 2010.

WANG, X. et al. Population Genetic Diversity of Two Blue Oat Mite Species on Triticum Hosts in China. **Insects**, v. 14, n. 4, p. 377, 2023.

WEEKS, A. R.; FRIPP, Y. J.; HOFFMANN, A. A. Genetic structure of *Halotydeus destructor* and *Penthaleus major* populations in Victoria (Acari: Penthaleidae). **Experimental & applied acarology**, v. 19, p. 633-646, 1995.

WEEKS, A. R.; HOFFMANN, A. A. The biology of *Penthaleus* species in southeastern Australia. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v. 92, n. 2, p.179-189, 1999.

WEEKS, A. R.; TURELLI, M.; HOFFMANN, A. A. Dispersal patterns of pest earth mites (Acari: Penthaleidae) in pastures and crops. **Journal of economic entomology**, v. 93, n. 5, p. 1415-1423, 2000.

5 CONCLUSÃO

O estudo confirmou a introdução e presença da espécie *Penthaleus major* no Brasil, por meio da identificação molecular. A caracterização molecular complementa a caracterização morfológica de *Penthaleus major*, garantindo maior confiabilidade e precisão na identificação da espécie, além de facilitar estudos posteriores.

REFERÊNCIAS

- AL-SAMARAI, F. R.; AL-KAZAZ, A. A. Applications of molecular markers in animal breeding. **American Journal of Applied Sciences**, v. 1, p. 1-5, 2015.
- ARNEMANN, J. A. et al. Complete mitochondrial genome of the soybean stem fly *Melanagromyza sojae* (Diptera: Agromyzidae). **Mitochondrial DNA Part A**, v. 27, n. 6, p. 4534-4535, 2016.
- AVISE, J. C. et al. **Phylogeography: the history and formation of species**. Cambridge: Harvard university press, 2000.
- BANKS, N. New genera and species of acarions. **The Canadian Entomologist**, v. 34, n. 7, p. 171-176, 1902.
- BASKIN, Y. **A plague of rats and rubbervines – the growing threat of species invasions**. Island Press, 2002.
- BOEHME, P. et al. Molecular identification of carrion-breeding scuttle flies (Diptera: Phoridae) using COI barcodes. **International Journal of Legal Medicine**, v. 124, p. 577-581, 2010.
- BOUBOU, A. et al. Recent emergence and worldwide spread of the red tomato spider mite, *Tetranychus evansi*: genetic variation and multiple cryptic invasions. **Biological Invasions**, v. 13, p. 81-92, 2011.
- CABRERA, N.; GOMEZ, D. R. S.; MICHELI, A. Morphological and molecular characterization of a new species of *Diabrotica* (Coleoptera, Chrysomelidae, Galerucinae). **Zootaxa**, v. 1922, n. 1, p. 33–46-33–46, 2008.
- CBD. **Convention on Biological Diversity**: Text and Annexes Convention on Biological Diversity Interim Secretariat. Geneva Executive Center, C.R 356, Chatelaine, Switzerland, 1992.
- CHADA, H. L. et al. Biology of the winter grain mite and its control in small grains. **Journal of Economic Entomology**, v. 49, n. 4, p. 515-520, 1956.
- DIAS-FILHO, M. B. **Diagnóstico das pastagens no Brasil**. 2014.
- DHOORIA, M. S. Mite pests of field crops. **Fundamentals of Applied Acarology**, p. 275-305, 2016.
- DOKIANAKIS, E.; LADOUKAKIS, E. D. Different degree of paternal mt DNA leakage between male and female progeny in interspecific *Drosophila* crosses. **Ecology and evolution**, v. 4, n. 13, p. 2633-2641, 2014.
- FEIX, R. D. et al. **Painel do agronegócio do Rio Grande do Sul**, 2022. Porto Alegre: SPGG, 2022.

FIDELIS, E. G. et al. **Priorização de pragas quarentenárias ausentes no Brasil**. 2018.

FOCHEZATTO, A.; GHINIS, C. P. Estrutura Produtiva Agropecuária e Desempenho Econômico Regional: o caso do Rio Grande do Sul, 1996-2008. **Revista de Economia e Sociologia Rural**, v. 50, n. 4, p. 743-762, 2012.

GEBIOLA, M.; BERNARDO, U.; BURKS, R. A. A reevaluation of the generic limits of *Phygadeuon Schrank* (Hymenoptera: Eulophidae) based on molecular and morphological evidence. **Zootaxa**, v. 2484, n. 1, p. 35-44, 2010.

GONÇALVES, L. C; BORGES, I.; FERREIRA, P. D. S. **Alimentação de gado de leite**. Belo Horizonte, 2009.

GRASSO, A. I. Sobre dos acaros de interes agricola nuevos para la Argentina, *Penthaleus major* (Dugés) y *Petrobia latens* (Müller). **Sociedad Científica Argentina**, v. 166, p. 41-44, 1958.

GUDLEIFSSON, B. E.; OLAFSSON, S. Grasmaurar. **Freyr**, v. 83, p. 356-358, 1987.

GUDLEIFSSON, B. E. et al. Chemical control of *Penthaleus major* (Acari: Prostigmata) in hayfields in Iceland. **Journal of economic entomology**, v. 95, n. 2, p. 307-312, 2002.

HALLAS, T. E.; GUDLEIFSSON, B. E. Life cycles of *Penthaleus major* (Dugés) (Acari, Prostigmata) in hayfields in northern Iceland. **Icelandic Agricultural Sciences**, v. 16, n. 17, p. 39-44, 2004.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA- IBGE. **Notícias**. 2015. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br/home/geociencias/geografia/default.shtm>>. Acesso em: 15 mar de 2023.

JEPPSON, L. R.; KEIFER, H. H.; BAKER, E. W. **Mites injurious to economic plants**. Univ of California Press, 1975.

JOHANSEN, T. J. et al. Occurrence and damage by *Penthaleus major* (Dugés) (Acari: Pentheleidae) in Norwegian meadows. **Norwegian Journal of Entomology**, v. 49, n. 1, p. 67-70, 2002.

KANG, T. H. et al. DNA barcoding in quarantine inspection: a case study on quarantine insect monitoring for Lepidoptera obtained through quarantine inspection on foreign vessels. **Mitochondrial DNA Part B**, v. 4, n. 1, p. 43-48, 2019.

KIM, S.; LEE, W.; LEE, S. Estimation of a new molecular marker of the genus *Stathmopoda* (Lepidoptera: Stathmopodidae): Comparing EF1a and COI sequences. **Journal of Asia-Pacific Entomology**, v. 20, n. 1, p. 269-280, 2017.

KOBAYASHI, J. et al. Yield reduction of perennial grass caused by an outbreak of the winter grain mite *Penthaleus major* Dugés. **Grassland Science**, v. 36, p. 483-485, 1991.

MACK, R. N. et al. Biotic invasions: causes, epidemiology, global consequences, and control. **Ecological Applications**, v. 10, p. 689-710, 2000.

MADDEN, M. JL et al. Using DNA barcoding to improve invasive pest identification at US ports-of-entry. **PLoS One**, v. 14, e0222291, 2019.

MEIER, C. et al. Produção de matéria seca em diferentes combinações com forrageiras de inverno. **Revista Brasileira de Iniciação Científica**, v. 4, n. 5, p. 144-151, 2017.

MICHEREFF FILHO M.; VILELA, E. F. Traça-do-tomateiro, *Tuta absoluta* (Lepidoptera: Gelechiidae). In: VILELA, E. F.; ZUCCHI, R. A.; CANTOR, F.(ed.) **Histórico e impacto das pragas introduzidas no Brasil**. Ribeirão Preto, p.81-84, 2001.

MOORE, W. S. Inferring phylogenies from mtDNA variation: mitochondrial-gene trees versus nuclear-gene trees. **Evolution**, v. 49, n. 4, p. 718-726, 1995.

NARAYAN D.S. Morphological, biological and ecological studies on the winter grain mite, *Penthaleus major* (Duge's), Penthaleidae; Acarina Part 1. **Zoological Journal of the Linnean Society**. v.14, p. 45–63, India, 1962.

NUNES, M. D.S.; DOLEZAL, M.; SCHLÖTTERER, C. Extensive paternal mt DNA leakage in natural populations of *Drosophila melanogaster*. **Molecular ecology**, v. 22, n. 8, p. 2106-2117, 2013.

OLIVEIRA, J. A. et al. Mitochondrial gene sequences for identification of animal species. **Revista Colombiana de Ciencia Animal**, v. 5, n. 2, p. 396-407, 2013.

PALUMBI, S. R.; CIPRIANO, F.; HARE, M. P. Predicting nuclear gene coalescence from mitochondrial data: the three-times rule. **Evolution**, v. 55, n. 5, p. 859-868, 2001.

PEREIRA, P. R. V. S. et al. First Record of *Penthaleus major* (Acari: Penthaleidae) in Brazil. **Proceedings of the Entomological Society of Washington**, v. 119, n. 1, p. 157-161, 2017.

PINTO, N. G. M.; CORONEL, D. A. Desenvolvimento rural no Rio Grande do Sul: uma análise das mesorregiões entre 2000 e 2010. **Ensaio FEE**, v. 36, n. 4, p. 893-920, 2016.

PIPER, A. M. et al. Prospects and challenges of implementing DNA metabarcoding for high-throughput insect surveillance. **GigaScience**, v. 8, p. 1-22, 2019.

QIN, T. K.; HALLIDAY, R. B. The Australian species of *Chromotydaeus* Berlese and *Penthaleus* CL Koch (Acarina: Penthaleidae). **Journal of natural history**, v. 30, n. 12, p. 1833-1848, 1996.

RAMALHO, F. S.; SANTOS, R. F. Impact of the introduction of the cotton boll weevil in Brazil. **Challenging the future**, p. 466-474, 1994.

REN, X. et al. Study on spring insect communities of *Oxalis rubra* and *Festuca arundinacea* lawn. **Southwest China Journal of Agricultural Sciences**, v. 21, n. 2, p. 494-497, 2008.

RIDSDILL-SMITH, T. J. **Biology and ecology of redlegged earth mite, blue oat mite and lucerne flea**. 1991.

ROBINSON, M. T.; HOFFMANN, A. A. The pest status and distribution of three cryptic blue oat mite species (*Penthaleus* spp.) and redlegged earth mite (*Halotydeus destructor*) in southeastern Australia. **Experimental & Applied Acarology**, v. 25, p. 699-716, 2001.

ROLLINS, L. A. et al. Mitochondrial DNA offers unique insights into invasion history of the common starling. **Molecular Ecology**, v. 20, n. 11, p. 2307-2317, 2011.

SARMENTO, M. B. Cadeia de sementes forrageiras temperadas no Rio Grande do Sul. **Revista Científica Agropampa**, v. 2, n. 2, p.158-168, 2016.

SARTOR, L. R; GOUVEA, A. Manejo Integrado de Pragas de Pastagens. **Sistemas de Produção Agropecuária**. p. 193-209, 2009.

SHORT, J.; SMITH, A. Mammal decline and recovery in Australia. **Journal of Mammalogy**, v. 75, n. 2, p. 288-297, 1994.

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

SOSA-GÓMEZ, D. R. et al. A biotecnologia, o melhoramento e o manejo de pragas da soja. In HOFFMANN-CAMPO, C. B.; CORRÊA-FERREIRA, B. S. C.; MOSCARDI F. (ed). **Soja: Manejo Integrado de Insetos e Artrópodes-praga**. Brasília, DF: EMBRAPA, p. 725-772, 2012.

SUGAYAMA, R. L. et al. **Defesa vegetal: fundamentos, ferramentas, políticas e perspectivas**. 1. ed. Belo Horizonte: Sociedade Brasileira de Defesa Agropecuária, p. 27-55, 2015.

TORRES, F. Z. V. **Pragas das pastagens: características, danos e manejo**. 2022.

UMINA, P. A.; HOFFMANN, A. A. Diapause and implications for control of *Penthaleus* species and *Halotydeus destructor* (Acari: Penthaleidae) in southeastern Australia. **Experimental & applied acarology**, v. 31, p. 209-223, 2003.

UMINA, P. A.; HOFFMANN, A. A.; WEEKS, A. R. Biology, ecology and control of the *Penthaleus* species complex (Acari: Penthaleidae). **Experimental & applied acarology**, v. 34, p. 211-237, 2004.

UMINA, P. A. Pyrethroid resistance discovered in a major agricultural pest in southern Australia: the redlegged earth mite *Halotydeus destructor* (Acari: Penthaleidae). **Pest Management Science: formerly Pesticide Science**, v. 63, n. 12, p. 1185-1190, 2007.

VAZQUEZ, D. P.; ARAGON, R. **Biological invasions in southern South America: A first step towards a synthesis**: Introduction. 2002.

WALLACE, M. M. H.; MAHON, J. A. The distribution of *Halotydeus destructor* and *Penthaleus major* (Acari: Eupodidae) in Australia in relation to climate and land use. **Australian Journal of Zoology**, v. 19, n. 1, p. 65-76, 1971.

WEEKS, A. R.; FRIPP, Y. J.; HOFFMANN, A. A. Genetic structure of *Halotydeus destructor* and *Penthaleus major* populations in Victoria (Acari: Penthaleidae). **Experimental & applied acarology**, v. 19, p. 633-646, 1995.

WEEKS, A. R.; HOFFMANN, A. A. The biology of *Penthaleus* species in southeastern Australia. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v. 92, n. 2, p. 179-189, 1999.

WEEKS, A. R.; TURELLI, M.; HOFFMANN, A. A. Dispersal patterns of pest earth mites (Acari: Penthaleidae) in pastures and crops. **Journal of economic entomology**, v. 93, n. 5, p. 1415-1423, 2000.