

---

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
(ZOOLOGIA)

---

**FORMIGAS (HYMENOPTERA: FORMICIDAE) EM PARREIRAIS  
DO ESTADO DE SÃO PAULO E CARACTERIZAÇÃO  
MOLECULAR DA PÉROLA-DA-TERRA (HEMIPTERA:  
MARGARODIDAE) EM DIFERENTES REGIÕES DO BRASIL**

**CATARINA DE BORTOLI MUNHAE**

Tese apresentada ao Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" - Câmpus de Rio Claro, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Ciências Biológicas (Zoologia).

Julho – 2013

CATARINA DE BORTOLI MUNHAE

**FORMIGAS (HYMENOPTERA: FORMICIDAE) EM PARREIRAIS DO  
ESTADO DE SÃO PAULO E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DA  
PÉROLA-DA-TERRA (HEMIPTERA: MARGARODIDAE) EM  
DIFERENTES REGIÕES DO BRASIL**

Orientador: Odair Correa Bueno

Tese apresentada ao Instituto de Biociências da  
Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita  
Filho” - Câmpus de Rio Claro, como parte dos  
requisitos para obtenção do título de Doutor em  
Ciências Biológicas (Zoologia).

Rio Claro

2013

595.796 Munhae, Catarina de Bortoli  
M966f Formigas (Hymenoptera: Formicidae) em parreirais do Estado de São Paulo e caracterização molecular da pérola-da-terra (Hemiptera: Margarodidae) em diferentes regiões do Brasil / Catarina de Bortoli Munhae. - Rio Claro, 2013  
108 f. : il., figs., gráfs., tabs., fots., mapas

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Rio Claro  
Orientador: Odair Correa Bueno

1. Formiga. 2. Entomologia. 3. Formicídeos. 4. Eurhizococcus brasiliensis. 5. Solenopsis invicta. 6. Vitivinicultura. 7. 28S. I. Título.

Ficha Catalográfica elaborada pela STATI - Biblioteca da UNESP  
Campus de Rio Claro/SP

**CERTIFICADO DE APROVAÇÃO**

**TÍTULO:** Formigas (Hymenoptera: Formicidae) em parreiras do Estado de São Paulo e caracterização molecular da pérola-da-terra (Hemiptera: Margarodidae) em diferentes regiões do Brasil

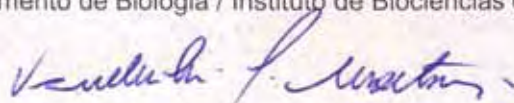
**AUTORA:** CATARINA DE BORTOLI MUNHAE

**ORIENTADOR:** Prof. Dr. ODAIR CORREA BUENO

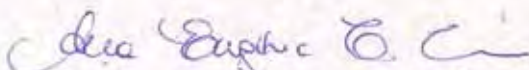
Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de DOUTOR EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS (ZOOLOGIA) , pela Comissão Examinadora:



Prof. Dr. ODAIR CORREA BUENO  
Departamento de Biologia / Instituto de Biociências de Rio Claro



Prof. Dr. VANDERLEI GERALDO MARTINS  
CEIS/Instituto de Biociências/UNESP-Rio Claro



Profa. Dra. ANA EUGENIA DE CARVALHO CAMPOS  
Instituto Biológico/Unidade Laboratorial de Referência em Pragas Urbanas



Prof. Dr. LUIS GARRIGÓS LEITE  
Laboratório de Controle Biológico / Instituto Biológico



Profa. Dra. MARIA SANTINA DE CASTRO MORINI  
Núcleo de Ciências Ambientais - Laboratório de Mirmecologia/Universidade de Mogi das Cruzes

Data da realização: 29 de julho de 2013.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço primeiramente a Deus que sempre guiou e iluminou meus passos.

Aos meus pais, pela força de sempre, por entenderem minha ausência e pelo amor incondicional.

Ao meu namorado Neisvaldo, por todo amor, pelo apoio e incentivo na minha carreira acadêmica e por ter estado ao meu lado em muitos momentos difíceis de elaboração dessa Tese.

Ao meu orientador, por me receber em seu grupo de pesquisa e pelos ensinamentos ao longo desses quatro anos.

Ao seu Vanderlei por toda ajuda nos desafios da biologia molecular, por toda disponibilidade para as viagens e por sempre me tranquilizar dizendo que daria certo.

A Maria Santina, por me incentivar a entrar no Doutorado, pelas discussões científicas desde 2001 e por sempre torcer por mim.

Ao Dr. Marcos Botton, da Embrapa Uva e Vinho, por me receber com tanto entusiasmo para esse ‘mundo’ da pérola-da-terra e pela disponibilidade de sempre.

Ao Dr. José Eudes, da Embrapa Semi-árido, pela acessibilidade e por me mostrar os encantos da viticultura de Petrolina.

Ao Thibaut Malausa, INRA-França, pela ajuda inicial na biologia molecular da pérola-da-terra e pelo acompanhamento nas semanas que passei na Embrapa Uva e Vinho.

Ao Dr. Cristiano, Epagri-SC, por permitir o acesso para nossas coletas em Santa Catarina.

Aos Engenheiros Agrônomos e/ou Agrícolas que me ajudaram na escolha dos parreirais no Estado de São Paulo e me acompanharam durante as primeiras coletas: da Casa de Agricultura de Louveira (ao Luiz Carlos sempre disposto a ajudar) e da Casa de Agricultura de Jarinu, do Sindicato Rural de Indaiatuba, do Instituto Agrônomo de Campinas e à Vinícola Góes de São Roque, especialmente ao Fernando Góes que sempre forneceu todo o aporte e informações necessárias às coletas. Agradeço também a todos os produtores que gentilmente cederam suas propriedades para nosso trabalho.

A toda família CEIS, que eu aprendi a amar: a Marcela e Ita que me receberam com tanto carinho e que deram toda a força que eu precisava no laboratório. Por toda a alegria de viver! Às minhas companheiras Pamela, Sandrinha, Amanda Carlos, pela excelente convivência diária, à Aline que mesmo de longe, sempre me ajudou nos nossos problemas

compartilhados... A Cíntia Martins e Manu pelas discussões moleculares e ajuda em algumas análises. Aos demais amigos e colegas Fabiana, Nathalia Lorenzon, Viviane, Priscila, Andriago, João por tornarem os dias mais leves, inclusive com os encontros frequentes no café.

À Amanda Picelli por contribuir com seu trabalho de Iniciação Científica e me acompanhar nas coletas.

Às secretárias Necis (do Ceis) e Vanessa e Rose (da Pós-Graduação – Zoologia) que sempre me socorreram com os problemas ‘técnicos’.

À Caroline e Ticinha, por tanto carinho e amizade.

Às minhas grandes amigas Débora Clivati e Bianca Berneck, pela amizade e apoio de tantos anos.

À UNESP/RC por permitir a realização do curso e ao CNPq pela concessão da bolsa de doutorado.

Viver em Rio Claro esses anos me trouxe uma imensa felicidade; o céu diariamente azul não me permitia desanimar. E todos vocês contribuíram para que o meu Doutorado me desse além do Título! Muito obrigada!

“Faça o que for necessário para ser feliz. Mas não se esqueça de que a felicidade é um sentimento simples, você pode encontrá-la e deixá-la ir embora por não perceber sua simplicidade.”

Mario Quintana

## RESUMO

Os cultivares de uva no Brasil abrangem as regiões Sul, Sudeste, Centro-Oeste e Nordeste e apresentam poucos organismos que são considerados praga. Entretanto, cochonilhas quando presentes causam prejuízos econômicos, sendo que *Eurhizococcus brasiliensis* (Hemiptera: Margarodidae), a pérola-da-terra, é uma das principais. Devido ao hábito subterrâneo e a forma encapsulada, os danos ocasionados pela cochonilha tem como consequência o abandono ou declínio da cultura, especialmente nos vinhedos da região Sul do País. Algumas espécies de formigas do gênero *Linepithema* e *Pheidole*, podem estar associadas às infestações por pérola-da-terra como constatado no Estado do Rio Grande do Sul, porém não se tem informações a esse respeito no Estado de São Paulo. Da mesma maneira, não há informações em relação aos aspectos moleculares da pérola-da-terra e, assim, o objetivo do estudo foi avaliar a diversidade de formigas subterrânea em cultivares de videira, analisando a sua possível associação com a pérola-da-terra, investigando especificamente: i) a riqueza e a abundância das formigas no subsolo no Estado de São Paulo; ii) os parreirais infestados pela pérola-da-terra e a relação com os táxons de formigas mais frequentes; iii) a caracterização molecular da pérola-da-terra em diferentes regiões do Brasil, a partir de marcadores moleculares RAPD e 28S. Para tal, foram realizadas coletas nos Estados do Rio Grande do Sul, Santa Catarina, São Paulo e Pernambuco. Foram amostradas 20 espécies de formiga e não houve associação significativa entre a pérola-da-terra e a riqueza e/ou composição de espécies. *Solenopsis invicta* (Hymenoptera: Formicidae) foi a espécie mais frequente e abundante em todos os parreirais amostrados. A caracterização molecular da pérola-da-terra resultou na formação de dois clados a partir do gene 28S e em três grupos, a partir de primers para RAPD. De acordo com os resultados obtidos, pode-se inferir a possibilidade da existência de pelo menos dois grupos da pérola-da-terra nas diferentes regiões amostradas. Entretanto, são necessários mais estudos moleculares e taxonômicos para sustentar os dados alcançados.

**Palavras-chave:** Formicídeos. *Eurhizococcus brasiliensis*. *Solenopsis invicta*. Vitivinicultura. 28S. RAPD.



## ABSTRACT

The vineyards in Brazil occur in the South, Southeast, Central-West, and Northeast regions and have few organisms that are considered pests. However, mealybugs can cause economic losses, and *Eurhizococcus brasiliensis* (Hemiptera: Margarodidae), the ground pearl, is one of the main viticulture pests. Due to the ground pearl has an underground habitat and encapsulated form, the damage caused by the mealybug causes the abandonment or decline of culture, especially in the vineyards of the South region. Some species of ants (*Pheidole* spp. and *Linepithema* spp.) may be associated with infestations of ground pearl, as found in the state of Rio Grande do Sul, but there is no information in the state of São Paulo. There is no information about the molecular biology of ground pearl, and thus the aim of the study was to evaluate the diversity of subterranean ants in the vineyards to investigate their possible association with the ground pearl, specifically investigating: i) the richness and abundance of subterranean ants in the State of São Paulo, ii) the vineyards infested by ground pearl and related taxa of ants frequently, iii) the molecular characterization of ground pearl in different regions of Brazil, from RAPD and 28S molecular markers. For this, samples were collected in the States of Rio Grande do Sul, Santa Catarina, São Paulo and Pernambuco. We sampled 20 species of ants and there was no significant association between the ground pearl and the richness and/or species composition. *Solenopsis invicta* (Hymenoptera: Formicidae) was the most common species in all the vineyards. The molecular characterization of ground pearl resulted in two clades from the gene 28S and three groups, based on RAPD primers. According to the results we can infer the possibility of at least two groups of ground pearl in different regions sampled. However, further studies are needed to support taxonomic and molecular data obtained.

**Keywords:** Formicídeos. *Eurhizococcus brasiliensis*. *Solenopsis invicta*. Vineyards. 28S. RAPD.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

|   |    |
|---|----|
| CAPÍTULO 1.....   | 29 |
| Figura 1 - Localização dos municípios de coleta no Estado de São Paulo e a indicação da quantidade de parreirais infestados (I) ou não (NI). As letras a, b, c, d, e indicam a distância em km dos municípios amostrados (a: 37,5; b: 33,0; c: 110,0; d: 117,0; e: 143,0).....  | 35 |
| Figura 2 - Distintas fases da pérola-da-terra em Louveira (São Paulo). Em (A) pode-se observar um espécime de formiga, próximo a um cisto amarelo da cochonilha; em (B) as ninfas de primeiro ínstar fixas na raiz de videira, além de cisto branco e cisto branco com ovos.....  | 35 |
| Figura 3 - Representação da distribuição das armadilhas subterrâneas nos parreirais (A); pote utilizado como armadilha (B); posicionamento da armadilha no campo (C). Legenda: (○) área central do cultivo; (○) videira sem armadilha; (●) videira com armadilha.....   | 36 |
| Figura 4 - Espécies mais frequentes (A) e abundantes (B) nos parreirais infestados e não infestados do Estado de São Paulo.....   | 42 |
| Figura 5 - Espécies mais frequentes (A) e abundantes (B) nos parreirais do Estado de São Paulo de acordo com as estações seca e chuvosa.....  | 43 |
| Figura 6 - Espécies mais frequentes (A) e abundantes (B) nos parreirais do Estado de São Paulo de acordo com as iscas de mel e sardinha.....  | 43 |
| Figura 7 - Estrutura da comunidade de formigas nos parreirais do Estado de São Paulo, a partir da correlação de Spearman.....   | 44 |
| Figura 8 - Escalonamento Multidimensional Não Métrico (NMDS) para as propriedades com ou sem pérola-da-terra nos cinco municípios amostrados. Stress = 21,16. Anosim = R = 0,06; p = 0,14.....  | 45 |
| Figura 9 - Escalonamento Multidimensional Não Métrico (NMDS) para as propriedades dos cinco municípios amostrados (Ind – Indaiatuba; Louv – Louveira; SR – São Roque; SMA – São Miguel Arcanjo; Jar – Jarinu). Stress = 17,97. Anosim = R = 0,07; p = 0,11.....   | 45 |
| CAPÍTULO 2.....   | 69 |
| Figura 1 - Localidades amostradas em cada Estado do Brasil: Rio Grande do Sul, Santa Catarina, São Paulo e Pernambuco. A proximidade das localidades em Santa Catarina deixam visível apenas um ponto no mapa (sendo dois pontos amostrados).....   | 74 |
| Figura 2 - Árvore de Máxima Parcimônia (MP) reconstruída a partir do gene 28S de representantes de pérola-da-terra provenientes das regiões Sul, Sudeste e Nordeste do Brasil. Valores de “bootstrap” estão ilustrados acima dos ramos. A árvore foi enraizada com representante de <i>Marchalina hellenica</i> (gi 158829424).....   | 88 |
| Figura 3 - Rede de haplótipos gerada para os haplótipos de pérola-da-terra a partir do gene 28S das localidades estudadas: H_1 corresponde a Petrolina; H_2 corresponde a Flores da Cunha, Pinto Bandeira, Louveira e Videira; H_3 à Pinheiro Preto; H_4 à Indaiatuba e São Miguel Arcanjo e H_5 corresponde a São Roque; mv1, mv2 e mv3 indicam possíveis ancestrais; as linhas que ligam os haplótipos representam nucleotídeos divergentes entre eles..... | 89 |
| Figura 4 - Análise do sinal filogenético, demonstrando a frequência das transições (s) e transversões (v) em função da divergência nucleotídica do gene 28S.....  | 90 |

|   |    |
|---|----|
| Figura 5 - Fragmentos amplificados a partir dos primers OPV 10 e OPV 19. Os <i>ladders</i> estão indicados pela seta com seus respectivos tamanhos; o controle negativo (CN) também está demonstrado.....                 | 91 |
| Figura 6 - Dendrograma obtido pelo método UPGMA de distância Euclidiana para os municípios representantes de pérola-da-terra provenientes das regiões Sul, Sudeste e Nordeste do Brasil, a partir de primers de RAPD..... | 92 |
| Figura 7 - Distância genética e distância geográfica (km) dos espécimes de pérola-da-terra, amostrados nas regiões Sul, Sudeste e Nordeste do Brasil.....   | 93 |
| Figura 8 - Esquema representativo da hipótese (i): ação do efeito fundador.....   | 97 |
| Figura 9 - Esquema representativo da hipótese (ii): interdependência de espécies regionais. Letras de A a L indicam possíveis plantas que já hospedavam a pérola-da-terra anteriormente à introdução da videira.....      | 99 |

## LISTA DE TABELAS

|   |    |
|---|----|
| CAPÍTULO 1.....   | 29 |
| Tabela 1 - Frequência relativa de ocorrência (%) e abundância das espécies registradas em parreirais infestados ou não por <i>Eurhizococcus brasiliensis</i> no Estado de São Paulo, de acordo com as estações do ano e o tipo de isca.....                               | 46 |
| Tabela 2 - Riqueza e (abundância total) e teste de Mann-Whitney por parreiral infestado ou não de acordo com a estação do ano e o tipo de isca.....   | 48 |
| Tabela 3 - Mediana e amplitude para riqueza e abundância das espécies nos parreirais infestados e não infestados com a pérola-da-terra de acordo com as estações e tipo de iscas analisadas.....  | 46 |
| Tabela 4 - Espécies amostradas nos parreirais infestados e não infestados em cada município amostrado no Estado de São Paulo: Indaiatuba, Louveira, São Roque, São Miguel Arcanjo e Jarinu.....   | 49 |
| Tabela 5 - Análise faunística das espécies amostradas em parreirais infestados e não infestados no Estado de São Paulo.....   | 51 |
| CAPÍTULO 2.....   | 69 |
| Tabela 1 - Coordenadas geográficas dos municípios amostrados no presente estudo.....  | 75 |
| Tabela 2 - Relação de primers (5'- 3') utilizados para amplificação de fragmentos dos genes COI, 28S e ITS das amostras de pérola-da-terra. As combinações testadas e as referências dos primers também estão demonstradas. Primers sem referências foram desenhados..... | 78 |
| Tabela 3 - Parâmetros utilizados nas reações de polimerização em cadeia para a pérola-da-terra.....   | 79 |
| Tabela 4 - Código, sequência e temperatura de anelamento de cada um dos primers testados. Em negrito, destacam-se os primers que apresentaram amplificação para todas as localidades estudadas e foram utilizados para análises.....                                      | 81 |
| Tabela 5 - Resultados das amplificações de pérola-da-terra com a utilização de todas as combinações de primers. O tamanho aproximado do fragmento amplificado, a procedência das amostras e o grupo mais próximo identificado no “GenBank” estão demonstrados.....        | 85 |
| Tabela 6 - Distâncias genéticas (superior direito) dos espécimes de pérola-da-terra, a partir da análise de RAPD e distâncias geográficas – km (inferior esquerdo) entre as localidades amostradas.....   | 93 |

## SUMÁRIO

|  |    |
|--|----|
| 1 INTRODUÇÃO.....  | 12 |
| 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....  | 14 |
| 2.1 Aspectos Gerais do Cultivo de Uva no Brasil .....                      | 14 |
| 2.2 Aspectos Biológicos da Pérola-da-Terra .....                           | 15 |
| 2.3. Formigas e Associação com a Pérola-da-Terra .....                     | 19 |
| REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....   | 22 |
| CAPÍTULO 1 .....   | 29 |
| RESUMO .....   | 30 |
| ABSTRACT .....   | 31 |
| 1 INTRODUÇÃO.....  | 32 |
| 2 MATERIAIS E MÉTODOS.....   | 34 |
| 2.1 Áreas de coleta.....   | 34 |
| 2.2 Coleta e identificação das formigas.....                               | 35 |
| 2.3 Análise dos dados .....  | 38 |
| 2.3.1. Riqueza de espécies.....  | 38 |
| 2.3.2. Abundância de espécies .....  | 39 |
| 3 RESULTADOS .....   | 42 |
| 4 DISCUSSÃO E CONCLUSÕES .....   | 54 |
| REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....   | 59 |
| CAPÍTULO 2 .....   | 69 |
| RESUMO .....   | 70 |
| ABSTRACT .....   | 71 |
| 1 INTRODUÇÃO.....  | 72 |
| 2 MATERIAIS E MÉTODOS.....   | 74 |
| 2.1 Coleta de pérola-da-terra .....  | 74 |
| 2.2 Extração de DNA.....   | 75 |
| 2.2.1. Sem utilização de Kit comercial.....                                | 75 |
| 2.2.2. Com utilização de Kit comercial .....                               | 76 |
| 2.3 Reação de Polimerização em Cadeia.....                                 | 76 |
| 2.3.1 Utilização de primers para amplificação de genes COI, 28S, ITS ..... | 76 |
| 2.4 Reações de purificação e sequenciamento de DNA .....                   | 80 |
| 2.5 Análise dos dados .....  | 80 |
| 2.6 Utilização de primers para RAPD .....                                  | 80 |
| 2.7 Análise dos dados .....  | 83 |

|   |     |
|---|-----|
| 3 RESULTADOS .....  | 84  |
| 4 DISCUSSÃO E CONCLUSÕES .....  | 94  |
| REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....  | 101 |
| APÊNDICE A - Sequências de nucleotídeos de um fragmento amplificado com as<br>combinações de primers F2R2 para as localidades de Flores da Cunha (FC), Louveira (LOU)<br>e Indaituba (IND). Em negrito destacam-se as principais regiões semelhantes entre FC e LOU<br>e divergentes de IND. .... | 106 |
| CONSIDERAÇÕES FINAIS .....  | 108 |

## 1 INTRODUÇÃO

A viticultura no Brasil ocupa uma área de aproximadamente 90 mil hectares, abrangendo as regiões Sul, Sudeste, Centro-Oeste e Nordeste (IAC, 2008; IBRAVIN, 2008a; PROTAS; CAMARGO, 2011). O Rio Grande do Sul possui a maior área cultivada do país (IBGE, 2007), sendo responsável por mais de 90% da produção nacional de vinhos e derivados (MANDELLI, 2002). Já o Estado de São Paulo destaca-se como o maior produtor nacional de uva de mesa (TECCHIO et al., 2007) e a região do Vale do Rio São Francisco pela produção de uvas finas de mesa (LEÃO; PEREIRA, 2001), com cerca de 10,500 mil hectares de vinhedos, distribuídos nos Estados de Pernambuco e Bahia (IBRAVIN, 2008b).

De um modo geral, os cultivares de uva possuem poucos organismos que são considerados praga; contudo, cochonilhas quando presentes causam prejuízos econômicos (HICKEL; SCHUCK, 1996), sendo que nas raízes das plantas, tem-se principalmente *Eurhizococcus brasiliensis* Hempel 1922 (Hemiptera: Margarodidae).

Os danos causados por *E. brasiliensis*, cuja denominação popular pérola-da-terra está relacionada ao hábito subterrâneo e a forma encapsulada (conhecido como cisto), tem como consequência o abandono ou declínio da cultura, especialmente nos vinhedos da região Sul do País (HICKEL, 2008). Essa espécie também já foi constatada nos Estados de Santa Catarina (MATOS; SCHUCK, 1988; MILANEZ, 2001), Paraná (FIGUEIRA JÚNIOR, 1970; GALLOTTI, 1976; MORALES, 2001), São Paulo (LOURENÇÃO et al., 1989) e Pernambuco (HAJI et al., 2002). Apesar de várias espécies frutíferas serem suscetíveis a ela, somente os cultivos de videira são afetados economicamente (HICKEL; SCHUCK, 1996), existindo relatos, porém, de outras espécies que também são prejudicadas como o pessegueiro, macieira etc (M. BOTTON, comunicação pessoal).

Algumas espécies de formigas do gênero *Linepithema* e *Pheidole*, podem estar associadas, de maneira mutualística, às infestações por pérola-da-terra (HICKEL; SCHUCK, 1996; SACCHETT, 2006), como constatado no Estado do Rio Grande do Sul (NONDILLO et al., 2010a, b). O fato das formigas se associarem a pérola-da-terra em busca do honeydew, quando estão presentes em cultivos de uva podem promover o aumento da população de cochonilhas através da diminuição da mortalidade, conferida pelo sistema de proteção dos predadores naturais (HAJI et al., 2004; DIEHL-FLEIG; DIEHL, 2007). Apesar da importância da associação do hemíptero com as formigas, pouco se sabe a respeito das características bioecológicas da pérola-da-terra e nada se conhece em relação aos aspectos moleculares da cochonilha.

Em função da infestação por *E. brasiliensis* nos parreirais do Estado do Rio Grande do Sul poder estar associada à presença de espécies de formigas (SORIA et al., 1997; SACCHETT et al. 2009; NONDILLO et al., 2010a) e em virtude da escassez de informações sobre as espécies de formigas que infestam os cultivares de uvas do Estado de São Paulo, assim como sobre os aspectos moleculares da pérola-da-terra é importante a elaboração de trabalhos que visem a aquisição de conhecimentos biológicos básicos nesta área.

Desta maneira, o presente estudo teve como objetivos avaliar a diversidade de formigas subterrânea em cultivares de videira, analisando a sua possível associação com a pérola-da-terra, investigando especificamente: i) a riqueza e a abundância das formigas no subsolo em parreirais do Estado de São Paulo; ii) os parreirais infestados pela pérola-da-terra e a relação com os táxons de formigas mais frequentes; iii) a caracterização molecular da pérola-da-terra em diferentes regiões do Brasil, a partir de marcadores moleculares RAPD e 28S.



## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Aspectos Gerais do Cultivo de Uva no Brasil

A uva é uma das frutas mais antigas utilizadas na alimentação humana e, por esse motivo, seu cultivo acompanhou a migração dos primeiros agricultores, com domesticação e adaptação de espécies e de muitos cultivares (SOUSA; MARTINS, 2002; GIOVANNINI, 2008). É uma planta que pertence ao gênero *Vitis* L. e contempla aproximadamente 60 espécies (MULLINS et al., 1992). No Brasil, videiras de *Vitis vinifera* trazidas de Portugal e Espanha, foram introduzidas pelos colonizadores portugueses no ano de 1532 na Capitania de São Vicente, atual Estado de São Paulo. Contudo, a viticultura começou a ganhar força apenas a partir de 1960, especialmente na região Sul do País (IAC, 2008; IBRAVIN, 2008b).

Atualmente, a viticultura no Brasil ocupa uma área de aproximadamente 90 mil hectares, abrangendo as regiões Sul, Sudeste, Centro-Oeste e Nordeste (IAC, 2008; IBRAVIN, 2008a; PROTAS; CAMARGO, 2011). Em 2011, a exportação de uva de mesa pelo Brasil representou 59,391 mil toneladas, o que o coloca em 19º lugar em área cultivada com uvas e o 14º em produção a nível mundial (MELLO, 2012).

Os três Estados da região Sul (Rio Grande do Sul, Santa Catarina e Paraná) são produtores de uva, vinho e derivados, sendo que o Rio Grande do Sul possui a maior área cultivada do País (IBGE, 2007), responsável por mais de 90% da produção nacional de vinhos e derivados (MANDELLI, 2002).

Na região Sudeste, os Estados de São Paulo, Minas Gerais e Espírito Santo são os produtores vitícolas, sendo que São Paulo destaca-se como o maior produtor nacional de uva de mesa rústica (TECCHIO et al., 2007; PROTAS; CAMARGO, 2011).

No Centro-Oeste, destacam-se os Estados de Goiás e Mato Grosso e na região Nordeste do País, o submédio do Vale São Francisco, com os Estados da Bahia e Pernambuco, destacando a produção de uvas finas de mesa (LEÃO; PEREIRA, 2001; PROTAS; CAMARGO, 2011).

Em referência ao Estado de São Paulo, a vitivinicultura originou-se na região leste do Estado, em cidades como São Roque, Jundiaí, Louveira, São Miguel Arcanjo dentre outras, com a produção de vinhos, uvas finas de mesa e, principalmente, uvas de mesa (rústica) da variedade Niágara Rosada. A região noroeste do Estado, tendo Jales como polo referencial, apresenta produção principal de uva fina de mesa, sendo que nos últimos anos, tem-se observado uma mudança importante na matriz produtiva com expansão das áreas plantadas

com uva rústica (PROTAS; CAMARGO, 2011). Assim, Niágara Rosada é a variedade dominante no Estado.

Em função do elevado destaque econômico e social que o cultivo de uva apresenta, a incidência de pragas e doenças são aspectos importantes para o manejo da cultura. No que diz respeito a doenças, as causadas por fungos são responsáveis por até 30% do custo de produção em regiões em que o clima torna seu desenvolvimento favorável (SONEGO; GARRIDO, 2007).

Apesar dos insetos-praga serem de importância secundária na cultura (BOTTON et al., 2009), as cochonilhas podem causar prejuízos econômicos (HICKEL; SCHUCK, 1996). Na parte aérea da videira, espécies de cochonilhas-farinhas (Pseudococcidae) causam prejuízo em uvas destinadas ao consumo de mesa, danificando as bagas e levando ao aparecimento da fumagina, que inviabiliza a fruta para o comércio (MORANDI FILHO, 2008); o que é considerado um fator limitante para o plantio (TEIXEIRA et al., 2002; FOLDI, 2005). Entretanto, no Brasil, a cochonilha de raiz (pérola-da-terra) é a praga que se destaca como mais importante na cultura da videira (BOTTON et al., 2009).

## 2.2 Aspectos Biológicos da Pérola-da-Terra

A pérola-da-terra, *Eurhizococcus brasiliensis* Wille 1922 (Hemiptera: Margarodidae) é uma cochonilha de raiz que ataca uma grande variedade de plantas como, por exemplo, a língua de vaca, batata-doce, sálvia, mandioca dentre outras. Foi encontrada pela primeira vez em 1921 no município de Santa Maria, no Rio Grande do Sul. O gênero *Eurhizococcus* é nativo da América do Sul, com três espécies descritas: *Eurhizococcus brasiliensis* (Wille, 1922); *Eurhizococcus brevicornis* (Silvestri, 1901); *Eurhizococcus colombianus* (Jakubski, 1965) (FOLDI, 2005). Das espécies deste gênero, apenas *E. brasiliensis* foi identificada no Brasil se alimentando da seiva de videiras.

Inicialmente, a espécie foi identificada como *Margarodes brasiliensis* por Wille (1922) e posteriormente transferida para o gênero *Eurhizococcus* por Silvestri (1936). Em 1987 foi descrita uma nova espécie de pérola-da-terra denominada *Margarodes soriae*, coletados em Veranópolis, Rio Grande do Sul, mas pouco depois, Foldi (1987) constatou que a suposta espécie nova era pré-pupa dos machos de *E. brasiliensis*, sendo este então, considerado o primeiro registro do macho da espécie (BOTTON et al., 2008).

*E. brasiliensis* tem distribuição Neotropical, encontrando-se em várias regiões do Brasil. No Estado do Rio Grande do Sul, tais cochonilhas já foram encontradas em praticamente

todas as regiões vitícolas (com exceção da Serra do Sudeste e Campanha Gaúcha). Existem também registros para os Estados de Santa Catarina, na região do Vale do Rio do Peixe (MATOS; SCHUCK, 1988; MILANEZ, 2001); Paraná, nos municípios de Rio Negro (FIGUEIRA JÚNIOR, 1970) e Curitiba (GALLOTTI, 1976; MORALES, 2001). Foi também constatada no Estado de São Paulo, nos municípios de Santa Rita do Passa Quatro e Guareí (NOVO, 1978) em cana-de-açúcar e em videiras no município de Louveira (LOURENÇÃO et al., 1989). Mais recentemente, também foi diagnosticada na Região do Vale do São Francisco, nos Estados de Pernambuco e Bahia (HAJI; ALENCAR, 2000; HAJI et al., 2002; HAJI et al., 2004).

A denominação pérola-da-terra deriva da aparência amarelo brilhante, semelhante a pérolas verdadeiras. Este termo é referido para um grupo de cochonilhas de dez gêneros e aproximadamente 105 espécies. Estas cochonilhas causam sérios danos às plantas, pois se alimentam de sua seiva reduzindo seu vigor e podendo levá-las a morte (FOLDI, 2005).

*E. brasiliensis* possui hábito subterrâneo e ataca as raízes de videiras, penetrando seus estiletes no sistema radicular da planta, sendo prejudicial no primeiro, segundo e terceiro ínstar larvais, já que os adultos são desprovidos de aparelho bucal e não ocasionam danos às plantas (SORIA; GALLOTTI, 1986). Sua reprodução ocorre principalmente através de partenogênese telítoca, apresentando no Rio Grande do Sul, um ciclo por ano, apesar de ocorrer sobreposição de gerações no campo (DAL BÓ et al., 2007); no Estado do Rio Grande do Sul, a flutuação populacional da pérola-da-terra ocorre da seguinte forma: a fase de ninfa ocorre entre os meses de novembro e março, de cisto de março a outubro e de cisto com ovos, outubro a janeiro. Já no Estado de São Paulo, a predominância da fase de ninfa móvel ocorre entre os meses de outubro a março, de cisto de julho a agosto e de cisto com ovos, de outubro a dezembro, sendo que as fêmeas predominam de agosto a novembro (SCHMIDT et al., 2013).

A reprodução assexuada ocorre da seguinte maneira: a fase de cisto (que apresenta cor branco-acinzentada) quando repleto de ovos, torna-se frágil e quebradiço e rompe-se para liberá-los. A partir dos ovos, as ninfas de primeiro ínstar eclodem e deslocam-se ativamente até encontrar uma raiz para se fixar e iniciar sua alimentação (GALLOTTI, 1976; FOLDI, 1990; HICKEL, 1998; BOTTON et al., 2000; SORIA; DAL CONTE, 2000).

A partir do segundo ínstar, quando as ninfas estão fixadas nas raízes, elas perdem os apêndices (pernas e antenas) e encerram-se no interior de sua cutícula, que torna-se uma cápsula protetora e assume o formato esférico. Após essa fase, a ninfa de terceiro ínstar atinge seu máximo crescimento, de formato globoso e com coloração amarela, sendo por isso

denominada pérola-da-terra. Assim, o completo desenvolvimento da ninfa geralmente culmina na partenogênese telítoca, sendo que as fêmeas permanecem no interior dos cistos até a realização da postura e, depois, morrem. Pode ocorrer também o rompimento do cisto para a saída de uma fêmea móvel, geralmente de corpo piloso, desprovida de aparelho bucal, apresentando o primeiro par de pernas do tipo fossorial (adaptado para escavar) e de coloração amarela (HICKEL, 1998; SORIA; DAL CONTE, 2000; BOTTON et al., 2009).

Nesta fase, a fêmea pode subir até a superfície do solo para um possível acasalamento com o macho, o que caracterizaria a reprodução sexuada da espécie, retornando em seguida para o interior do solo, para realizar a postura dos ovos. A reprodução sexuada é pouco comum na espécie, porém os insetos podem apresentar uma fase de pré-pupa, pupa e originar machos alados que vivem poucos dias com a função de copular com a fêmea móvel (HICKEL, 1998; SORIA; DAL CONTE, 2000). Neste caso, existem poucas informações sobre o que ocorre com as fêmeas após a fecundação, bem como o que leva ao aparecimento do macho na espécie (FOLDI, 1990).

Uma das características da pérola-da-terra que agrava o problema às plantas é a ausência de diapausa nas fases de desenvolvimento do inseto, ou seja, mesmo nos meses mais frios com as plantas de videira em repouso vegetativo, as ninfas continuam se nutrindo das raízes, tornando a planta mais suscetível à infecção por fungos de solo (HICKEL; SCHUCK, 1996; HICKEL, 1998).

Os danos decorrentes do ataque da cochonilha relacionam-se com o definhamento do parreiral de maneira progressiva devido à sucção da seiva, o que leva a redução da produção e a morte das plantas (TEIXEIRA et al., 2002; BOTTON et al., 2005). Em parreirais adultos, as folhas ficam amareladas entre as nervuras; as bordas das folhas encarquilham para dentro, ocorrendo em alguns casos, queimaduras. Assim, plantas com estes sintomas, geralmente têm baixo vigor, entrenós curtos, entram em declínio e morrem. Um estudo recente mostrou que esses sintomas da planta de videira que sempre foram atribuídos à pérola-da-terra, podem também ser sintomas de doenças na planta ocasionados por vírus ou fungos (ZART, 2012).

Em função dos danos ocasionados pela pérola-da-terra nos parreirais, torna-se indispensável o seu controle, que é bastante complexo, devido ao formato globoso do corpo das ninfas e do revestimento por uma carapaça espessa, que confere alta resistência às adversidades climáticas, ao hábito subterrâneo do inseto e, principalmente, a falta de informações sobre a bioecologia da espécie. Diante disso, os métodos convencionais de controle da praga são, praticamente, inócuos (HICKEL et al., 2001; HICKEL, 2008).

Vários métodos de controle já foram utilizados para a pérola-da-terra como: a resistência de plantas, buscando-se porta-enxertos mais resistentes à praga; o controle biológico com fungos e nematóides entomopatogênicos, os quais apresentaram resultados apenas para o controle da fêmea móvel (HICKEL; SCHMITT, 1997; SCHMIDT et al., 2009); a utilização da mosca *Proleptis lucifer* Wiedemann, 1828 (Diptera: Asyilidae) que é o principal predador da cochonilha, sendo que a larva de primeiro ínstar penetra nos cistos, alimentando-se da fêmea e dos ovos, porém esta ação não atinge o controle em nível econômico (SORIA; MELLO, 1998). Uma alternativa de controle que pode auxiliar na redução da população da cochonilha abaixo do nível de dano econômico é a utilização de cobertura vegetal nos vinhedos com plantas não hospedeiras da pérola-da-terra (FADINI et al., 2001; BOTTON et al., 2010).

Existe também o controle químico realizado através de inseticidas sistêmicos, porém possui custo financeiro elevado e, assim, é feito na maior parte das vezes, de forma localizada, concentrando a aplicação apenas nos focos de plantas com sintomas. Uma vez que a praga encontra-se distribuída por toda a área, as porções do parreiral que não recebem o inseticida permanecem infestadas. Outro fato complicador é a redução da eficiência dos inseticidas conforme aumenta a idade da planta, pela dificuldade em se atingir toda a zona de raízes no solo (HICKEL; SCHUCK, 1996). Deste modo, alternativas menos onerosas que impeçam o avanço da cochonilha no cultivo e que possam ser aplicadas por toda a área dos vinhedos, ainda são necessárias (HICKEL et al., 2008).

Diante do dano ocasionado aos plantios, a dispersão da pérola-da-terra pode tornar a situação ainda mais agravante. Esta dispersão pode ser realizada por formigas, uma vez que estes insetos se associam com a cochonilha e transportam as ninfas de primeiro ínstar para novos pontos do hospedeiro ou para outras plantas.

Em função de seu hábito subterrâneo e seu ciclo de vida longo, a biologia da pérola-da-terra apresenta muita dificuldade em ser estudada. Conforme já citado e descrito na bibliografia, há apenas uma espécie de pérola-da-terra registrada em videiras no Brasil, *E. brasiliensis*, porém nenhum estudo (taxonômico ou molecular) foi realizado, com o intuito de amostrar as pérolas-da-terra que ocorrem em videiras nas diversas regiões do País. Observações pessoais a campo permitiram constatar que em algumas regiões, o controle químico é satisfatório enquanto em outras é ineficiente; em algumas localidades, o prejuízo no parreiral atribuído à cochonilha é grande, enquanto que em outras áreas, existe o convívio normal com o inseto. Além dessas características distintas relacionadas ao controle, foram observadas também características comportamentais diferentes em regiões diversas. No semi-

árido brasileiro (em Petrolina) é comum as fêmeas ambulatórias caminharem sob o solo, enquanto que em outras regiões (como no Rio Grande do Sul) este fato não é comum. Essas características podem estar relacionadas a diferenças abióticas, como clima, condições de solo entre outras, mas também podem indicar espécies, ou grupos de espécies, distintos. Em virtude dessas constatações é que se justifica o objetivo (iii) do presente estudo, a fim de verificar se existem grupos distintos da pérola-da-terra em algumas regiões do Brasil, a partir da ferramenta de biologia molecular.

### **2.3. Formigas e Associação com a Pérola-da-Terra**

As formigas pertencem a uma única família Formicidae (Insecta: Hymenoptera), que compreende 21 subfamílias (HÖLLDOBLER; WILSON, 1990; BOLTON, 2003); são consideradas um grupo de artrópodes abundantes, diversos e ecologicamente importantes na maioria dos ecossistemas terrestres (FOLGARAIT, 1998). As formigas possuem os mais variados hábitos alimentares podendo ser generalistas, predadoras, cultivadoras de fungos; apresentam também interações com plantas, variando desde mutualismo até herbivoria, além de poderem ser atraídas pelos nectários extraflorais (HÖLLDOBLER; WILSON, 1990).

Existe também a relação mutualística entre formigas e hemípteros conhecida como trofobiose, na qual as formigas se associam principalmente a cochonilhas, em busca do honeydew, um líquido rico em açúcar derivado da seiva da planta e parcialmente digerido (DELABIE, 2001), que serve para algumas espécies de formigas como fonte de energia.

Em relação à pérola-da-terra, as formigas transportam suas ninfas recém-eclodidas no interior do parreiral, protegendo a cochonilha do ataque de inimigos naturais e, ao cavarem galerias, facilitam a sobrevivência do inseto nas raízes das plantas (BOTTON et al., 2005). Quando as formigas estão ausentes, os cistos podem ficar incrustados formando pelotas, o que resulta no desenvolvimento de fungos no líquido açucarado liberado pelas cochonilhas (HICKEL; SCHUCK, 1996). Dessa maneira, as formigas podem promover o aumento da população de cochonilhas através da diminuição da mortalidade, conferida pelo sistema de proteção dos predadores naturais, como também contribuir na redução dos hemípteros parasitados por fungos, pela constante 'limpeza' do excremento açucarado (HAJI et al., 2004; DIEHL-FLEIG; DIEHL, 2007). Sendo assim, certas espécies de formigas, apesar de não ocasionarem dano direto às plantas, podem ser consideradas como pragas agrícolas por aumentar a infestação e, conseqüentemente, os prejuízos decorrentes da presença do inseto sugador (E.R.HICKEL, comunicação pessoal).

Em virtude dessa relação, alguns táxons de formigas, principalmente *Linepithema* e *Pheidole* podem estar associados, de maneira mutualística, às infestações por pérola-da-terra (HICKEL; SCHUCK, 1996; SACCHETT, 2009). No Brasil, tal associação foi relatada pela primeira vez por Gallotti (1976) com *L. humile* Mayr e *Nylanderia fulva* (Mayr, 1862) transportando ninfas de primeiro ínstar da pérola-da-terra. Posteriormente, Soria e Gallotti (1986), Hickel (1994) e Soria et al. (1997) também relataram que *L. humile* era predominante em áreas com a cochonilha na região Sul do Brasil. Além de *L. humile*, Soria et al. (1997) relataram as seguintes espécies de formigas associadas à pérola-da-terra: *Dorymyrmex* sp., *Brachymyrmex* sp., *Camponotus blandus* (Smith), *C. crassus* (Mayr), *C. melanoticus* (Emery), *C. renggeri* (Emery), *C. rufipes* (Fabricius), *Camponotus* sp., *Nylanderia fulva*, *Crematogaster* sp., *Pheidole aberrans* (Mayr, 1868), *P. megacephala* (Fabricius), *P. triconstricta* (Forel), *Solenopsis saevissima* (Smith F., 1855); *Wasmannia autopunctata* (Roger), *Prionopelta* sp., *Pseudomyrmex* sp. Táxons estes que pertencem à Myrmicinae, Dolichoderinae, Formicinae e Pseudomyrmecinae; sendo que as duas primeiras subfamílias são amplamente observadas em associação com hemípteros (DELABIE, 2001).

Em relação às espécies de *Linepithema* há uma tendência em se diagnosticar todos os espécimes como *L. humile*, devido à grande similaridade entre as operárias (SORIA et al., 1997; SILVA; LOECK, 1999; SACHETT, 2006; WILD, 2007). De acordo com Suarez et al. (2001) existem populações de *Linepithema* que não são *L. humile* e que são mencionadas como tal em vários estudos. No Sul do País foram catalogadas três espécies: *L. humile*, *L. micans* (Forel) e *L. gallardoi* (Brethes, 1914); entretanto, Wild (2007) reconhece 19 espécies pertencentes ao gênero, incluindo 10 novas. Dessa forma, ao contrário do que se pensava, *L. micans* e não *L. humile* é que dispersa ninfas recém-eclodidas da cochonilha no Estado do Rio Grande do Sul (MARTINS; BUENO, 2009; SACHETT et al., 2009; NONDILLO et al., 2010a, 2010b), sendo que dois haplótipos estão fortemente associados à pérola-da-terra (MARTINS et al., 2012). No que diz respeito à região Sudeste, ainda não se tem um diagnóstico para os cultivares de uva.

Já nos vinhedos da Califórnia e da África do Sul, a formiga-argentina, *Linepithema humile*, tem sido considerada uma das principais pragas (ADDISON; SAMMAYS, 2000; DAANE, 2000; DAANE et al., 2007; MGOCKEKI; ADDISON, 2010). Entretanto, normalmente não está associada à família Margarodidae e sim a família Pseudococcidae, cuja infestação diminuiu quando as formigas foram excluídas das plantas através de barreiras físicas (BENTLEY, 2001).

Em relação às formigas cortadeiras, não se tem conhecimentos sobre quais espécies podem ser encontradas nos parreirais do Estado de São Paulo, ainda que existam reclamações por parte dos agricultores (F.GÓES, comunicação pessoal). No Sul do Brasil, sabe-se que elas atacam alguns cultivares, especialmente de Niágara Rosada. O ataque dessas formigas pode ocorrer em qualquer fase do ciclo da planta, mas os maiores danos ocorrem na fase de crescimento, paralisando-o temporariamente (BOTTON et al., 2003).

Além do fator biológico que influencia na dispersão das ninfas da pérola-da-terra nos parreirais, há também a dispersão em longas distâncias a partir de materiais agrícolas já contaminados, mudas já infestadas e também pelo homem através do solo retido em sapatos (MARICONI; ZANITH, 1973).

Uma vez que a infestação por *E. brasiliensis* pode estar associada à presença de várias espécies de formigas (SORIA et al., 1997) é importante que se tenha o conhecimento das espécies associadas à pérola-da-terra nos plantios, o que será fundamental para o desenvolvimento de programas de manejo de pragas ou de alternativas que possam ser implementadas pelos produtores para evitar a dispersão da cochonilha nas áreas infestadas, principalmente em uma região onde a expansão do cultivo tem sido crescente, como no Estado de São Paulo, justificando os objetivos (i) e (ii) do trabalho.

Assim, a tese foi dividida em dois Capítulos, sendo que o Capítulo 1 abrange os resultados referentes aos objetivos (i) e (ii), detalhando acerca das espécies de formigas nos parreirais do Estado de São Paulo com a presença ou ausência da pérola-da-terra e, os resultados referentes ao objetivo (iii) está apresentado no Capítulo 2 que diz respeito aos aspectos em relação à caracterização molecular de *Eurhizococcus brasiliensis* em diferentes regiões do Brasil.



## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADDISON, P.; SAMWAYS, M. J. A survey of ants (Hymenoptera: Formicidae) foraging in Western Cape vineyards of South Africa. **African Entomology**, v. 8, n. 2, p. 251–260, 2000.
- BENTLEY, W. J. Researching management techniques for grape and vine mealybug in San Joaquin Valley table grapes. Calif. Table Grape Comm. **Annual Report**, v. 29, 2001.
- BOLTON, B. **Synopsis and classification of Formicidae**. Memoirs of the American Entomological Institute, 370 p., 2003.
- BOTTON, M.; SCHUCK, E.; HICKEL, E. R.; SORIA, S. J. **Bioecologia e controle da pérola-da-terra *Eurhizococcus brasiliensis* (Hempel, 1922) (Hemiptera: Margarodidae) na cultura da videira**. Bento Gonçalves: Embrapa Uva e Vinho, 2000. 23 p. (Circular Técnica, 27).
- BOTTON, M. et al. **Manejo de pragas na cultura da videira**. Disponível em: <<http://scarlet.cnpuv.embrapa.br/servicos/viticultura/perola.html>>. Acesso em: 27 fev. 2009.
- BOTTON, M.; HICKEL, E. R.; SORIA, S. J. Pragas. In: FAJARDO, T. V. M. (Ed.). **Uva para processamento: fitossanidade**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2003. (Série frutas do Brasil, 35).
- BOTTON, M.; HICKEL, E.R.; SORIA, S.J.; SCHUCK, E. Pérola-da-terra *Eurhizococcus brasiliensis* (Hemiptera: Margarodidae) na cultura da videira: medidas para evitar a dispersão e manejo em áreas infestadas. In: **Reuniao Sul-Brasileira Sobre Pragas de Solo**, Balneario Camboriu. Anais e Ata. Itajai: Epagri/EEI, 2005. p. 43-48.
- BOTTON, M.; MELO, G.W.B.; OLIVEIRA, O.L.P.; ONZI, I. Efeito da cobertura vegetal sobre a pérola-da-terra (Hemiptera: Margarodidae) na cultura da videira. **Acta Scientiarum Agronomy**, v. 32, n. 4, p. 681-684, 2010.
- BOTTON, M.; SCHUCK, E.; SORIA, S.J.; HICKEL, E.R. **Manejo de pragas na cultura da videira**. Bento Gonçalves: Embrapa Uva e Vinho, 2008. (Capacitação Técnica em Viticultura).
- DAANE, K. M. Developing an Integrated Pest Management program in California vineyards: hitting a moving target. **Proceedings of the American Society of Enology and Viticulture**, p. 364-369, 2000.

DAANE, K. M., SIME, K. R.; FALLON, J.; COOPER, M. L. Impacts of Argentine ants on mealybugs and their natural enemies in California's coastal vineyards. **Ecological Entomology**, v. 32, p. 583-596, 2007.

DAL BÓ, M. A.; PERUZZO, E. L.; SCHUCK, E. Alternativas de manejo para o controle de declínio da videira. **Agropecuária Catarinense**, Florianópolis, v. 20, n. 1, p. 58-61, 2007.

DELABIE, J.H.C. 2001. Trophobiosis Between Formicidae and Hemiptera (Sternorrhyncha and Auchenorrhyncha): an Overview. **Neotropical Entomology**, v. 30, p. 501-516.

DIEHL-FLEIG, E.; DIEHL, E. Organização social e status de praga da formiga argentina *Linepithema humile* (Mayr, 1868) no Rio Grande do Sul. **Biológico**, v. 69, n.2, p. 31-34, 2007.

FADINI, L. A. M.; REGINA, M. A.; FRÁGUAS, J. C.; LOUZADA, J. N. C. Efeito da cobertura vegetal sobre a abundância e diversidade de inimigos naturais de pragas em vinhedos. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 23, n. 3, p. 573-576, 2001.

FIGUEIRA JÚNIOR, E. R. Nova praga da videira em São Paulo – *Eurhizococcus brasiliensis* (Hempel). **O Biológico**, São Paulo, v. 36, n. 9, p. 229-234, 1970.

FOLDI, I. Ground pearls: a generic revision of the Margarodidae *sensu stricto* (Hemiptera: Sternorrhyncha: Coccoidea). **Annual Society Entomology**, v. 41, n.1, p.81-125, 2005.

FOLDI, I. Morphologie des stades larvaires et imaginal du male d' *Eurhizococcus brasiliensis* (Hempel in Wille 1922) (Homoptera: Coccoidea: Margarodidae). **Nouvelle Revue d'Entomologie**, Paris, v. 7, n. 4, p. 405-418, 1990.

FOLGARAIT, P.J. Ant biodiversity and its relationship to ecosystem functioning: a review. **Biodiversity Conservation**, v. 7, p. 1221-1244, 1998.

GALLOTTI, B. J. **Contribuição para o estudo e para o controle químico do *Eurhizococcus brasiliensis* (Hempel, 1922)**. 1976. 63 f. Dissertação de Mestrado – Programa de Pós-Graduação em Entomologia, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 1976.

GIOVANNINI, E. **Produção de uvas para vinho, suco e mesa**. Porto Alegre: Renascença, 2008. 362 p.

HAJI, F. N. P.; ALENCAR, J. A. Pragas da videira e alternativas de controle. In: **A viticultura no semi-árido brasileiro**. Petrolina: Embrapa Semi-Árido, 2000. p. 273-291.

HAJI, F.N.P.; ALENCAR, J.A.; BARBOSA, F.R. Pragas. In: LIMA, M.T.; MOREIRA, W.A. **Uva de mesa. Fitossanidade**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2002. p.53-68.

HAJI, F. N. P.; LIMA, M. P. L.; ALENCAR, J. A.; BARBOSA, F. R.; FERREIRA, R. C. F.; MATTOS, M. A. A. Cochonilha Pérola-da-Terra: Praga Emergente na Cultura da Uva, no Submédio do Vale do São Francisco. **Embrapa Semi-Árido: Circular Técnica**, Petrolina, v. 78, p.8, 2004.

HICKEL, E. R. Pragas da videira. In: BRAGA SOBRINHO, R.; CARDOSO, J. E.; FREIRE, F. C. O. **Pragas de fruteiras tropicais de importância agroindustrial**. Brasília: Embrapa SPI, Fortaleza: Embrapa CNPAT, 1998. p. 191-194.

HICKEL, E. R. Reconhecimento, coleta, transporte e depósito de ninfas da pérola-da-terra (*Eurhizococcus brasiliensis*) pela formiga argentina *Linepithema humile* (Mayr). In: **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, Londrina, p. 285-290, 1994.

HICKEL, E. R.; PERUZZO, E. L.; SCHUCK, E. Pirâmide etária e distribuição espacial da pérola-da-terra no Meio-Oeste Catarinense. **Agropecuária Catarinense**, Florianópolis, v. 22, n. 1, p. 61-68, 2008.

HICKEL, E. R.; SCHIMITT, A. T. Prospecção do controle de pérola-da-terra, *Eurhizococcus brasiliensis* (Hempel), com nematódeos entomopatogênicos, *Steinernema carpocapsae* Allp. In: **Reunião Sul - Brasileira sobre pragas de solo**, Anais e Ata. Santa Maria: UFSM, 1997, p.103-105.

HICKEL, E.R. Homopteros nocivos. In: Hickel, E.R. **Pragas das fruteiras de clima temperado no Brasil. Guia para o manejo integrado de pragas**. Florianópolis: Epagri, 2008. p.55-96.

HICKEL, E.R.; PERUZZO, E.L.; SCHUCK, E. Controle da pérola-da-terra, *Eurhizococcus brasiliensis* (Homoptera: Margarodidae), através da desinsetização. **Neotropical Entomology**, v. 30, n.1, p.125-132, 2001.

HICKEL, E.R.; SCHUCK, E. Pragas da videira e seu controle no estado de Santa Catarina. **Boletim técnico 77**. Florianópolis: Epagri, 1996.

HÖLLDOBLER, B.; WILSON, E.O. **The ants**. Cambridge: Belknap Press, 1990. 732p.

IAC. **Centro Avançado de Pesquisa Tecnológica do Agronegócio de Frutas**. Disponível em: <<http://www.iac.sp.gov.br/>>. Acesso em: 15 dez 2008.

IBGE. **Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística**. 2007. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br/>>. Acesso em: 10 out 2009.

IBRAVIN. **A vitivinicultura brasileira**. Disponível em: <<http://www.vinhosdobrasil.com.br/brasilvitivinicola.php>>. Acesso em: 28 nov 2008a.

IBRAVIN. **Principais regiões produtoras**. Disponível em: <<http://www.ibravin.com.br/regioesprodutoras.php>>. Acesso em: 28 nov 2008b.

LEÃO, P.C.S.; PEREIRA, F.M. Avaliação de seis variedades de uvas sem sementes no Submédio São Francisco. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.36, n.4, p.607-613, 2001.

LOURENÇÃO, A.L.; MARTINS, F.P.; ALARCON, L.C.M. Ocorrência de *Eurhizococcus brasiliensis* (Hempel) (Homoptera: Margarodidae) em videira no município de Louveira, Estado de São Paulo. **Bragantia**. v. 48, n.2, p.205-208, 1989.

MANDELLI, F. **Relações entre variáveis meteorológicas, fenologia e qualidade da uva na “Serra Gaúcha”**. 2002. Tese de Doutorado, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2002.

MARICONI, F. A. M.; ZAMITH, A. P. L. Contribuição para o conhecimento dos Margarodidae (Homoptera: Margarodidae) que ocorrem no Brasil. In: **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, Londrina, 1973, p. 86-101.

MARTINS, C.; BUENO, O.C. Ocorrência de três haplótipos de *Linepithema micans* (Formicidae: Dolichoderinae) no Rio Grande do Sul e seu provável status de praga. In: **Anais do XIX Simpósio de Mirmecologia - 1º Simpósio Franco-Brasileiro de Mirmecologia**, Ouro Preto, UFOP, 2009.

MARTINS, C., NONDILLO, A., MARTINS, V.G., BOTTON, M., BUENO, O.C. Occurrence of Three Haplotypes of *Linepithema micans* (Forel) (Hymenoptera: Formicidae) in Southern Brazil. **Neotropical Entomology**, v. 41, p.57–61, 2012.

MATOS, C. S.; SCHUCK, E. Controle de pragas da videira. **Agropecuária Catarinense**, v. 1, n. 2, p. 12-14, 1988.

MELLO, L. M. R. **Atuação do Brasil no mercado vitivinícola mundial: panorama 2011.** Bento Gonçalves: EMBRAPA/CNPUV, 2012. (Comunicado técnico, 116).

MGOICHEKI, N.; ADDISON, P. Spatial distribution of ants (Hymenoptera: Formicidae), vine mealybugs and mealybug parasitoids in vineyards. **Journal of Applied Entomology**, p.1-11, 2010.

MILANEZ, J. M. Diagnóstico de pragas de solo do Estado de Santa Catarina. In: **Reunião Sul Brasileira de pragas de Solo**, Londrina. Anais. Londrina: Embrapa Soja, 2001. p. 26-28.

MORALES, L. Relatos de ocorrências de pragas de solo no Estado do Paraná – 2001. In: **Reunião Sul Brasileira de pragas de Solo**, Londrina. Anais. Londrina: Embrapa Soja, 2001. p. 28-32.

MORANDI FILHO, W.J. **Cochonilhas-farinhas associadas à videira na Serra Gaúcha, bioecologia e controle de *Planococcus citri* (Risso, 1813) (Hemiptera: Pseudococcidae).** 2008. Tese de Doutorado, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2008.

MULLINS, M. G.; BOPUQUET, A.; WILLIAMS, L. E. **Biology of grapevine.** New York: Cambridge University, 1992. 239 p.

NONDILLO, A.; SGANZERLA, V.; BOTTON, M.; BUENO, O.C. Efeito da presença de *Linepithema micans* (Hymenoptera: Formicidae) na infestação de *Eurizococcus brasiliensis* (Hemiptera: Margarodidae) em plantas de videira. In: **Congresso Brasileiro de Entomologia.** Natal, RN, 2010a.

NONDILLO, A.; SGANZERLA, V.; BUENO, O.C.; BOTTON, M. *Linepithema micans* (Hymenoptera: Formicidae) associada à dispersão da pérola-da-terra na cultura da videira. In: **8º Encontro de Iniciação Científica e 4º Encontro de Pós-graduação da Embrapa Uva e Vinho.** Bento Gonçalves, RS, 2010b.

NOVO, J. P. S. Pérola-da-terra. **O Estado de São Paulo**, São Paulo, 1978. (Suplemento Agrícola).

PROTAS, J.F.S.; CAMARGO, U.A. **Viticultura Brasileira: Panorama Setorial em 2010.** Sebrae – Ibravin - Embrapa Uva e Vinho, 2011.

SACCHETT, F. Comunidades de formigas em vinhedos e espécies associadas com a dispersão de cistos da pérola-da-terra *Eurhizococcus brasiliensis* (Wille, 1922) (Hemiptera:

Margarodidae). 2006. 79f. Dissertação de Mestrado – Universidade do Vale do Rio dos Sinos, São Leopoldo, 2006.

SACCHETT, F.; BOTTON, M.; DIEHL, E. Ants species associated with the dispersal of *Eurhizococcus brasiliensis* (Hempel in Wille) (Hemiptera: Margarodidae) in Vineyards of the Serra Gaúcha, Rio Grande do Sul, Brazil. **Sociobiology**, v.54, n.3, p.943-954, 2009.

SCHMIDT, F. S.; LEITE, L. G.; de KLERK, C.A.; CANESIN, A.; MARRASCHI, R.; BALLONE, P. Seasonal Occurrence and Distribution on Grapevine Roots of *Eurhizococcus brasiliensis* (Willw) (Hemiptera: Margarodidae) in Brazil. **S. Afr. J. Enol. Vitic**, v. 34, n. 1, p. 79-85, 2013.

SCHMIDT, F. S.; LEITE, L. G.; CANESIN, A.; TAVARES, F. M.; ALARCON, L. C. M. Flutuação populacional da pérola da terra, *Eurhizococcus brasiliensis* (Hempel) (Homoptera: Margarodidae), em cultivo de uva no município de Louveira, SP, e suscetibilidade do inseto ao nematoide *Heterorhabditis* sp. ibcb n24 (Nematoda: Rhabditidae). **Biológico**, v. 71, n. 2, p. 19-51, 2009.

SILVA, E. J. E.; LOECK, A. E. Ocorrência de formigas domiciliares (Hymenoptera, Formicidae) em Pelotas, RS. **Revista Brasileira Agrociência**, v. 5, n. 3, p. 220-224, 1999.

SÔNEGO, O. R.; GARRIDO, L. R. Doenças fúngicas da videira e seu controle. **Capacitação técnica em viticultura**. Bento Gonçalves: Embrapa Uva e Vinho, 2007.

SORIA, S. DE. J.; DELABIE, J.; MORAES, J.E.V.; ENCARNAÇÃO, A.M.V. Formigas (Hymenoptera: Formicidae) associadas a *Eurhizococcus brasiliensis* (Homoptera: Margarodidae) no sistema radicular de videiras *Vitis* spp. no sul do Brasil. In: **Congresso Brasileiro de Entomologia**, 1997, Salvador. Resumos. Cruz das Almas: Sociedade Entomológica do Brasil/Embrapa Mandioca e Fruticultura, 1997. p. 353.

SORIA, S. J.; DAL CONTE, A. F. Bioecologia e controle das pragas da videira no Brasil. **Entomologia y Vectores**, v. 7, n. 1, p. 73-102, 2000.

SORIA, S. J.; GALLOTTI, B. J. **O margarodes da videira *Eurhizococcus brasiliensis* (Homoptera: Margarodidae):** biologia, ecologia e controle no Sul do Brasil. Bento Gonçalves: Embrapa CNPUV, 1986. 22 p. (Circular técnica, 13).

SORIA, S. J.; MELLO, R. P. Ocorrência de *Prolepsiis lucifer* (Wiedemann, 1828) (Diptera: Asilidae) no sul do Brasil, com anotações morfológicas sobre larvas e pupas. **Entomologia y Vectores**, v. 5, n. 6, p.279-294, 1998.

SOUSA, J. S. I.; MARTINS, F. P. **Viticultura brasileira: principais variedades e suas características**. Piracicaba: FEALQ, 2002. 368 p.

SUAREZ, A. V.; HOLWAY, D. A.; CASE, T. J. Patterns of spread in biological invasions dominated by long-distance jump dispersal: Insights from Argentine ants. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 98, n. 3, p. 1095 – 1100, 2001.

TECCHIO, M.A.; PAIOLI-PIRES, E.J.; TERRA, M.M.; TEIXEIRA, L.A.J.; LEONEL, S. Características físicas e acúmulo de nutrientes pelos cachos de “Niagara Rosada” em Vinhedos na região de Jundiaí. **Revista Brasileira de Fruticultura**. v. 29, n. 3, p. 621-625, 2007.

TEIXEIRA, I.; BOTTON, M.; LOECK, A.E. Avaliação de inseticidas visando ao controle de *Eurhizococcus brasiliensis* (Hempel) (Hemiptera: Margarodidae) em novos plantios de videira. **Neotropical Entomology**. v. 31, n. 3, p. 457-461, 2002.

WILD, A. L. **Taxonomic revision of the ant genus *Linepithema* (Hymenoptera: Formicidae)**. Los Angeles: University of California Press, 2007. 151p.

ZART, M. **Caracterização morfológica, fisiológica e bioquímica do ataque da pérola-da-terra (*Eurhizococcus brasiliensis*) (Wille, 1922) (Hemiptera: Margarodidae) em videiras**. 2012, Tese de Doutorado, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2012.

## **CAPÍTULO 1**

---



## **FORMIGAS (HYMENOPTERA: FORMICIDAE) EM PARREIRAIS INFESTADOS E NÃO INFESTADOS PELA PÉROLA-DA-TERRA (*Eurhizococcus brasiliensis*) NO ESTADO DE SÃO PAULO**

### **RESUMO**

A associação entre formigas e cochonilhas pode ocasionar prejuízos à agricultura, incluindo parreirais. Na região Sul do Brasil, a formiga *Linepithema micans* promove a dispersão de *Eurhizococcus brasiliensis* (pérola-da-terra), uma cochonilha de raiz que pode ocasionar perdas econômicas. Neste estudo, avaliaram-se as comunidades de formigas em parreirais infestados e não infestados pela pérola-da-terra nos principais municípios produtores de uva da variedade Niágara Rosada da região Sudeste do Brasil, tendo como hipóteses: (i) a composição da comunidade de formigas difere entre os parreirais com e sem *E. brasiliensis*; (ii) cultivares infestados apresentam uma ou mais espécies com alta frequência de ocorrência; (iii) as espécies de formigas tem preferência por isca açucarada. As formigas foram coletadas usando armadilhas subterrâneas, em dez parreirais infestados e dez não infestados pela cochonilha. Não houve associação significativa entre a pérola-da-terra e a riqueza e composição de espécies de formigas. *Solenopsis invicta* (Hymenoptera: Formicidae) foi a espécie mais frequente e abundante, porém sua presença não deve estar relacionada com a presença da cochonilha e sim à sua capacidade invasora. *Pheidole aberrans*, *Pheidole subarmata* e *Brachymyrmex incisus* foram frequentes, principalmente na estação chuvosa, quando as ninfas da pérola-da-terra prevalecem no Estado de São Paulo. Também não foi observada preferência em relação às iscas. Espécies de ambientes mais conservados ou especialistas foram registradas na vitivinicultura, mesmo com o uso de técnicas de manejo convencional.

**Palavras-chave:** Comunidade de formigas. Cochonilha. Viticultura. Armadilha subterrânea. *Solenopsis invicta*.

## **ANTS (HYMENOPTERA: FORMICIDAE) IN VINEYARDS THAT ARE INFESTED OR UNINFESTED WITH GROUND-PEARLS (*Eurhizococcus brasiliensis*) IN SÃO PAULO STATE**

### **ABSTRACT**

The association between ants and mealybugs can result in damage to agriculture, including vineyards. In southern Brazil, the ant *Linepithema micans* contributes to the dispersal of *Eurhizococcus brasiliensis* (ground-pearl), a root mealybug that can lead to economic losses. In the present study, the ant communities in vineyards that were infested or uninfested with ground-pearls were evaluated in the primary municipalities that produce the Niágara Rosada variety of grapes in southeastern Brazil, having as hypotheses: (i) the composition of the ant community differ between vineyards with and without *E. brasiliensis*, (ii) infested vineyards exhibit one or more species with high frequency of occurrence, (iii) the ant species have a preference for sugary bait. The ants were collected using subterranean traps in ten vineyards infested with this mealybug and ten uninfested vineyards. There was no significant association between ground-pearls and the composition or richness of the ant species. *Solenopsis invicta* (Hymenoptera: Formicidae) was the most common observed, but this presence should not be related to the presence of mealybug but their invasive capacity. *Pheidole aberrans*, *Pheidole subarmata* and *Brachymyrmex incisus* were common, especially in the rainy season when ground-pearl nymphs were prevalent in the state of São Paulo. There was also no preference regarding baits. Species from preserved or specialized environments were recorded in the vineyards, even with the use of conventional management techniques.

**Keywords:** Ant communities. Mealybug. Vineyards. Subterranean trap. *Solenopsis invicta*.

## 1 INTRODUÇÃO

A viticultura no Brasil abrange as regiões Sul, Sudeste, Centro-Oeste e Nordeste (PROTAS; CAMARGO, 2011). O Estado do Rio Grande do Sul possui a maior área cultivada do País, com 49,191 mil hectares (IBGE, 2011), seguido pelo Estado de São Paulo, com 9,750 mil hectares. O Estado de São Paulo é o maior produtor nacional de uva de mesa (TECCHIO et al., 2007), principalmente da variedade Niágara Rosada (VERDI et al., 2005; PROTAS; CAMARGO, 2011).

Uma das principais pragas da viticultura na região Sul do Brasil é a cochonilha de raiz, *Eurhizococcus brasiliensis* (Margarodidae) conhecida como pérola-da-terra (HICKEL, 2008). No Estado de São Paulo, este inseto foi registrado pela primeira vez na videira na década de 80 (LOURENÇÃO et al., 1989). A pérola-da-terra tem hábito subterrâneo; é prejudicial à cultura na fase de ninfa, pois os adultos são desprovidos de aparelho bucal (HICKEL; SCHUCK, 1996). A disseminação do inseto ocorre a partir da ninfa primária que se locomove lentamente no solo, ou durante a manipulação do cultivo (HAJI et al., 2004).

Cultivares com cochonilhas contribuem para o estabelecimento de ninhos de formigas (CHONG et al., 2011), que mantém uma relação trofobiótica com esses hemípteros devido a liberação de “honeydew” (DELABIE, 2001; DELABIE; FERNÁNDEZ, 2003). Muitos trabalhos relatam a diversidade (DELABIE et al., 2007; PHILPOTT et al., 2008; MENTONE et al., 2009; SOUZA et al., 2010; TEODORO et al., 2011) e importância de formigas nos agroecossistemas (PECK et al., 1998; PHILPOTT; ARMBRECHT, 2006; PHILPOTT et al., 2008; LARSEN; PHILPOTT, 2010; OLIVEIRA et al. 2012). Ao construir galerias (FOLGARAIT, 1998; SANDERS; VAN VEEN, 2011), as formigas alteram as propriedades estruturais e químicas do solo, aumentando a porosidade, a drenagem, a aeração, o volume e a incorporação da matéria orgânica (HOLE, 1981; LAVELLE et al., 1997; RISCH; JURGENSEN, 2008; SANDERS; VAN VEEN, 2011).

Por outro lado, as galerias também contribuem para a sobrevivência da pérola-da-terra nos cultivos de uva e posterior dispersão pelas próprias formigas (BOTTON et al., 2005). *Linepithema micans* dispersa ninfas recém-eclodidas da cochonilha no Estado do Rio Grande do Sul (MARTINS; BUENO, 2009; SACHETT et al., 2009; NONDILLO et al., 2010a, 2010b), sendo que dois haplótipos estão fortemente associados à pérola-da-terra (MARTINS et al., 2012a).

Em contraposição aos fatores biológicos que podem interferir na dispersão da pérola-da-terra nos parreirais, é sabido que o uso de material agrícola como também a utilização de

mudas enraizadas já contaminados com a cochonilha, podem ser o principal meio de dispersão desse inseto entre os parreirais (MARICONI; ZAMITH, 1973; BOTTON et al., 2008).

Este estudo investigou as comunidades de formigas, avaliando a riqueza e o número de espécimes em parreirais infestados ou não por *E. brasiliensis*, em diferentes estações do ano. As seguintes hipóteses foram testadas: 1. a composição das comunidades de formigas difere entre os parreirais com e sem cochonilha; 2. cultivares infestados pelo inseto apresentam uma ou mais espécies com alta frequência de ocorrência e 3. as espécies de formigas mais frequentes têm preferência por isca açucarada.

A premissa do presente estudo foi que cultivares de uva com cochonilha apresentassem um maior número de espécies de formigas, pois esses insetos possuem interações ecológicas mutualísticas (DELABIE et al., 2003). Assim, esperava-se que a riqueza de formigas fosse maior em cultivares com cochonilhas, pois muitas espécies criam hemípteros para se alimentarem do “honeydew” (DELABIE et al., 2003) e, como consequência, podem promover a dispersão da pérola-da-terra no cultivo (BOTTON et al., 2008).

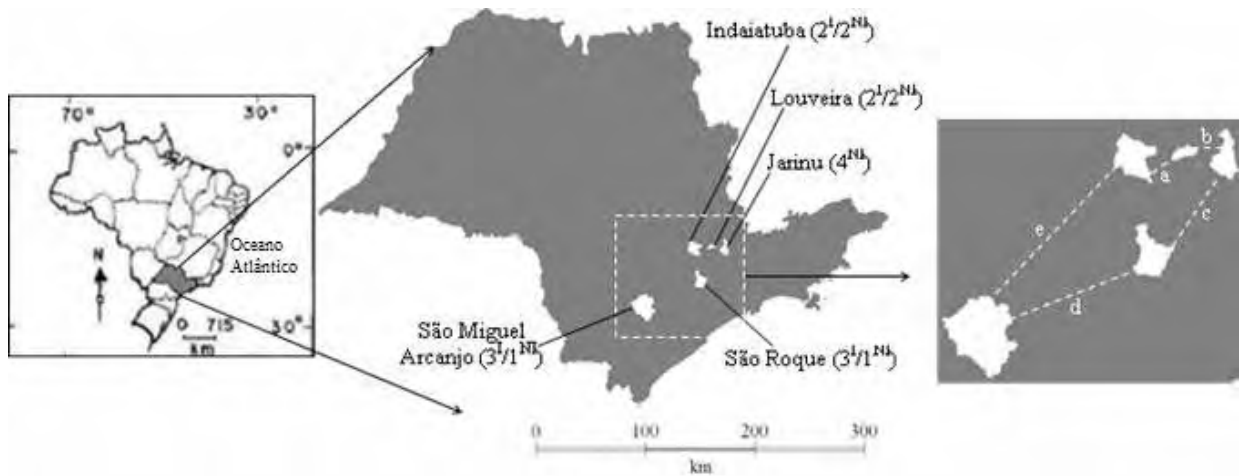
## 2 MATERIAIS E MÉTODOS

### 2.1 Áreas de coleta

As coletas foram realizadas em cinco municípios produtores de uva de mesa (Niágara Rosada), na região Sudeste do Brasil (Estado de São Paulo) nos anos de 2010 e 2011. Estes municípios se localizam geograficamente próximos: Indaiatuba (23°05'12"S; 47°13'06"W), Louveira (23°05'11"S; 46°57'02"W), Jarinu (23°07'22"S; 46°45'01"W), São Roque (23°31'45"S; 47°08'07"W) e São Miguel Arcanjo (23°52'42"S; 47°59'50"W) (Figura 1). Estão localizados no Bioma Mata Atlântica; a temperatura média da região durante o período de coleta foi de 21°C e a pluviosidade média de 128 mm (CIIAGRO, 2013). Durante a fase experimental, a rotina do cultivo foi mantida, ou seja, no geral com aplicação de inseticidas duas vezes ao ano, remoção de ervas daninhas com a utilização de herbicidas e aplicação de fertilizantes uma vez ao ano.

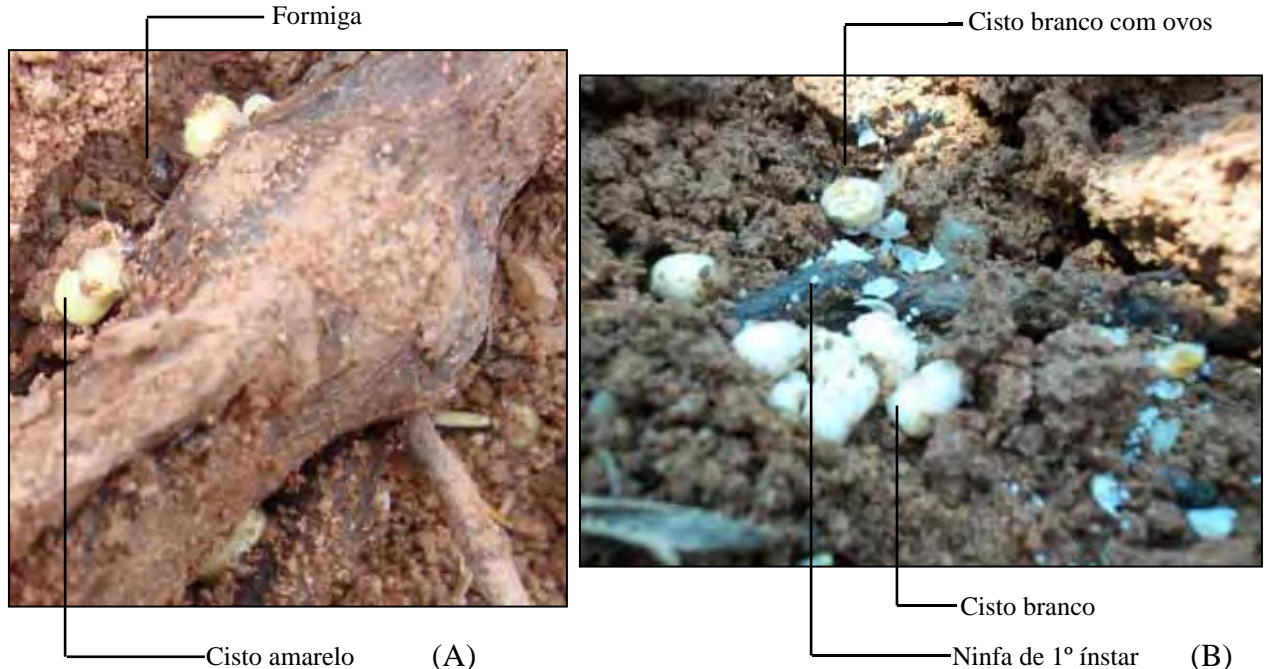
Foram escolhidos quatro parreirais em cada município, totalizando 20 sítios de coleta, sendo 10 infestados e 10 não infestados pela pérola-da-terra (Figura 1). Os sítios de coleta, dentro de um mesmo município, não distavam mais do que 5 km. A escolha dos parreirais foi feita com a ajuda dos Engenheiros Agrônomos e/ou Agrícola da Casa de Agricultura de Louveira e Jarinu, do Sindicato Rural de Indaiatuba, do Instituto Agrônomo de Campinas e da Vinícola Góes de São Roque. A seleção dos parreirais infestados foi baseada em análise minuciosa das raízes das videiras de cada parreiral. Nesta análise foi verificada a presença de ninfas, cistos ou fêmeas da pérola-da-terra; o parreiral foi considerado infestado quando qualquer fase da cochonilha foi registrada. As Figuras 2 A e B ilustram a presença da pérola-da-terra em umas das propriedades amostradas.

**Figura 1** – Localização dos municípios de coleta no Estado de São Paulo e a indicação da quantidade de parreirais infestados (I) ou não (NI). As letras a, b, c, d, e indicam a distância em km dos municípios amostrados (a: 37,5; b: 33,0; c: 110,0; d: 117,0; e: 143,0).



Fonte: IBGE (2011), modificado

**Figura 2** – Distintas fases da pérola-da-terra em Louveira (São Paulo). Em (A) pode-se observar um espécime de formiga, próximo a um cisto amarelo da cochonilha; em (B) as ninfas de primeiro ínstar fixas na raiz de videira, além de cisto branco e cisto branco com ovos. Fotos: C.B.Munhae, 2010.



## 2.2 Coleta e identificação das formigas

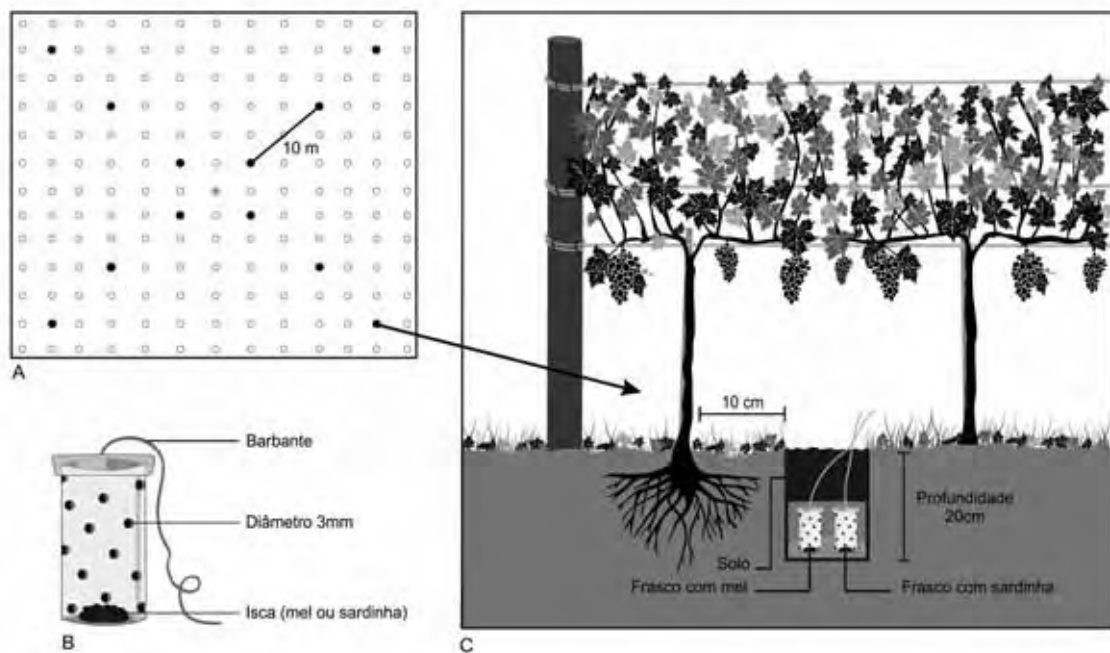
Em cada parreiral foram perfurados 12 buracos de 20 cm de profundidade, com um escavador manual. Os buracos eram equidistantes (a cada 10 m) (Figura 3A) e foram feitos

próximos às raízes de uma videira (Figura 3C). A colocação das armadilhas a 20 cm de profundidade foi baseada em Hickel et al. (2008), que verificaram que a pérola-da-terra encontra-se em maior concentração na faixa de zero a 20 cm de profundidade.

As formigas foram coletadas nas estações seca e chuvosa, sempre no período da manhã, usando uma armadilha confeccionada com um frasco plástico (altura = 4,5 cm; diâmetro = 3,0 cm), perfurado com furos de 3,0 mm de diâmetro (MORINI et al., 2004; FIGUEIREDO et al., 2013) (Figuras 3B e 3C).

Em cada buraco no solo foram colocadas duas armadilhas, uma contendo sardinha amassada juntamente com o óleo da conserva (1 cm<sup>3</sup>) e a outra com mel silvestre (1 cm<sup>3</sup>) (Figura 3C). Foram usados diferentes tipos de iscas atrativas com o intuito de capturar o maior número de espécies de formigas que forrageiam abaixo da superfície do solo. Após seis horas de permanência no campo, as armadilhas foram retiradas e o material foi separado por ponto de coleta e por isca. Este procedimento foi seguido em todas as expedições de coleta. O tempo de permanência das armadilhas foi determinado em seis horas, pois em visitas prévias observou-se que nesse tempo o maior número de espécies podia ser capturado. Em um tempo maior, as espécies mais agressivas dominavam e carregavam as iscas.

**Figura 3** – Representação da distribuição das armadilhas subterrâneas nos parreirais (A); pote utilizado como armadilha (B); posicionamento da armadilha no campo (C). Legenda: (○) área central do cultivo; (○) videira sem armadilha; (●) videira com armadilha.



Como as formigas cortadeiras não visitam as iscas subterrâneas, elas foram amostradas a partir de coleta manual de acordo com os ninhos encontrados nos parreirais no momento das coletas. A coleta manual possibilitou o diagnóstico de quais espécies de Attini estavam presentes nos cultivares. Esses táxons não foram incluídos nas análises estatísticas, uma vez que o objetivo em relação a esse grupo de formigas era apenas de diagnosticar as espécies presentes nos cultivares.

O material foi separado em subfamílias, gêneros e nomeado de acordo com a proposta de Bolton (2013). Em seguida, o material foi separado em morfoespécies por meio da comparação com os espécimes da coleção de Formicidae do Alto Tietê (Universidade de Mogi das Cruzes). Os códigos para as morfoespécies seguem a referida coleção. As espécies foram identificadas por comparação com exemplares depositados no Museu de Zoologia da Universidade de São Paulo (MZSP) e com bibliografia pertinente. Os *vouchers* foram depositados na Universidade de Mogi das Cruzes (SP).

Especificamente para os espécimes de *Solenopsis* e *Linepithema* um procedimento complementar foi adotado, pois as espécies desses gêneros são de difícil identificação. Para tal, foi utilizado o DNA mitocondrial, mais especificamente da COI (Citocromo Oxidase I) (HEBERT et al., 2003a, 2003b; RATNASINGHAM; HEBERT, 2007).

A extração do DNA se deu a partir do Kit “Wizard Genomic” (Promega®) e para a reação de polimerização em cadeia (PCR) dos espécimes de *Solenopsis*, utilizaram-se os primers C1-J-2195 (COI-RLR) (5'- TTGATTTTTTGGTCATCCAGAAGT - 3'), DDS-COII-4 (5' – TAAGATGGTTAATGAAGAGTAG - 3') (ROSS et al., 1997; AHRENS et al., 2005) e/ou JerryGarcia-CI (5' – GGAATTAGAATTTTGAAGAG – 3') (SHOEMAKER et al., 2006) para amplificar fragmentos de cerca de 920 pares de bases do DNA mitocondrial (que inclui parte do gene da citocromo oxidase I, RNA transportador de leucina e parte da citocromo oxidase II).

O programa da termocicladora consistiu em 94°C (1 min), seguido por 35 ciclos de 94°C (30 seg), 48°C (60 seg), 68°C (120 seg), e uma extensão final de 72°C (5 min) para reações com os primers C1-J-2195 e DDS-COII-4; já para reações com os primers C1-J-2195 e JerryGarcia-CI, o programa da termocicladora consistiu em 95°C (1 min), seguido por 40 ciclos de 94°C (60 seg), 43°C (60 seg), 68°C (120 seg), e uma extensão final de 72°C (2 min). As reações de polimerização em cadeia foram realizadas sempre com o primeiro par de primers (C1-J-2195 e DDS-COII-4); caso não houvesse produto amplificado, a PCR era repetida com a utilização do segundo par de primer (C1-J-2195 e JerryGarcia-CI). O produto amplificado foi visualizado em gel de agarose 1%, e após isso, foi realizada a purificação em



coluna com o kit illustra™ (GE Healthcare®). As reações de sequenciamento sempre apresentaram um volume final de 10 µl e foram feitas com a química “BigDye Terminator” (Applied Biosystem Inc®) seguindo o protocolo padrão fornecido pelo fabricante. Utilizou-se um sequenciador automático modelo ABI 3130 (Applied Biosystem TM®). As sequências obtidas foram alinhadas a partir do software BioEdit 7.0 e comparadas com o banco de dados do “GenBank”.

Já para os espécimes de *Linepithema*, utilizaram-se os primers LEP-F1 (5'-ATTCAACCAATCATAAAGATAT-3') e LEP-R1 (5'-TAAACTTCTGGATGTCCAAAAA-3') para amplificação de um fragmento de aproximadamente 648 pares de bases do gene mitocondrial (COI). O programa da termocicladora consistiu em 95°C (7 min), seguido por 35 ciclos de 94°C (90 seg), 43°C (120 seg), 70°C (180 seg), e uma extensão final de 65°C (7 min). Adicionalmente, tais espécimes foram confirmados pelo Dr. Alex Wild. A visualização do produto purificado, a purificação e as reações de sequenciamento foram feitas conforme descrito acima para os espécimes de *Solenopsis*.

## 2.3 Análise dos dados

Com exceção das formigas cortadeiras, as demais espécies atraídas às iscas foram incluídas nas análises, utilizando tanto os dados de riqueza como de abundância das espécies. Todas as análises foram precedidas pelo teste de Lilliefors para verificar a normalidade dos dados. O nível de significância adotado em todos os testes foi de 5%. Os dados não sendo normais foram descritos pela mediana e amplitude de variação, além da aplicação do teste de Mann-Whitney e Kruskal-Wallis (AYRES et al., 2007).

### 2.3.1. Riqueza de espécies

A partir dos dados de riqueza (número de espécies), calculou-se a frequência relativa considerando a presença ou ausência das espécies de formigas, dividindo a frequência absoluta de cada espécie pelo valor total de observações nos parreirais infestados e não infestados pela pérola-da-terra, de acordo com as estações e com o tipo de isca. Foi realizada também a análise de associação para as cinco espécies mais frequentes amostradas nos parreirais, utilizando a correlação de Spearman. O teste de Mann-Whitney foi usado para verificar se a riqueza observada nos parreirais infestados ou não é influenciada pela estação

do ano e pelo tipo de isca. Kruskal-Wallis foi aplicado para analisar a riqueza de espécies dos parreirais entre os diferentes municípios.

### 2.3.2. Abundância de espécies

A abundância diz respeito ao número de indivíduos de uma determinada espécie que varia no espaço e no tempo (SILVEIRA NETO et al., 1976) e é determinada pela soma total dos indivíduos de cada espécie.

O teste de Mann-Whitney foi usado para verificar se a abundância de formigas nos parreirais infestados ou não é influenciada pela estação do ano e pelo tipo de isca. Adicionalmente, foi realizada a análise faunística para determinar classes de abundância, constância, frequência e dominância das espécies.

Para estabelecer classes de abundância, calculou-se o intervalo de confiança (IC), a 1% e 5% de probabilidade, a partir do número total de indivíduos de cada espécie e seu respectivo desvio padrão, definindo as seguintes classes:

- Rara (r) – quando o número de indivíduos foi menor que o limite inferior do IC a 1% de probabilidade;
- Dispersa (di) – quando o número de indivíduos ficou situado entre os limites do IC a 1% e a 5% de probabilidade;
- Comum (c) – quando o número de indivíduos ficou situado dentro do IC a 5% de probabilidade;
- Abundante (a) – quando o número de indivíduos foi superior ao IC a 1% e a 5% de probabilidade;
- Muito abundante (ma) – quando o número de indivíduos foi maior que o limite superior do IC a 1% de probabilidade.

A constância é um parâmetro que se refere à distribuição de cada espécie ao longo das coletas realizadas, ou seja, a porcentagem de vezes que a espécie esteve presente em relação a todas as coletas realizadas; tendo sido calculada pela fórmula (1):

$$C = \frac{Px100}{N} \quad (1)$$

Onde:

C = constância;

P = número de coletas contendo cada espécie;

N = número total de coletas realizadas.

De acordo com Bodenheimer (1955), o valor de cada espécie permitiu classificá-la como:

- Constante (w) – quando a espécie esteve presente em mais de 50% das coletas;
- Acessória (y) – quando a espécie esteve presente no intervalo de 25% a 50% das coletas;
- Acidental (z) – quando a espécie esteve presente em menos de 25% das coletas.

Calculou-se também a frequência, que neste caso representou o número de indivíduos de uma espécie em relação ao total de indivíduos coletados na área, a partir da fórmula (2):

$$F = \frac{I}{T} \times 100 \quad (2)$$

Sendo:

F = frequência;

I = número de espécimes da espécie no local amostrado;

T = número total de espécimes coletados na área.

De acordo com os dados obtidos, estabeleceu-se uma classe de frequência para cada espécie, que foi baseada no intervalo de confiança (IC) a 5% de probabilidade (FAZOLIN, 1991):

- Pouco frequente (pf) – quando a porcentagem de indivíduos amostrados foi menor que o limite inferior do IC a 5% de probabilidade;
- Frequente (f) – quando a porcentagem de indivíduos amostrados ficou dentro do IC a 5% de probabilidade;
- Muito frequente (mf) - quando a porcentagem de indivíduos amostrados foi maior que o limite superior do IC a 5% de probabilidade.

Segundo Silveira Neto et al. (1976), dominante é o organismo que recebe o impacto do meio e transforma-o, podendo levar ao aparecimento ou desaparecimento de outras espécies. Dessa forma, determinou-se a dominância de acordo com o método de Sakagami e Laroca

(FAZOLIN, 1991), que considera como espécies dominantes aquelas em que a frequência exceder o limite de dominância, dado pela fórmula (3):

$$LD = \frac{1}{S} \times 100 \quad (3)$$

Sendo:

LD = limite de dominância;

S = número total de espécies.

### 2.3.3. Análises de diversidade e similaridade

De acordo com Magurran (1983), a diversidade compõe-se do número de espécies e da abundância dos indivíduos, podendo ser representada através de índices de diversidade. Optou-se por calcular os índices de diversidade de Shannon (H'), de equitabilidade (E) e o Índice de Simpson (D), uma vez que tais índices se baseiam tanto no número como na abundância das espécies. Para isso, utilizou-se o software BioDap (THOMAS, 2000).

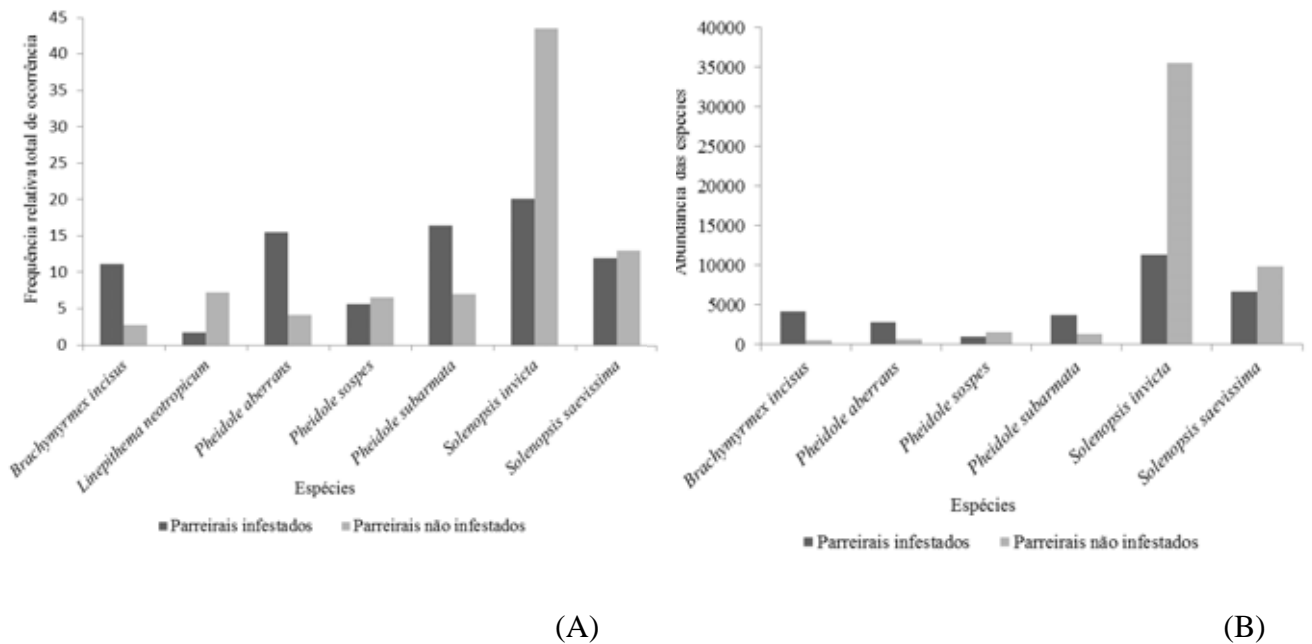
O índice de similaridade de Sorensen foi aplicado para verificar a similaridade entre as espécies nos parreirais infestados e não infestados, nas estações seca e chuvosa e entre os diferentes tipos de iscas. Adicionalmente a este índice, as relações de similaridade entre os parreirais com presença ou ausência da praga e entre os parreirais dos diferentes municípios foram verificadas a partir de uma análise de ordenação pelo método de escalonamento multidimensional não métrico (NMDS - nonmetric multidimensional scaling). A medida de dissimilaridade utilizada foi a distância de Bray-Curtis (LEGENDRE; LEGENDRE, 1998). O ANOSIM (CLARKE, 1993) foi empregado para verificar diferenças de composição da mirmecofauna entre os parreirais infestados ou não e entre os municípios.

Todas estas análises foram realizadas com auxílio do software R (R DEVELOPMENT CORE TEAM, 2011) e do software BIOESTAT 5.0 software (AYRES et al., 2007), com o nível de significância a 5%.

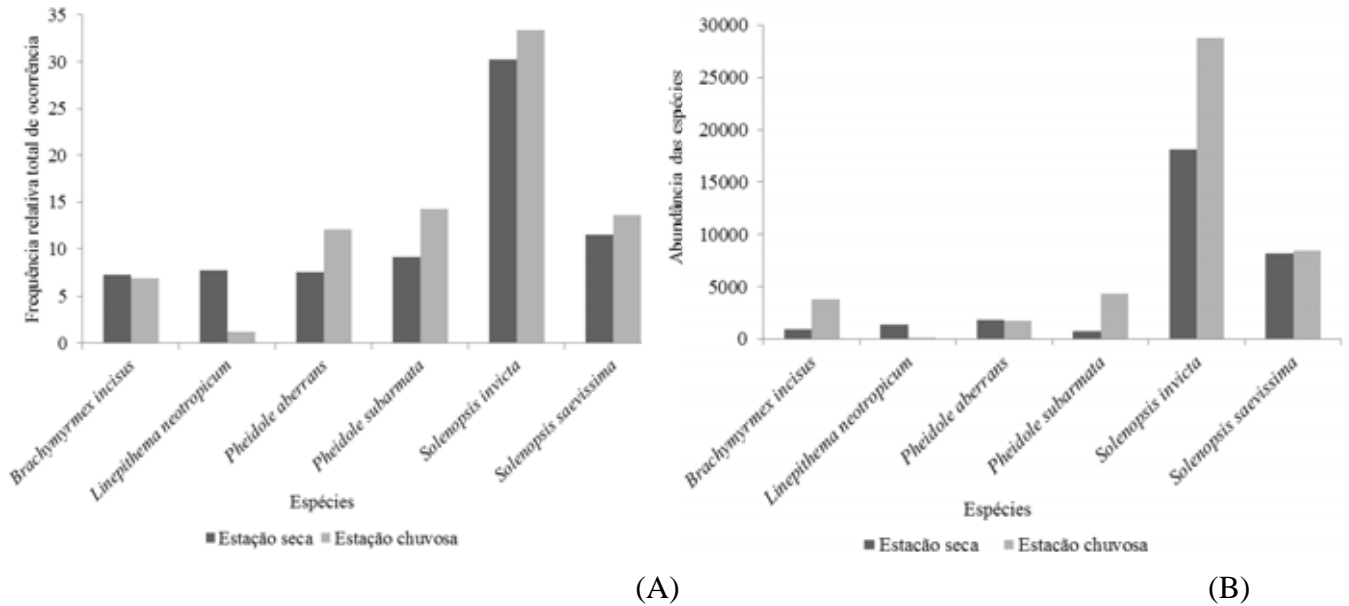
### 3 RESULTADOS

O método de coleta utilizado (armadilha subterrânea com iscas) registrou um total de 86.748 formigas, distribuídas em 6 subfamílias, 13 gêneros e 22 espécies, sendo duas delas pertencentes ao grupo de formigas cortadeiras. Myrmicinae representou 53% das espécies coletadas. *Pheidole* foi o gênero mais rico, com 31% das espécies. A maioria das espécies registradas pertence a táxons generalistas, exceto por *Labidus coecus* que é criptobiótico (Tabela 1). *Solenopsis invicta* foi a espécie mais frequente e abundante nos parreirais (Tabela 1), infestados ou não (Figuras 4A e 4B), independentemente da estação do ano (Figuras 5A e 5B) e do tipo de isca (Figuras 6A e 6B). Essa espécie apresentou associação negativa com *S. saevissima* e *Pheidole aberrans* e associação positiva com *Brachymyrmex incisus* e *Pheidole subarmata* (Figura 7).

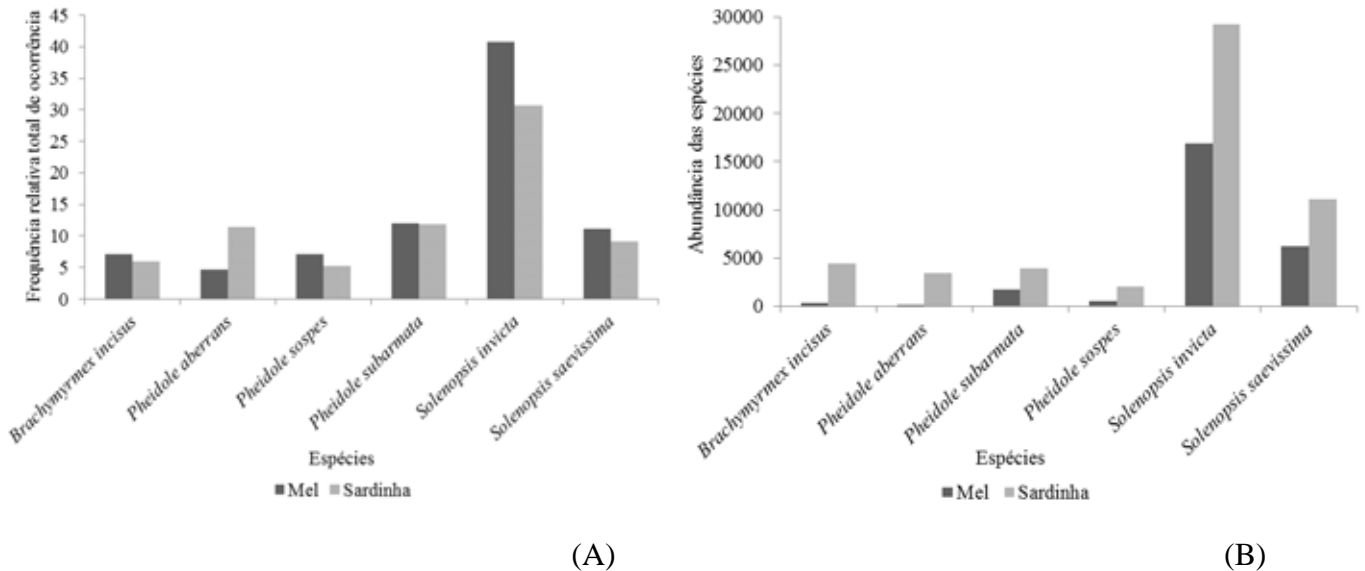
**Figura 4** – Espécies mais frequentes (A) e abundantes (B) nos parreirais infestados e não infestados do Estado de São Paulo.



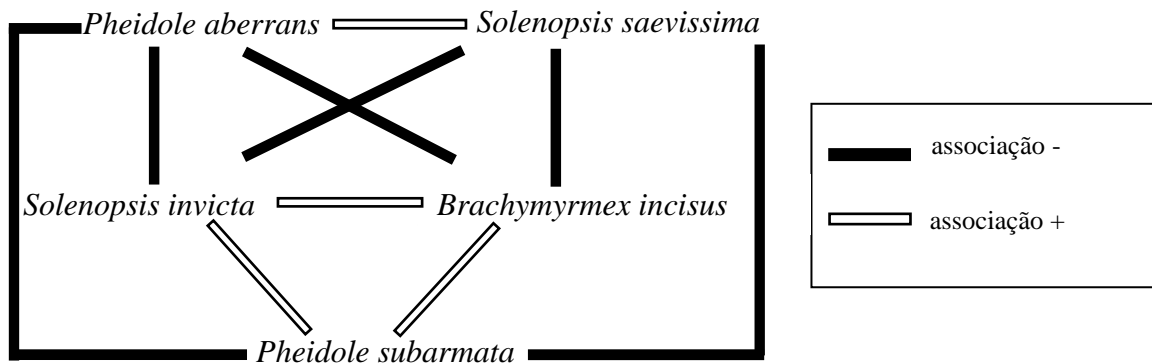
**Figura 5** – Espécies mais frequentes (A) e abundantes (B) nos parreirais do Estado de São Paulo de acordo com as estações seca e chuvosa.



**Figura 6** – Espécies mais frequentes (A) e abundantes (B) nos parreirais do Estado de São Paulo de acordo com as iscas de mel e sardinha.



**Figura 7** – Estrutura da comunidade de formigas nos parreirais do Estado de São Paulo, a partir da correlação de Spearman.



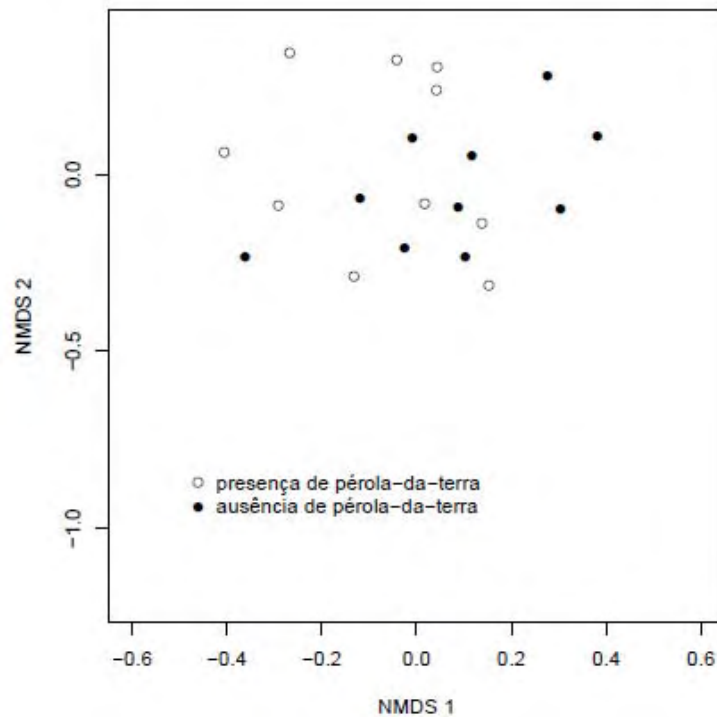
A presença da pérola-da-terra não influenciou a riqueza de formigas, em ambos os tipos de parreirais; a sazonalidade também não interferiu na riqueza de formicídeos e não foi observada preferência em relação às iscas (Tabela 2). Mediana e amplitude da variação foram descritas (Tabela 3). Também não houve diferença na riqueza de espécies entre os diferentes municípios (Kruskal-Wallis = 6,96;  $p = 0,13$ ); as espécies registradas em cada município estão na Tabela 4.

Os parreirais infestados pela pérola-da-terra não apresentaram diferença significativa em relação aos índices de diversidade ( $p > 0,05$ ) quando comparados aos parreirais não infestados (Tabela 1).

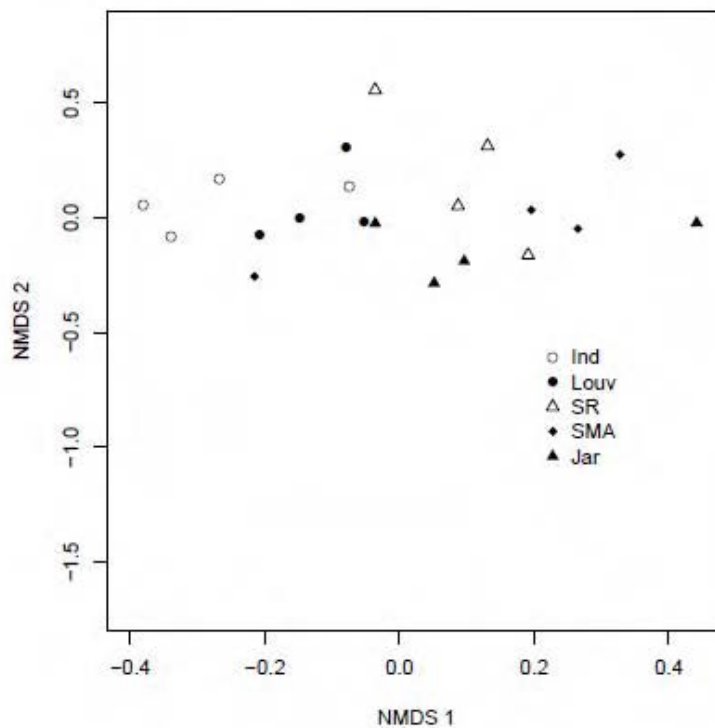
Em relação a análise faunística, as espécies *S. invicta* e *S. saevissima* foram muito abundantes, constantes, muito frequentes e dominantes tanto nos parreirais infestados como nos parreirais não infestados pela pérola-da-terra (Tabela 5).

As comunidades de formigas se apresentaram muito similares entre as estações seca e chuvosa, independentemente da presença da pérola-da-terra (Sorensen = 0,80) e entre as iscas de mel e sardinha (Sorensen = 0,88). Os parreirais infestados ou não infestados também foram similares (Sorensen = 0,82). A análise de composição corroborou esses dados em relação à presença da pérola-da-terra nos parreirais (Figura 8), sendo que também não houve diferença na composição da comunidade de formigas nos diferentes municípios amostrados (Figura 9).

**Figura 8** – Escalonamento Multidimensional Não Métrico (NMDS) para as propriedades com ou sem pérola-da-terra nos cinco municípios amostrados. Stress = 21,16. Anosim = R = 0,06; p = 0,14.



**Figura 9** – Escalonamento Multidimensional Não Métrico (NMDS) para as propriedades dos cinco municípios amostrados (Ind – Indaiatuba; Louv – Louveira; SR – São Roque; SMA – São Miguel Arcanjo; Jar – Jarinu). Stress = 17,97. Anosim = R = 0,07; p = 0,11.





**Tabela 1** – Frequência relativa de ocorrência (%) e abundância das espécies registradas em parreirais infestados ou não por *Eurhizococcus brasiliensis* no Estado de São Paulo, de acordo com as estações do ano e o tipo de isca.

| Subfamília/Espécies                           | Frequência relativa total nos parreirais | Parreirais infestados |             |             | Parreirais não infestados |              |              |              |              |
|---|--|-----------------------|-------------|-------------|---------------------------|--------------|--------------|--------------|--------------|
|   |  | Seca                  | Chuvosa     | Mel         | Sardinha                  | Seca         | Chuvosa      | Mel          | Sardinha     |
| <b>Dolichoderinae</b>                         |  |                       |             |             |                           |              |              |              |              |
| <i>Dorymyrmex</i> sp.1                        | 0,5                                      | 2,4 (55)              | -           | 1,3 (30)    | 0,5 (25)                  | -            | -            | -            | -            |
| <i>Linepithema neotropicum</i> Wild, 2007     | 5,2                                      | 1,2 (13)              | 2,3 (163)   | 1,8 (14)    | 2,2 (162)                 | 14,3 (1362)  | -            | 6,7 (757)    | 5,2 (605)    |
| <i>Linepithema gallardoi</i> (Brethes, 1914)  | 0,5                                      | -                     | 0,6 (1)     | 0,1 (1)     | -                         | 0,5 (2)      | 1,0 (6)      | 1,5 (6)      | 0,5 (2)      |
| <b>Ectoninae</b>                              |  |                       |             |             |                           |              |              |              |              |
| <i>Labidus coecus</i> (Latreille, 1802)*      | 0,8                                      | 3,6 (2336)            | -           | 1,9 (513)   | 1,5 (1823)                | -            | -            | -            | -            |
| <b>Ectatomminae</b>                           |  |                       |             |             |                           |              |              |              |              |
| <i>Ectatomma edentatum</i> Roger, 1863        | 2,6                                      | 2,4 (4)               | 5,2 (18)    | 3,8 (9)     | 3,9 (13)                  | 1,3 (5)      | 2,1 (7)      | 1,7 (4)      | 1,9 (8)      |
| <b>Formicinae</b>                             |  |                       |             |             |                           |              |              |              |              |
| <i>Brachymyrmex incisus</i> Forel, 1912       | 6,4                                      | 11,4 (891)            | 11,0 (3315) | 11,5 (257)  | 9,2 (3949)                | 3,0 (34)     | 2,6 (490)    | 2,6 (49)     | 2,6 (475)    |
| <i>Camponotus melanoticus</i> (Emery)         | 1,3                                      | 1,8 (10)              | -           | 0,6 (7)     | 0,5 (3)                   | 2,1 (28)     | 1,0 (34)     | 2,6 (52)     | 1,5 (10)     |
| <i>Nyländeria fulva</i> (Mayr, 1862)          | 5,2                                      | 5,4 (117)             | 2,9 (43)    | 2,5 (14)    | 4,4 (146)                 | 3,8 (547)    | 8,8 (1059)   | 0,4 (187)    | 5,7 (1419)   |
| <b>Myrmicinae</b>                             |  |                       |             |             |                           |              |              |              |              |
| <i>Crematogaster</i> sp.1                     | 0,5                                      | 1,2 (59)              | 0,6 (117)   | 0,6 (41)    | 9,0 (135)                 | 0,4 (1)      | -            | -            | 0,8 (1)      |
| <i>Pheidole aberrans</i> Mayr, 1868           | 9,1                                      | 12,6 (1453)           | 18,5 (1333) | 8,3 (55)    | 19,4 (2731)               | 2,5 (343)    | 5,7 (378)    | 0,9 (70)     | 3,4 (651)    |
| <i>Pheidole sospes</i> Forel, 1908            | 6,2                                      | 6,6 (566)             | 4,6 (428)   | 7,0 (251)   | 4,4 (743)                 | 8,4 (802)    | 4,6 (789)    | 7,3 (276)    | 6,0 (1315)   |
| <i>Pheidole</i> cf. <i>dione</i>              | 3,8                                      | 6,0 (123)             | 1,2 (30)    | 3,2 (39)    | 2,9 (114)                 | 5,1 (581)    | 2,6 (338)    | 4,7 (232)    | 3,4 (687)    |
| <i>Pheidole subarmata</i> Mayr 1884           | 11,2                                     | 11,4 (135)            | 21,4 (3578) | 14,6 (968)  | 16,5 (2882)               | 6,8 (612)    | 7,2 (730)    | 9,4 (716)    | 7,2 (1045)   |
| <i>Pheidole</i> sp.50                         | 0,5                                      | -                     | 1,7 (156)   | -           | 1,5 (19)                  | 0,4 (2)      | -            | -            | 0,4 (2)      |
| <i>Pheidole</i> sp.51                         | 0,4                                      | -                     | -           | -           | -                         | 1,3 (80)     | -            | 0,4 (16)     | 0,8 (64)     |
| <i>Solenopsis invicta</i> Buren, 1972         | 32,8                                     | 23,4 (3152)           | 16,8 (8239) | 32,5 (3533) | 22,3 (7464)               | 37,1 (14998) | 50,0 (20539) | 48,9 (13412) | 39,2 (21796) |
| <i>Solenopsis saevissima</i> (Smith F., 1855) | 12,6                                     | 10,8 (2958)           | 13,3 (3762) | 10,2 (1306) | 9,2 (5807)                | 12,2 (5271)  | 13,9 (4658)  | 12,0 (4901)  | 9,1 (5345)   |

| Subfamília/Espécies                            | Frequência<br>relativa total nos<br>parreirais | Parreirais infestados |         |     |          | Parreirais não infestados |         |         |          |
|--|--|-----------------------|---------|-----|----------|---------------------------|---------|---------|----------|
|  |  | Seca                  | Chuvosa | Mel | Sardinha | Seca                      | Chuvosa | Mel     | Sardinha |
| <i>Tetramorium</i> sp.1                        | 0,1  | -                     | -       | -   | -        | 0,4 (1)                   | -       | 0,4 (4) | -        |
| <b>Ponerinae</b>                               |  |                       |         |     |          |                           |         |         |          |
| <i>Odontomachus chelifer</i> (Latreille, 1802) | 0,1  | -                     | -       | -   | -        | 0,4 (1)                   | -       | 0,4 (1) | -        |
| <i>Pachycondyla</i> sp.1                       | 0,1  | -                     | -       | -   | 0,5 (2)  | -                         | 0,5 (2) | -       | 12,1 (2) |
| Total de espécies                              | 20   | 14                    | 13      | 15  | 16       | 17                        | 12      | 15      | 16       |
| Shannon Index (H')                             |  |                       | 1,85    |     |          |                           |         | 1,17    |          |
| Evenness (E)                                   |  |                       | 0,68    |     |          |                           |         | 0,41    |          |
| Simpson Index (D)                              |  |                       | 0,2     |     |          |                           |         | 0,47    |          |

\*- espécie criptobiótica (PACHECO; VASCONCELOS, 2012).

**Tabela 2** – Riqueza e (abundância total) e teste de Mann-Whitney por parreiral infestado ou não de acordo com a estação do ano e o tipo de isca.

| Riqueza e (abundância) | Parreirais  |                | Teste de Mann-Whitney (riqueza) |      | Teste de Mann-Whitney (abundância) |      |
|------------------------|-------------|----------------|---------------------------------|------|------------------------------------|------|
|                        | Infestados  | Não infestados | U =                             | p =  | U =                                | p =  |
| Total                  | 16 (32,855) | 18 (54,112)    | 199,5                           | 0,49 | 199,00                             | 0,48 |
| Estação seca           | 14 (11,872) | 17 (24,660)    | 191,0                           | 0,40 | 196,00                             | 0,45 |
| Estação chuvosa        | 13 (21,183) | 13 (29,033)    | 188,5                           | 0,37 | 193,50                             | 0,43 |
| Mel                    | 15 (7,175)  | 15 (21,102)    | 180,0                           | 0,49 | 192,50                             | 0,41 |
| Sardinha               | 17 (26,016) | 17 (33,427)    | 171,0                           | 0,39 | 183,00                             | 0,32 |

**Tabela 3** – Mediana e amplitude para riqueza e abundância das espécies nos parreirais infestados e não infestados com a pérola-da-terra de acordo com as estações e tipo de iscas analisadas.

| Variáveis       | Parreirais Infestados |                       | Parreirais Não infestados |                       |
|-----------------|-----------------------|-----------------------|---------------------------|-----------------------|
|                 | riqueza               | abundância            | riqueza                   | abundância            |
| Estação seca    | 9,0 (2,0 – 39,0)      | 123,0 (13,0 – 3152,0) | 6,0 (1,0 – 88,0)          | 80,0 (1,0 – 14988,0)  |
| Estação chuvosa | 8,0 (1,0 – 37,0)      | 163,0 (1,0 – 8239,0)  | 5,0 (2,0 – 97,0)          | 358,0 (2,0 – 20539,0) |
| Mel             | 5,0 (1,0 – 51,0)      | 48,0 (1,0 – 3533,0)   | 6,0 (1,0 – 114,0)         | 128,5 (6,0 – 13412,0) |
| Sardinha        | 6,0 (1,0 – 46,0)      | 162,0 (3,0 – 7464,0)  | 9,0 (1,0 – 104,0)         | 540,0 (1,0 – 21796,0) |

**Tabela 4** – Espécies amostradas nos parreirais infestados e não infestados em cada município amostrado no Estado de São Paulo: Indaiatuba, Louveira, São Roque, São Miguel Arcanjo e Jarinu.

| Subfamília/Espécies                           | Municípios/Parreirais |                |            |                |            |                |                    |                |            |                |
|---|-----------------------|----------------|------------|----------------|------------|----------------|--------------------|----------------|------------|----------------|
|   | Indaiatuba            |                | Louveira   |                | São Roque  |                | São Miguel Arcanjo |                | Jarinu     |                |
|   | Infestados            | Não infestados | Infestados | Não infestados | Infestados | Não infestados | Infestados         | Não infestados | Infestados | Não infestados |
| <b>Dolichoderinae</b>                         |                       |                |            |                |            |                |                    |                |            |                |
| <i>Dorymyrmex</i> sp.1                        | X                     | -              | -          | -              | -          | -              | -                  | -              | -          | -              |
| <i>Linepithema neotropicum</i> Wild, 2007     | -                     | -              | -          | X              | X          | X              | X                  | X              | X          | X              |
| <i>Linepithema gallardoii</i> (Brethes, 1914) | -                     | -              | X          | X              | -          | -              | -                  | -              | -          | -              |
| <b>Ectoninae</b>                              |                       |                |            |                |            |                |                    |                |            |                |
| <i>Labidus coecus</i> (Latreille, 1802)       | -                     | -              | -          | -              | -          | -              | X                  | -              | -          | -              |
| <b>Ectatomminae</b>                           |                       |                |            |                |            |                |                    |                |            |                |
| <i>Ectatomma edentatum</i> Roger, 1863        | X                     | X              | X          | X              | -          | X              | X                  | -              | X          | X              |
| <b>Formicinae</b>                             |                       |                |            |                |            |                |                    |                |            |                |
| <i>Brachymyrmex incisus</i> Forel, 1912       | X                     | X              | X          | X              | X          | X              | X                  | -              | X          | X              |
| <i>Camponotus melanoticus</i> (Emery)         | X                     | X              | -          | X              | -          | -              | -                  | -              | -          | X              |
| <i>Nylanderia fulva</i> (Mayr, 1862)          | X                     | X              | -          | -              | X          | X              | X                  | -              | X          | X              |
| <b>Myrmicinae</b>                             |                       |                |            |                |            |                |                    |                |            |                |
| <i>Crematogaster</i> sp.1                     | X                     | -              | -          | -              | -          | -              | -                  | -              | -          | -              |
| <i>Pheidole aberrans</i> Mayr, 1868           | X                     | X              | X          | X              | X          | X              | X                  | X              | X          | X              |
| <i>Pheidole sospes</i> Forel, 1908            | X                     | X              | X          | X              | X          | X              | X                  | X              | X          | X              |
| <i>Pheidole</i> cf. <i>dione</i>              | X                     | X              | X          | X              | -          | -              | X                  | X              | X          | X              |
| <i>Pheidole subarmata</i> Mayr 1884           | X                     | X              | X          | X              | X          | -              | -                  | X              | -          | -              |
| <i>Pheidole</i> sp.50                         | -                     | X              | -          | -              | -          | -              | -                  | X              | -          | -              |
| <i>Pheidole</i> sp.51                         | -                     | X              | -          | -              | -          | -              | -                  | -              | -          | X              |
| <i>Solenopsis invicta</i> Buren, 1972         | X                     | X              | X          | X              | -          | X              | -                  | -              | -          | X              |
| <i>Solenopsis saevissima</i> (Smith F., 1855) | -                     | X              | -          | -              | -          | X              | -                  | -              | X          | X              |
| <i>Tetramorium</i> sp.1                       | -                     | X              | -          | -              | -          | -              | -                  | -              | -          | -              |

**Municípios/Parreirais**

| Subfamília/Espécies                            | Indaiatuba |                | Louveira   |                | São Roque  |                | São Miguel Arcanjo |                | Jarinu     |                |
|--|------------|----------------|------------|----------------|------------|----------------|--------------------|----------------|------------|----------------|
|  | Infestados | Não infestados | Infestados | Não infestados | Infestados | Não infestados | Infestados         | Não infestados | Infestados | Não infestados |
| <b>Ponerinae</b>                               |            |                |            |                |            |                |                    |                |            |                |
| <i>Odontomachus chelifer</i> (Latreille, 1802) | -          | X              | -          | -              | -          | -              | -                  | -              | -          | -              |
| <i>Pachycondyla</i> sp.1                       | -          | -              | -          | X              | -          | -              | -                  | -              | -          | -              |

**Tabela 5** – Análise faunística das espécies amostradas em parreirais infestados e não infestados no Estado de São Paulo.

| Subfamília/Espécies                           | Parreirais Infestados |            |            | Parreirais Não Infestados |            |            |            |
|---|-----------------------|------------|------------|---------------------------|------------|------------|------------|
|   | Abundância            | Constância | Frequência | Abundância                | Constância | Frequência | Dominância |
| <b>Dolichoderinae</b>                         |                       |            |            |                           |            |            |            |
| <i>Dorymyrmex</i> sp.1                        | r                     | y          | pf         | -                         | -          | -          | -          |
| <i>Linepithema neotropicum</i> Wild, 2007     | a                     | w          | pf         | ma                        | y          | pf         | nd         |
| <i>Linepithema gallardoi</i> (Brethes, 1914)  | r                     | y          | pf         | r                         | w          | pf         | nd         |
| <b>Ecitoninae</b>                             |                       |            |            |                           |            |            |            |
| <i>Labidus coecus</i> (Latreille, 1802)       | ma                    | y          | mf         | -                         | -          | -          | -          |
| <b>Ectatomminae</b>                           |                       |            |            |                           |            |            |            |
| <i>Ectatomma edentatum</i> Roger, 1863        | r                     | w          | pf         | r                         | w          | pf         | nd         |
| <b>Formicinae</b>                             |                       |            |            |                           |            |            |            |
| <i>Brachymyrmex incisus</i> Forel, 1912       | ma                    | w          | mf         | ma                        | w          | pf         | nd         |
| <i>Camponotus melanoticus</i> (Emery)         | r                     | y          | pf         | r                         | w          | pf         | nd         |
| <i>Nylanderia fulva</i> (Mayr, 1862)          | r                     | w          | pf         | ma                        | w          | mf         | nd         |
| <b>Myrmicinae</b>                             |                       |            |            |                           |            |            |            |
| <i>Crematogaster</i> sp.1                     | a                     | w          | pf         | r                         | y          | pf         | nd         |
| <i>Pheidole aberrans</i> Mayr, 1868           | ma                    | w          | mf         | ma                        | w          | pf         | nd         |
| <i>Pheidole sospes</i> Forel, 1908            | ma                    | w          | mf         | ma                        | w          | mf         | nd         |
| <i>Pheidole</i> cf. <i>dione</i>              | r                     | w          | pf         | ma                        | w          | pf         | nd         |
| <i>Pheidole subarmata</i> Mayr 1884           | ma                    | w          | mf         | ma                        | w          | pf         | nd         |
| <i>Pheidole</i> sp.50                         | di                    | y          | pf         | ma                        | w          | pf         | nd         |
| <i>Pheidole</i> sp.51                         | -                     | -          | -          | r                         | y          | pf         | nd         |
| <i>Solenopsis invicta</i> Buren, 1972         | ma                    | w          | mf         | ma                        | w          | mf         | d          |
| <i>Solenopsis saevissima</i> (Smith F., 1855) | ma                    | w          | mf         | ma                        | w          | mf         | d          |
| <i>Tetramorium</i> sp.1                       | -                     | -          | -          | r                         | w          | pf         | nd         |
| <b>Ponerinae</b>                              |                       |            |            |                           |            |            |            |

| Subfamília/Espécies                            | Parreirais Infestados |            |            |            | Parreirais Não Infestados |            |            |            |
|--|-----------------------|------------|------------|------------|---------------------------|------------|------------|------------|
|  | Abundância            | Constância | Frequência | Dominância | Abundância                | Constância | Frequência | Dominância |
| <i>Odontomachus chelifer</i> (Latreille, 1802) | -                     | -          | -          | -          | r                         | y          | pf         | nd         |
| <i>Pachycondyla</i> sp.1                       | -                     | -          | -          | -          | r                         | y          | pf         | nd         |

r = rara; di = dispersa; a = abundante; ma = muito abundante; w = constante; y = acessória; pf = pouco frequente; mf = muito frequente; d = dominante; nd = não dominante.

No que diz respeito às formigas-cortadeiras foram identificadas *Atta sexdens rubropilosa* Forel, 1908, nos ninhos encontrados nos parreirais em Indaiatuba e São Roque e *Acromyrmex crassispinus* (Forel, 1909) em um ninho de Jarinu.



## 4 DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

Este estudo é pioneiro no Brasil a diagnosticar as espécies de formigas em parreirais com e sem a infestação por *Eurhizococcus brasiliensis* nas distintas estações do ano e os resultados obtidos não suportaram a hipótese de que a presença da cochonilha poderia interferir nas comunidades de formigas, tão pouco na predominância de espécies. Diferentemente do Estado do Rio Grande do Sul, onde *Linepithema micans* é dominante e transporta ninfas da pérola-da-terra nos parreirais infestados (NONDILLO et al., 2010a), no Sudeste do Estado de São Paulo a prevalência foi de *Solenopsis invicta*, independentemente da presença da cochonilha.

Apesar dessa dominância, várias espécies registradas como *S. saevissima*, *Ectatomma edentatum*, *Brachymyrmex incisus* e *Nylanderia fulva* também já foram encontradas em trabalhos realizados em outros cultivos como eucalipto (SOARES et al., 1998), cana-de-açúcar (ROSSI; FOWLER, 2004; SOUZA et al., 2010) e café (DIAS et al., 2008), o que sugere um padrão de ocorrência de espécies de formigas em monoculturas. A homogeneidade e o baixo número de espécies encontradas quando comparados a ambientes naturais (como nos trabalhos de Pacheco e Vasconcelos, 2012 e Silvestre et al., 2012) está relacionada ao fato de que os sistemas agrícolas são estáveis (CHONG et al., 2011), onde a oferta de recursos é uniforme e a composição florística baixa, o que não oferece muitos nichos às espécies.

Foi observado também similaridade na composição da comunidade e na riqueza de espécies entre os diferentes municípios amostrados, ou seja, a proximidade entre as regiões estudadas provavelmente conferem a elas condições abióticas similares, o que pode ter determinado composição similar das espécies de formigas nos parreirais independentemente da localidade. Somado a isso, já foi observado que na região tropical a riqueza de espécies de formigas diminui em ambientes homogêneos como as monoculturas (MATOS et al., 1994; FONSECA; DIEHL, 2004). Armbrrecht et al. (2005) e Philpott et al. (2008), por exemplo, observaram perda da biodiversidade com a intensificação da agricultura em plantações de café na região Neotropical.

Apesar da relação mutualística existente entre formigas e cochonilhas (DELABIE; FERNÁNDEZ, 2003), que poderia servir como um atrativo para as espécies de formigas, a presença da pérola-da-terra nos parreirais não contribuiu para uma maior riqueza desses insetos (Tabela 1).

Em contrapartida, estudos em parreirais de outras regiões do Brasil ou até mesmo em outros países revelaram uma riqueza maior de espécies. Na região Sul do País, Sacchet et al.

(2009) identificaram 41 espécies de formigas utilizando armadilhas do tipo ‘pitfall’ e subterrânea em 2 parreirais. Rosado et al. (2012) coletaram 72 espécies em 3 parreirais, também com armadilhas ‘pitfall’. Nondillo (2013) registrou 28 espécies, utilizando a mesma metodologia do presente estudo, embora tenha amostrado 55 parreirais. Já na África do Sul, Addison e Samways (2000), utilizando armadilha do tipo ‘pitfall’ e isca de sardinha encontraram 42 espécies em 22 parreirais e Chong et al. (2011), a partir de armadilhas ‘pitfall’ diagnosticaram 148 espécies de formigas em 50 parreirais da Austrália. Essa diferença na riqueza de espécies pode estar relacionada com o número de parreirais amostrados, que foi maior em praticamente todos os trabalhos citados comparados ao presente estudo, como também ao tipo de armadilha utilizada. Segundo Bestelmeyer et al. (2000), o uso de armadilha do tipo ‘pitfall’ é mais eficaz em virtude do tempo de permanência no campo que permite a coleta de um maior número de espécies.

Todavia, deve ser considerado também que a maior parte dos parreirais amostrados são mantidos sem a utilização de uma cobertura vegetal, fato este que deixa o solo permanentemente exposto. Considerando que a utilização de inseticidas também pode contribuir com a redução da riqueza de espécies (RAMOS et al., 2003), especificamente neste trabalho, foi detectado o uso intenso de inseticidas pelos agricultores da região de estudo (observação pessoal), o que pode ter influenciado na riqueza de espécies.

*Pheidole* e *Solenopsis* foram dominantes nos cultivares de uva estudados, da mesma forma que são em plantações de cacau, eucalipto, cana-de-açúcar, café (DELABIE; FOWLER, 1995; SOARES et al., 1998; ROSSI; FOWLER, 2004; DIAS et al., 2008), inclusive em cultivo onde o manejo é conservacionista (MENTONE et al., 2009). Espécies desses gêneros estão entre as mais amplamente distribuídas e frequentes na região Neotropical (JAFFÉ, 1993; WILSON, 2003) e ocorrem em diversos tipos de ambientes, onde atuam como predadoras generalistas (BRANDÃO et al., 2009).

Dentre as espécies de *Solenopsis*, *S. invicta* ocasiona grandes prejuízos à agricultura (BANKS et al., 1990), também pelo fato de se associar a cochonilhas (VINSON; SCARBOROUGH, 1991). Entretanto, a espécie também já foi registrada predando a principal praga da cana-de-açúcar, *Diatraea saccharalis* (Fabricius, 1794) (REAGAN, 1986; ROSSI; FOWLER, 2004; BEUZELIN et al., 2009).

*S. invicta* pertence ao complexo *S. saevissima*, um grupo primariamente Neotropical, cujos membros são conhecidos por “fire ants” (ou formigas de fogo), que inclui *S. saevissima* entre outras. *S. invicta* é nativa da América do Sul e possui grande capacidade de dispersão e de dominar diferentes tipos de habitats, ocasionando redução da biodiversidade (BUENO;

CAMPOS-FARINHA, 1999; COOK, 2003) e homogeneização da fauna local (CALCATERRA, 2008), especialmente em ambientes alterados pela atividade humana. Áreas infestadas por *S. invicta* apresentam redução de espécies de formigas e de outros artrópodes (NICHOLS; SITES, 1989; PORTER; SAVIGNANO, 1990; MORRIS; STEIGMAN, 1993; CALLCOTT et al., 2000; ALLEN et al., 2001). Isso é favorecido pela sua agressividade na defesa da colônia e dominância da fonte de alimento, podendo também passar longos períodos em escassez de alimento, além de competir com outras espécies de formigas em razão de um forte sistema de recrutamento em massa (FOWLER et al., 1991; DELABIE; FOWLER, 1995; TSCHINKEL, 1998; SOLLEY et al., 2002). Ademais, essa espécie pode ter maior facilidade de colonização em ambientes abertos como as monoculturas, em virtude da incidência direta da radiação solar no solo, o que permite o crescimento mais rápido da colônia (ALMEIDA et al., 2007). Essas características conferem a *S. invicta* o “status” de uma das principais formigas invasoras conhecidas no mundo (VINSON; GREENBERG, 1986; GLOBAL INVASIVE SPECIES DATABASE, 2010; GUSMÃO et al., 2010), estando listada entre as 100 piores espécies invasivas do mundo, sendo provavelmente a formiga invasora melhor conhecida, já que é uma praga que ao mesmo tempo afeta os interesses humanos e é também uma ameaça significativa para várias comunidades nativas (HOLWAY et al., 2002; LOWE et al., 2004).

O “honeydew”, produzido por hemípteros de maneira geral, pode ser importante na dieta de *S. invicta* (HELMS; VINSON, 2002). Na região Sudeste dos Estados Unidos, o “honeydew” produzido por uma cochonilha aérea invasora (*Antonina graminis* Maskell – cochonilha do capim) fornece de 16 a 48% da energia nutricional utilizada pelas colônias de *S. invicta*, permitindo o crescimento da colônia e o aumento da população (CHADA; WOOD, 1960; HELMS; VINSON, 2002; HELMS; VINSON, 2008). Entretanto, de acordo com os nossos resultados, não é isso que deve ocorrer com *S. invicta* em relação a pérola-da-terra nos parreirais do Estado de São Paulo.

De acordo com a distribuição proposta por Pitts (2002), não há registro de ocorrência de *S. invicta* na região de estudo. Entretanto, Martins et al. (2012b) verificaram que sua distribuição está se expandindo na região Sudeste do Brasil; o que é corroborado pela alta frequência dessa Solenopsidini nos parreirais. Dessa forma, devido a ampliação da área de distribuição, abrangendo inclusive os principais municípios produtores de uva do Estado de São Paulo, a presença dessa espécie não deve estar relacionada a presença de *E. brasiliensis* e sim à sua capacidade invasora, mesmo que apresente associação com cochonilhas em outras regiões (VINSON; SCARBOROUGH, 1991). Esse fato é reforçado no presente estudo pela

frequência semelhante de *S. invicta* nas iscas de mel e de sardinha, ou seja, suas populações não têm aumentado devido a oferta de alimento açucarado fornecido pelas cochonilhas na região dos parreirais.

Diante de sua alta capacidade de invasão, *S. invicta* apresentou associação negativa com outras espécies nos parreirais, especialmente com *S. saevissima*. Em cultivos de sorgo, feijão e milho (MENTONE et al., 2009) e cana de açúcar (OLIVEIRA et al., 2012), localizados na região leste do Estado de São Paulo, apenas *S. saevissima* foi registrada. Como já descrito, essas espécies pertencem ao mesmo grupo (complexo *S. saevissima*) possuindo comportamento semelhante. Segundo Martins et al. (2012b), a expansão de *S. invicta* no Sudeste brasileiro está resultando na invasão da área de distribuição de *S. saevissima*; fato que também pode estar ocorrendo na região onde este trabalho foi conduzido.

Outras espécies de formigas como *Pheidole aberrans*, *Pheidole subarmata* e *Brachymyrmex incisus* também foram frequentes nos parreirais infestados, principalmente na estação chuvosa. Como nessa estação há predominância de ninfas da pérola-da-terra no Estado de São Paulo (SCHMIDT et al., 2013) e espécies desses gêneros de formigas se associam a *E. brasiliensis* (SORIA et al., 1997), é importante entender as associações biológicas entre esses táxons, visando o controle de dispersão de *E. brasiliensis* no Estado de São Paulo.

O comportamento de busca ao “honeydew” liberado pela pérola-da-terra pode ser um fator de dispersão de *E. brasiliensis* pelas formigas na região Sul do Brasil (NONDILLO et al., 2010a), mas deve ser melhor estudado para os parreirais da região Sudeste. Neste contexto, deve ser avaliada também a influência de fatores relacionados ao próprio manejo do cultivo, como por exemplo, o uso de mudas já contaminadas pela cochonilha. Aliado a essas informações, nos cultivos de uva estudados houve o registro de *L. neotropicum*, que até o momento, é encontrada em ambientes conservados da Mata Atlântica brasileira (FERNANDES et al., 2012; MORINI et al., 2012; FIGUEIREDO et al., 2013), o que pode indicar que essa espécie apresenta capacidade de adaptação a mudanças ambientais.

De acordo com os resultados apresentados neste Capítulo, pode-se concluir que a presença da pérola-da-terra não é um fator que influencia a composição das comunidades de formigas e a prevalência de determinadas espécies nos parreirais do Estado de São Paulo, diferente do que foi observado por Nondillo et al. (2010a, 2010b) em parreirais no Rio Grande do Sul. Apesar disso, trabalhos que envolvam a interação da cochonilha com os táxons de maior frequência neste estudo: *P. aberrans*, *P. subarmata*, *B. incisus* e também *S. invicta*,

poderão elucidar se estes táxons podem atuar na dispersão de ninfas da pérola-da-terra no Estado de São Paulo.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADDISON, P.; SAMWAYS, M. J. A survey of ants (Hymenoptera: Formicidae) foraging in Western Cape vineyards of South Africa. **African Entomology**, v. 8, n. 2, p. 251-260, 2000.
- AHRENS, M.E.; ROSS, K.G.; SHOEMAKER, D.D. Phylogeographic structure of the fire ant *Solenopsis invicta* in its native South American range: roles of the natural barriers and habitat connectivity. **Evolution**, v. 59, p. 1733-1743, 2005.
- ALLEN, C. R.; LOCKLEY, R. S. T; PHILLIPS, J. R. S. A; DEMARIAS, S. The non-indigenous ant, *Solenopsis invicta*, reduces loggerhead shrike and native insect abundance. **Journal Agricola of Economic Entomology**, v.18, p. 249-259, 2001.
- ALMEIDA, F. S.; QUEIROZ, J. M.; MAYHÉ-NUNES, A.J. Distribuição e abundância de ninhos de *Solenopsis invicta* Buren (Hymenoptera: Formicidae) em um agroecossistema diversificado sob manejo orgânico. **Floresta e Ambiente**, v. 14, n. 1, p. 33-43, 2007.
- ARMBRECHT, I.; RIVERA, L.; PERFECTO, I. Reduced Diversity and Complexity in the Leaf-Litter Ant Assemblage of Colombian Coffee Plantations. **Conservation Biology**, v. 19, n. 3, p. 897-907, 2005.
- AYRES, M.; JUNIOR, M. A.; AYRES, D. L.; SANTOS, A. A. S. **BioEstat: Aplicações Estatísticas nas Áreas das Ciências Bio-Médicas**. Belem, PA: Instituto de Desenvolvimento Sustentavel Mamiraua, 2007. 380 p.
- BANKS, W. A.; ADAMS, C.T.; LOFGREN, C.S.; WOJCIK, D.P. Imported fire ant infestation of soybean fields in the southern United States. **Florida Entomologist**, v. 73, p. 503-504, 1990.
- BESTELMEYER, B. T.; AGOSTI, D.; LEEANNE, F.; ALONSO, T.; BRANDÃO, C. R. F.; BROWN, W. L.; DELABIE, J. H. C.; SILVESTRE, R. Field techniques for the study of ground-living ants: An Overview, description, and evaluation. In: Agosti, D.; Majer, J. D.; Tennant, A.; Schultz, T. (Eds). **Ants: standart methods for measuring and monitoring biodiversity**. Washington: Smithsonian Institution Press, 2000, p. 122-144.
- BEUZELIN, J. M.; REAGAN, T.E.; AKBAR, W.; CORMIER, H.J.; FLANAGAN, J.W.; BLOUIN, D. C. Impact of hurricane Rita storm surge on sugarcane borer (Lepidoptera: Cambridae) management in Louisiana. **Journal of Economic Entomology**, v. 102, p. 1054-1061, 2009.

BODENHEIMER, F. S. **Precis Décologie Animale**. Paris: Payot, 1955. 315 p.

BOLTON, B. AntWeb: Ants of Bolton World Catalog. Disponível em: <<http://www.antweb.org/world.jsp>>. 2013.

BOTTON, M.; HICKEL, E.R.; SORIA, S.J.; SCHUCK, E. 2005. Pérola-da-terra *Eurhizococcus brasiliensis* (Hemiptera: Margarodidae) na cultura da videira: medidas para evitar a dispersão e manejo em áreas infestadas. In: **Reunião Sul-Brasileira Sobre Pragas de Solo**, 2005. p. 43-48.

BOTTON, M.; SCHUCK, E.; SORIA, S.J.; HICKEL, E.R. **Manejo de pragas na cultura da videira**. Capacitação Técnica em Viticultura. Embrapa Uva e Vinho. 2008.

BRANDÃO, C. R. F.; SILVA, R. R.; DELABIE, J. H. C. Formigas (Hymenoptera). In: Panizzi AR, Parra JRP. **Bioecologia e nutrição de insetos – Base para o manejo integrado de pragas**. Embrapa Informação Tecnológica. 2009.

BUENO, O. C.; CAMPOS-FARINHA, A. E. C. As Formigas Domésticas. In: Mariconi, F.A.M. **Insetos e outros invasores de residências**. Piracicaba, SP: FEALQ, 1999.

CALCATERRA, L. A.; LIVORE, J. P.; DELGADO, A.; BRIANO, J. A. Ecological dominance of the red imported fire ant, *Solenopsis invicta*, in its native range. **Oecologia**, v. 156, p. 411-421, 2008.

CALLCOTT, D. H. O. I.; COLLINS, H.L.; WILLIAMS, D.F.; LOCKLEY, T. C. Seasonal studies of an isolated red imported fire ant (Hymenoptera: Formicidae) population in eastern Tennessee. **Environmental Entomology**, v. 29, p. 788-794, 2000.

CHADA, H. L.; WOOD, E. A. Biology and control of the rhodesgrass scale. **US Department of Agriculture Technical Bulletin**, v. 1221, p. 1–21, 1960.

CHONG, C. S.; HOFFMANN, A. A.; THOMSON, L. J. Local-scale spatial dynamics of ants in a temperate agroecosystem. **Austral Ecology**, v.36, p. 413–424, 2011.

CIAGRO. **Centro integrado de informações agrometeorológicas - Portal do governo do Estado de São Paulo**. Disponível em: <<http://www.ciiagro.sp.gov.br/ciiagroonline>>. Acesso em: 18 jan 2013.

CLARKE, K. R. 1993. Non-parametric multivariate analysis of changes in community structure. **Australian Journal of Ecology**, v. 18, p.117-143, 1993.

COOK, J. L. Conservation of biodiversity in an area impacted by the red imported fire ant, *Solenopsis invicta* (Hymenoptera: Formicidae). **Biodiversity and Conservation**, v. 12, p. 187–195, 2003.

DELABIE, J. H. C.; FERNÁNDEZ, F. Relaciones entre hormigas y “homópteros” (Hemiptera: Sternorrhyncha y Auchenorrhyncha). In: Fernández F. pp. 181-197. **Introducción a las hormigas de la región Neotropical**. Colombia: Instituto de Investigación de Recursos Biológicos Alexander von Humboldt, 2003.

DELABIE, J. H. C.; FOWLER, H. C. Soil and litter cryptic ant assemblages of Bahian cocoa plantations. **Pedobiologia**, v. 39, p. 423-433, 1995.

DELABIE, J. H. C.; JAHYNY, B.; NASCIMENTO, I. C.; MARIANO, C. S. F.; LACAU, S.; CAMPIOLO, S.; PHILPOTT, S. M.; LEPONCE, M. Contribution of cocoa plantations to the conservation of native ants (Insecta: Hymenoptera: Formicidae) with a special emphasis on the Atlantic Forest fauna of southern Bahia, Brasil. **Biodiversity Conservation**, v. 16, p. 2359-2384, 2007.

DELABIE, J. H. C. Trophobiosis Between Formicidae and Hemiptera (Sternorrhyncha and Auchenorrhyncha): an Overview. **Neotropical Entomology**, v. 30, p. 501-516, 2001.

DIAS, N. S.; ZANETTI, R.; SANTOS, M. S.; LOUZADA, J.; DELABIE, J. Interação de fragmentos florestais com agroecossistemas adjacentes de café e pastagem: repostas das comunidades de formigas (Hymenoptera, Formicidae). **Iheringia Série Zoológica**, v. 98, n. 1, p. 136-142, 2008.

FAZOLIN, M. **Análise faunística de insetos coletados com armadilha luminosa em seringueira no Acre**. 1991. 236p. Tese (Doutorado) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1991.

FERNANDES, T. T.; SILVA, R. R.; SOUZA, D. R.; ARAÚJO, N.; MORINI, M. S. C. Undecomposed twigs in the leaf litter as nest-building resources for ants (Hymenoptera: Formicidae) in áreas of the atlantic forest in the southeastern region of Brazil. **Psyche**, v. 1, n.12, 2012.

FIGUEIREDO, C. J.; SILVA, R. R.; MUNHAE, C. B.; MORINI, M. S. C. Fauna de formigas (Hymenoptera: Formicidae) atraídas a armadilhas subterrâneas em áreas de Mata Atlântica. **Biota Neotropica**, v. 13, p. 1-7, 2013.



FOLGARAIT, P. J. Ant biodiversity and its relationship to ecosystem functioning: a review. **Biodiversity Conservation**, v. 7, p. 1221–1244, 1998.

FONSECA, R. C.; DIEHL, E. Riqueza de formigas (Hymenoptera: Formicidae) epigéicas em povoamentos de *Eucalyptus* spp. (Myrtaceae) de diferentes idades no Rio Grande do Sul, Brasil. **Revista Brasileira de Entomologia**, v. 48, n. 1, p. 95-100, 2004.

FOWLER, H. G. L.; FORTI, C.; BRANDÃO, C. R. F.; DELABIE, J. H. C.; VASCONCELOS, H. L. Ecologia nutricional de formigas. In: PAZZINI, A. R.; PARRA, J. R. P. **Ecologia nutricional de insetos e suas implicações no manejo de pragas**. São Paulo: Manole, 1991. p. 131-209.

GLOBAL INVASIVE SPECIES DATABASE. *Solenopsis invicta*, 2010. Disponível em: <<http://www.issg.org/database/species/ecology.asp?si=77&fr=1&sts=tss&lang=EN>>. Acesso em 18 fev 2013.

GUSMÃO, F. A.; HARAKAVA, R.; CAMPOS, A. E. C. Fire-Ants of the *Solenopsis saevissima* Species-Group (Hymenoptera: Formicidae) Nesting in Parks in the city of São Paulo: Identification Based on mtDNA Sequences and Morphological Characters. **Sociobiology**, v. 56, n. 2, p. 353-362, 2010.

HAJI, F. N. P.; LIMA, M. P. L.; ALENCAR, J. A.; BARBOSA, F. R.; FERREIRA, R. C. F.; MATTOS, M. A. A. Cochonilha Pérola-da-Terra: Praga Emergente na Cultura da Uva, no Submédio do Vale do São Francisco. **Embrapa Semi-Árido: Circular Técnica**, Petrolina, v. 78, p.8, 2004.

HEBERT, P. D. N.; CYWINSKA, A.; BALL, S. L.; DEWAARD, J. R. Biological identifications through DNA barcodes. **Proceedings of the Royal Society of London Series B: Biological Sciences**, v. 270, p. 313–321, 2003a.

HEBERT, P. D. N.; RATNASINGHAM, S.; DEWAARD, J. R. Barcoding animal life: cytochrome c oxidase subunit divergences among closely related species. **Proceedings of the Royal Society of London Series B: Biological Sciences**, v. 270, p. S596–S599, 2003b.

HELMS, K. R.; VINSON, S. B. Plant resources and colony growth in an invasive ant: the importance of honeydewproducing Hemiptera in carbohydrate transfer across trophic levels. **Environmental Entomology**, v. 37, p. 487–493, 2008.

HELMS, K. R.; VINSON, S. B. Widespread association of the invasive ant *Solenopsis invicta* with an invasive mealybug. **Ecology**, v. 83, n. 9, p. 2425–2438, 2002.

HICKEL, E.R.; SCHUCK, E. Pragas da videira e seu controle no estado de Santa Catarina. **Boletim técnico 77**. Florianópolis: EPAGRI, 1996.

HICKEL, E.R. Homopteros nocivos. In: Hickel, E.R. **Pragas das fruteiras de clima temperado no Brasil. Guia para o manejo integrado de pragas**. Florianópolis: Epagri, 2008. p.55-96.

HICKEL, E. R.; PERUZZO, E. L.; SCHUCK, E. Pirâmide etária e distribuição espacial da pérola-da-terra no Meio-Oeste Catarinense. **Agropecuária Catarinense**, Florianópolis, v. 22, n. 1, p. 61-68, 2008.

HOLE, F. D. Effects of animals on soil. **Geoderma**, v. 25, p. 75-112, 1981.

HOLWAY, D.A. L.; LACH, A.V.; SUAREZ, N.D.; TSUTSUI; CASE, T.J. The causes and consequences of ant invasions. **Ann. Rev. Ecol. System**, v. 33, p. 181–233, 2002.

IBGE - INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Banco de dados agregados**. Disponível em: <<http://www.sidra.ibge.gov.br/bda/agric/default.asp>>. Acesso em: 03 dez. 2011.

JAFFÉ, K. **El mundo de las hormigas**. Equinoccio Ediciones. 1993.

LARSEN, A.; PHILPOTT, S. M. Twig-nesting ants: The hidden predators of the coffee berry borer in Chiapas, Mexico. **Biotropica**, v.42, p. 342–347, 2010.

LAVELLE, P.; BIGNELL, D.; LEPAGE, M.; WOLTERS, V.; ROGER, P.; INESON, P.; HEAL, O. W.; DHILLION, S. Soil function in a changing world: the role of invertebrate ecosystem engineers. **European Journal of Soil Biology**, v.33, p. 159-193, 1997.

LEGENDRE, P.; LEGENDRE, L. **Numerical Ecology**. Elsevier, 1998.

LOURENÇÃO, A. L.; MARTINS, F. P.; ALARCON, L. C. M. Ocorrência de *Eurhizococcus brasiliensis* (Hempel) (Homoptera: Margarodidae) em videira no município de Louveira, estado de São Paulo. **Bragantia**, v. 48, p. 205-208, 1989.

LOWE, S.; BROWNE, M.; BOUDJELAS, S.; POORTERM, D. E. 100 of the World's Worst Invasive Alien Species: A Selection from the Global Invasive Species Database. **Invasive Species Specialist Group**, Gland, Switzerland. 2004.

MAGURRAN, A. **Ecological diversity and its measurement**. Londres: Chapman & Hall, 1983.

MARICONI, F. A. M.; ZAMITH, A. P. L. Contribuição para o conhecimento dos Margarodinae (Homoptera: Margaroridae) que ocorrem no Brasil. **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, v. 2, n. 1, p. 86-101, 1973.

MARTINS, C.; BUENO, O.C. Ocorrência de três haplótipos de *Linepithema micans* (Formicidae: Dolichoderinae) no Rio Grande do Sul e seu provável status de praga. In: **Anais do XIX Simpósio de Mirmecologia - 1º Simpósio Franco-Brasileiro de Mirmecologia**, Ouro Preto, UFOP, 2009.

MARTINS, C., NONDILLO, A., MARTINS, V.G., BOTTON, M., BUENO, O.C. Occurrence of Three Haplotypes of *Linepithema micans* (Forel) (Hymenoptera: Formicidae) in Southern Brazil. **Neotropical Entomology**, v. 41, p.57–61, 2012a.

MARTINS, C.; SOUZA, R. F.; BUENO, O. C. Presence and distribution of the endosymbiont *Wolbachia* among *Solenopsis* spp. (Hymenoptera: Formicidae) from Brazil and its evolutionary history. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 109, p. 287–296, 2012b.

MATOS, J. Z.; YAMANAKA, C. N.; CASTELLANI, T. T.; LOPES, B. C. Comparação da fauna de formigas de plantio de *Pinus elliotti*, com diferentes graus de complexidade estrutural (Florianópolis, SC). **Biotemas**, n. 7, p. 57-64, 1994.

MENTONE, T. O.; MORINI, M. S. C.; SOUZA, L.; BRAGA, S. M. P. Hymenoptera communities in an agroecosystem using direct seeding in southeastern Brazil. **Sociobiology**, v. 53, p. 473-486, 2009.

MORINI, M. S. C.; SILVA, R. R.; SUGUITURU, S. S.; PACHECO, R.; NAKANO, M. A. Formigas da Serra do Itapeti. In: MORINI, M. S. C.; MIRANDA, V. F. O. **Serra do Itapeti: aspectos históricos, sociais e naturalísticos**. Bauru, SP: Editora Canal6, 2012.

MORINI, M. S. C.; YASHIMA, M.; ZENE, F. Y.; SILVA, R. R.; JAHYNY, B. Observations on the *Acanthostichus quadratus* (Hymenoptera: Formicidae: Cerapachyinae) visiting underground bait and fruits of the *Syagrus romanzoffiana*, in an area of the atlantic forest, Brazil. **Sociobiology**, v. 43, p. 573-578, 2004.

MORRIS, J. R.; STEIGMAN, K. L. Effects of polygyne fire ant invasion on native ants of a blackland prairie in Texas. **Southwestern Naturalis**, v. 38, p. 136-140, 1993.

NICHOLS, B. J.; SITES, R. W. A comparison of arthropod species within and outside the range of *Solenopsis invicta* Buren in central Texas. **Southwestern Entomology**, v. 14, p. 345-350, 1989.

NONDILLO, A.; SGANZERLA, V.; BOTTON, M.; BUENO, O.C. Efeito da presença de *Linepithema micans* (Hymenoptera: Formicidae) na infestação de *Eurizococcus brasiliensis* (Hemiptera: Margarodidae) em plantas de videira. In: **Congresso Brasileiro de Entomologia**. Natal, RN, 2010a.

NONDILLO, A.; SGANZERLA, V.; BUENO, O.C.; BOTTON, M. *Linepithema micans* (Hymenoptera: Formicidae) associada à dispersão da pérola-da-terra na cultura da videira. In: **8º Encontro de Iniciação Científica e 4º Encontro de Pós-graduação da Embrapa Uva e Vinho**. Bento Gonçalves, RS, 2010b.

NONDILLO, A. **Bioecologia, monitoramento e alternativas de controle de espécies de formigas associadas a pérola-da-terra *Eurhizococcus brasiliensis* (Hemiptera: Margarodidae) em vinhedos da região Sul do Brasil**. Tese de Doutorado. Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2013.

OLIVEIRA, R. F.; ALMEIDA, L. C.; SOUZA, D. R.; MUNHAE, C. B.; BUENO, O. C.; MORINI, M. S. C. Ant diversity (Hymenoptera: Formicidae) and predation by ants on the different stages of the sugarcane borer life cycle. **European Journal Entomology**, v. 109, p. 381-387, 2012.

PACHECO, R.; VASCONCELOS, H. L. Subterranean pitfall traps: is it worth including them in your ant sampling protocol? **Psyche**, v. 1, n. 9, 2012.

PECK, S. L.; MCQUAID, B.; CAMPBELL, C. L. Using ant species (Hymenoptera: Formicidae) as a biological indicator of agroecosystem condition. **Environmental Entomology**, v. 27, p. 1102-1110, 1998.

PHILPOTT, S. M.; ARENDT, W. J.; ARMBRECHT, I.; BICHIER, P.; DIESTCH, T. V.; GORDON, C.; GREENBERG, R.; PERFECTO, I.; REYNOSO-SANTOS, R.; SOTO-PINTO L.; TEJEDA-CEUZ, C.; WILLIAMS-LINERA, G.; VALENZUELA, J.; ZOLOTOFF, J. M. Biodiversity Loss in Latin American Coffee Landscapes: Review of the Evidence on Ants, Birds, and Trees. **Conservation Biology**, v. 22, n. 5, p. 1093-1105, 2008.

PHILPOTT, S. M.; ARMBRECHT, I. Biodiversity in tropical agroforests and the ecological role of ants and ant diversity in predatory function. **Ecological Entomology**, v. 31, p. 369-377, 2006.

PITTS, J. P. **A cladistic analysis of the *Solenopsis saevissima* Species-group**. Ph.D. dissertation, University of Georgia, Athens, Georgia, 2002.

PORTER, S. D.; SAVIGNANO, D. A. Invasion of polygyne fire ants decimates native ants and disrupts arthropod community. **Ecology**, n. 71, p. 2095-2106, 1990.

PROTAS, J. F. S.; CAMARGO, U. A. **Vitivinicultura Brasileira: Panorama Setorial em 2010**. Sebrae – Ibravin – Embrapa Uva e Vinho, 2011.

R DEVELOPMENT CORE TEAM. **R: A language and environment for statistical computing**, 2011. Disponível em: <<http://www.R-project.org>>. Acesso em: 15 mar. 2011.

RAMOS, L. S.; MARINHO, C. G. S.; ZANETTI, R.; DELABIE, J. H. C.; SCHLINDWEIN, M. N. Impacto de iscas formicidas granuladas sobre a mirmecofauna não alvo em eucaliptais segundo duas formas de aplicação. **Neotropical Entomology**, v. 32, n. 2. p. 231-237, 2003.

RATNASINGHAM, S.; HEBERT, P. D. N. BOLD: The Barcode of life system. **Molecular Ecology Notes**, p. 1-10, 2007.

REAGAN, T. E. Beneficial aspects of the imported fire ants: a field ecology approach. In: LOFGREN, C. S.; VANDER MEER, R. K. **Fire Ants and Leaf Cutting Ants, Biology and Management**. Westview Press, 1986. p.58-71.

RISCH, A. C.; JURGENSEN, M. F. Ants in the soil system – a hydrological, chemical and biological approach. **Journal of Applied Entomology**, p. 132-265, 2008.

ROSADO, J. L. O.; GONÇALVES, M. G.; DRÖSE, W.; SILVA, E. J. E; KRÜGER, R. F.; FEITOSA, R. M.; LOECK, A. E. Epigeic ants (Hymenoptera: Formicidae) in vineyards and grassland areas in the Campanha region, state of Rio Grande do Sul, Brazil. **Check List**, v. 8, n. 6, p. 1184–1189, 2012.

ROSS, K. G.; KRIEGER, M. B.; SHOEMAKER, D. D.; VARGO, E. L.; KELLER, L. Hierarchical analysis of genetic structure in native fire ant populations: results from three classes of molecular markers. **Genetics**, v. 147, p. 643-655, 1997.

ROSSI, M. N.; FOWLER, H. G. Predaceous ant fauna in new sugarcane fields in the state of São Paulo, Brazil. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 47, n. 5, p. 805-811, 2004.

- SACHETT, F.; BOTTON, M.; DIEHL, E. Ants species associated with the dispersal of *Eurhizococcus brasiliensis* (Hempel in Wille) (Hemiptera: Margarodidae) in Vineyards of the Serra Gaúcha, Rio Grande do Sul, Brazil. **Sociobiology**, v. 54, p. 943-954, 2009.
- SANDERS, D.; VAN VEEN, F. J. F. Ecosystem engineering and predation: the multi-trophic impact of two ant species. **Journal of Animal Ecology**, v. 80, p. 569–576, 2011.
- SCHMIDT, F. S.; LEITE, L. G.; de KLERK, C.A.; CANESIN, A.; MARRASCHI, R.; BALLONE, P. Seasonal Occurrence and Distribution on Grapevine Roots of *Eurhizococcus brasiliensis* (Willw) (Hemiptera: Margarodidae) in Brazil. **S. Afr. J. Enol. Vitic**, v. 34, n. 1, p. 79-85, 2013.
- SHOEMAKER, D. D.; AHRENS, M. E.; ROSS, K. G. Molecular phylogeny of the fire ants of the *Solenopsis saevissima* species-group based on mtDNA sequences. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 38, p. 200-215, 2006.
- SILVEIRA NETO, S.; NAKANO, O.; BARBIN, D.; VILLA NOVA V. A. **Manual de ecologia dos insetos**. São Paulo: Ed. Agronômica Ceres. 1976. 419 p.
- SILVESTRE, R.; DEMÉTRIO, M. F.; DELABIE, J. H. C. Community Structure of Leaf-Litter Ants in a Neotropical Dry Forest: A Biogeographic Approach to Explain Betadiversity. **Psyche**. 2012.
- SOARES, S. M.; MARINHO, C. G. S.; DELLA-LUCIA, T. M. Riqueza de espécies de formigas edáficas em plantação de eucalipto e em mata secundária nativa. **Revista Brasileira de Zoologia**, v. 15, n. 4, p. 889-898, 1998.
- SOLLEY, G. O.; VANDERWOUDE, C.; KNIGHT, G. K. Anaphylaxis due to red imported fire ant sting. **Medical Journal of Australia**, v. 176, p. 521–523, 2002.
- SORIA, S. DE. J.; DELABIE, J.; MORAES, J.E.V.; ENCARNAÇÃO, A.M.V. Formigas (Hymenoptera: Formicidae) associadas a *Eurhizococcus brasiliensis* (Homoptera: Margarodidae) no sistema radicular de videiras *Vitis* spp. no sul do Brasil. In: **Congresso Brasileiro de Entomologia**, 1997, Salvador. Resumos. Cruz das Almas: Sociedade Entomológica do Brasil/Embrapa Mandioca e Fruticultura, 1997. p. 353.
- SOUZA, D. R.; STINGEL, E.; ALMEIDA, L. C.; MUNHAE, C. B.; MAYNÉ-NUNES, A. J.; BUENO, O. C.; MORINI, M. S. C. Ant Diversity in a Sugarcane Culture without the Use of Straw Burning in Southeast, São Paulo, Brazil. **American Journal of Agricultural and Biological Sciences**, v. 5, n. 2, p. 183-188, 2010.

TECCHIO, M.A.; PAIOLI-PIRES, E.J.; TERRA, M.M.; TEIXEIRA, L.A.J.; LEONEL, S. Características físicas e acúmulo de nutrientes pelos cachos de “Niagara Rosada” em Vinhedos na região de Jundiaí. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 29, n. 3, p. 621-625, 2007.

TEODORO, A. V.; MUÑOZ, A.; TSCHARNTKE, T.; KLEIN, A. M.; TYLIANAKIS, J. M. Early succession arthropod community changes on experimental passion fruit plant patches along a land-use gradient in Ecuador. **Agriculture Ecosystems & Environment**, v. 140, p. 14–19, 2011.

THOMAS, G. M. **A biodiversity analysis package - BioDap**. New Brunswick. 2000.

TSCHINKEL, W. R. The reproductive biology of fire ant societies. **Bioscience**, v. 48, p. 593–605, 1998.

VERDI, A. R.; SILVA, P. R.; FRANCISCO, V. L. F. S.; AMARO, A. A.; BAPTISTELLA, C. S. L. Arranjo Produtivo Local – Identificação das possibilidades da viticultura na região de Campinas. **Agric. São Paulo**, v. 52, n. 2, p. 73-86, 2005.

VINSON, S. B.; GREENBERG, L. The biology, physiology and ecology of imported fire ants. In: VINSON, S.B. **Economic Impact and Control of Social Insects**. New York: Praeger Press, 1986.

VINSON, S. B.; SCARBOROUGH, T. A. Interactions between *Solenopsis invicta* (Hymenoptera: Formicidae), *Rhopalosiphum maidis* (Homoptera: Aphididae), and the parasitoid *Lysiphlebus testaceipes* Cresson (Hymenoptera: Aphidiidae). **Annals of the Entomological Society of America**, v. 84, p. 159-164, 1991.

WILSON, E. O. **Pheidole in the New World: a dominant, hyperdiverse ant genus**. Harvard University Press, 2003.





## USO DE MARCADORES RAPD E 28S PARA CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE PÉROLA-DA-TERRA (HEMIPTERA: MARGARODIDAE)

### RESUMO

*Eurhizococcus brasiliensis* (Hemiptera: Margarodidae), a pérola-da-terra, é uma cochonilha de raiz que pode ocasionar prejuízos econômicos em videiras e está presente na viticultura de vários Estados do Brasil, sendo difícil seu controle. Uma vez que não há especialistas que identifiquem morfológicamente esse grupo de cochonilha, o presente estudo teve como objetivo caracterizar a pérola-da-terra, a partir de ferramentas da biologia molecular, tendo como hipótese a existência de mais de um táxon da cochonilha no país. Os espécimes de pérola-da-terra foram coletados nas cidades de Flores da Cunha e Pinto Bandeira (Rio Grande do Sul), Videira e Pinheiro Preto (Santa Catarina), São Roque, São Miguel Arcanjo, Louveira e Indaiatuba (São Paulo) e Petrolina (Pernambuco). Para análise, foram utilizados primers para amplificação do gene 28S e também primers de RAPD. A partir do gene 28S, formaram-se dois clados e com o RAPD, três grupos. Houve associação positiva entre a distância genética e geográfica. A partir dos resultados, pode-se inferir a possibilidade da existência de pelo menos dois grupos da pérola-da-terra nas diferentes regiões amostradas e o estabelecimento de duas hipóteses para explicar a separação dos grupos de cochonilhas, que são (i) ação do efeito fundador e (ii) interdependência de espécies regionais. Todavia, a filogenia da pérola-da-terra só será esclarecida a partir da realização de estudos moleculares complementares, com a utilização de outros genes e também com estudos de taxonomia e biologia básica do grupo.

**Palavras-chave:** *Eurhizococcus brasiliensis*. Viticultura. Identificação molecular. Especiação.

## USE OF RAPD AND 28S MOLECULAR MARKERS TO MOLECULAR CHARACTERIZATION OF GROUND-PEARL (HEMIPTERA: MARGARODIDAE)

### ABSTRACT

*Eurhizococcus brasiliensis* (Hemiptera: Margarodidae), the ground pearl, is a root mealybug that causes economic losses in vineyards, and occurs in viticulture of Brazil states, and its hard to control. There are no specialists to identify this group of mealybug morphologically, thus the present study aimed to characterize the ground pearl, from molecular biology, considering that the existence of more than one taxon of mealybug in Brazil. The samples were collected in the cities of Flores da Cunha Flores da Cunha and Pinto Bandeira (Rio Grande do Sul), Videira and Pinheiro Preto (Santa Catarina), São Roque, São Miguel Arcanjo, Louveira and Indaiatuba (São Paulo) and Petrolina (Pernambuco). For analysis, were used primers for amplification of the 28S gene and also RAPD primers. From the 28S gene, formed two clades, and the RAPD three groups. There was a positive association between genetic and geographic distance. Due these results, we can infer the possibility of at least two groups of ground pearl in different regions sampled and establishing two hypotheses to explain the segregation of the group of mealybugs, which are (i) the action of founder effect and (ii) the interdependence of regional species. However, the phylogeny of ground pearl will only be cleared from the complementary molecular studies with the use of other genes and with studies of basic biology and taxonomy of the group.

**Keywords:** *Eurhizococcus brasiliensis*. Vineyards. Molecular identification. Speciation.

## 1 INTRODUÇÃO

*Eurhizococcus brasiliensis* (Hemiptera: Margarodidae) é uma cochonilha de raiz, conhecida como pérola-da-terra e ataca uma grande variedade de plantas, podendo ocasionar prejuízos econômicos em videiras, cultura em que foi registrada pela primeira vez em 1921 no Estado do Rio Grande do Sul. O gênero *Eurhizococcus* é nativo da América do Sul e apresenta três espécies descritas: *Eurhizococcus brasiliensis* (Wille, 1922); *Eurhizococcus brevicornis* (Silvestri, 1901); *Eurhizococcus colombianus* (Jakubski, 1965) (FOLDI, 2005). Até o momento, das espécies descritas para esse gênero, apenas *E. brasiliensis* foi registrada atacando videiras no Brasil.

*E. brasiliensis* está presente na viticultura de vários Estados do Brasil: Rio Grande do Sul, Santa Catarina, Paraná, São Paulo, Pernambuco e Bahia (FIGUEIRA JÚNIOR, 1970; GALLOTTI, 1976; MATOS; SCHUCK, 1988; LOURENÇÃO et al., 1989; NOVO, 1978; HAJI; ALENCAR, 2000; MILANEZ, 2001; MORALES, 2001; HAJI et al., 2002; HAJI et al., 2004). Possui hábito subterrâneo e apresenta ciclo anual. A cochonilha ataca as raízes de videiras, inserindo seu estilete no sistema radicular da planta, causando maiores danos no primeiro, segundo e terceiro ínstares larvais, já que os adultos são desprovidos de aparelho bucal (SORIA; GALLOTTI, 1986). Sua reprodução ocorre principalmente através de partenogênese telítica ou, em raros casos, pode ocorrer a reprodução sexuada (HICKEL, 1998; SORIA; DAL CONTE, 2000).

O controle da cochonilha é indispensável, porém bastante complexo, principalmente pela falta de informações sobre a bioecologia da espécie (HICKEL et al., 2001; HICKEL, 2008), devido a dificuldade de ser estudada, por apresentar hábito subterrâneo e ciclo de vida longo. Apesar de o Brasil apresentar uma única espécie descrita para a videira, não há registro de estudos taxonômico ou molecular que abranja os espécimes ocorrentes nas várias regiões vitícolas do País.

De maneira geral, a semelhança morfológica entre os diversos grupos de cochonilhas é um grande problema para seu manejo enquanto praga (MALAUSA et al., 2011), o que torna difícil também o estudo da biologia e sistemática desse grupo. A identificação correta das espécies está diretamente relacionada com o sucesso do controle, que, no caso da pérola-da-terra, pode ser efetivo em algumas regiões e não em outras. Uma vez que não existe no Brasil, especialistas que identifiquem morfológicamente esse grupo de cochonilha, o objetivo do presente estudo foi caracterizar a pérola-da-terra, a partir de ferramentas da biologia molecular, tendo como hipótese a existência de mais de um táxon da cochonilha no País. Com

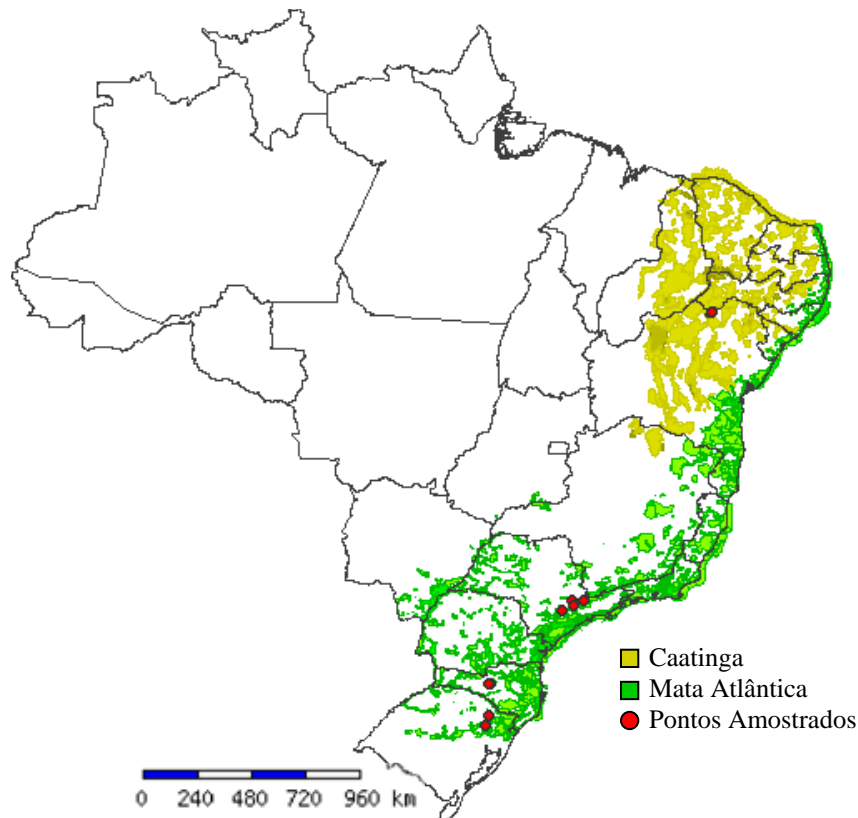
esse objetivo, inicialmente buscou-se a obtenção de algum gene que permitisse identificar os diversos espécimes das várias localidades estudadas e, posteriormente verificar a diversidade molecular dos espécimes presentes nas regiões amostradas do Brasil.

## 2 MATERIAIS E MÉTODOS

### 2.1 Coleta de pérola-da-terra

Os espécimes de pérola-da-terra foram coletados manualmente nas cidades de Flores da Cunha e Pinto Bandeira (Rio Grande do Sul), Videira e Pinheiro Preto (Santa Catarina), São Roque, São Miguel Arcanjo, Louveira e Indaiatuba (São Paulo) e Petrolina (Pernambuco) (Figura 1, Tabela 1) nos anos de 2011 e 2012. Nos Estados do Rio Grande do Sul e Pernambuco, os parreirais foram escolhidos com a ajuda da Embrapa Uva e Vinho e Embrapa Semi-árido, respectivamente. Em Santa Catarina, através da Epagri e em São Paulo, com a ajuda da Casa de Agricultura de Louveira e de Jarinu, do Sindicato Rural de Indaiatuba, do Instituto Agronômico de Campinas e da Vinícola Góes de São Roque. Foram coletadas todas as formas de vida da cochonilha que eram imediatamente colocadas em álcool 90% e mantidas sob congelamento (-20°C).

**Figura 1** – Localidades amostradas em cada Estado do Brasil: Rio Grande do Sul, Santa Catarina, São Paulo e Pernambuco. A proximidade das localidades em Santa Catarina deixam visível apenas um ponto no mapa (sendo dois pontos amostrados).



Fonte: mapCria, speciesMapper (2013).

**Tabela 1** – Coordenadas geográficas dos municípios amostrados no presente estudo.

| Município          | Estado            | Latitude   | Longitude  |
|--------------------|-------------------|------------|------------|
| Flores da Cunha    | Rio Grande do Sul | 28°53'54'' | 51°12'27'' |
| Pinto Bandeira     | Rio Grande do Sul | 29°03'24'' | 51°28'38'' |
| Videira            | Santa Catarina    | 27°03'67'' | 51°06'10'' |
| Pinheiro Preto     | Santa Catarina    | 27°04'28'' | 51°11'39'' |
| Indaiatuba         | São Paulo         | 23°05'12'' | 47°13'06'' |
| Louveira           | São Paulo         | 23°05'11'' | 46°57'02'' |
| São Roque          | São Paulo         | 23°31'45'' | 47°08'07'' |
| São Miguel Arcanjo | São Paulo         | 23°52'42'' | 47°59'50'' |
| Petrolina          | Pernambuco        | 09°23'06'' | 40°41'87'' |

## 2.2 Extração de DNA

Após a realização da extração de DNA dos diferentes estágios de vida da cochonilha foi padronizada a utilização de um único indivíduo, já na forma de cisto, utilizando uma pequena porção de sua cutícula. O conteúdo interno do cisto afetava significativamente o rendimento da extração, devido a enorme quantidade de lipídeos. Também foram testados diversos protocolos de extração a fim de selecionar o que apresentasse melhor rendimento:

### 2.2.1. Sem utilização de Kit comercial:

As amostras dos cistos de pérola-da-terra foram homogeneizadas em solução para lise celular tamponada, composta de: 100 mM Tris, pH 9,1, 100 mM NaCl, 200 mM sacarose, 50 mM de EDTA, 0,5% SDS. O homogeneizado foi incubado a 55 °C, por 3 horas. Após isso, as amostras foram tratadas com RNase (4 mg/ml), incubadas novamente a 37°C (30 min); os resíduos de proteínas foram subsequentemente precipitados com NaCl 5M. A precipitação do DNA foi realizada com álcool isopropílico 100%, seguida de lavagem em álcool etílico a 70%. A ressuspensão do DNA foi feita em tampão TE (10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 8).

### 2.2.2. Com utilização de Kit comercial:

- prepGEM™ (Zygem®): o material biológico foi colocado em um mix “Prepgem” e incubado a 75°C (2 horas) e a 95°C (5 min). Após isso, a solução foi transferida para um novo eppendorf, descartando-se o precipitado.

- Wizard Genomic (Promega®): às amostras foram acrescentados 600 µL de solução de lise e, em gelo, homogeneizado por 10 segundos; após isso incubava-se o material por 25 minutos a 65°C. Após esse tempo, adicionava-se 17,5 µL de proteinase K e novamente incubava-se a 55°C (3 horas). Na sequência, em temperatura ambiente, adicionava-se 200 µL de solução de precipitação de proteínas e agitava-se no ‘vortex’ por 20 segundos. Procedia-se a centrifugação por 6 minutos, removia-se o sobrenadante contendo o DNA e transferia-se para outro microtubo que continha 600 µL de isopropanol. Misturava-se a solução por inversão e centrifugava-se por 1 minuto, descartando o sobrenadante. Adicionava-se 600 µL de etanol 70%, invertendo o tubo várias vezes, centrifugando, pela última vez por 1 minuto. Após isso, o etanol foi descartado e, após o tubo bem seco, o DNA foi reidratado em água miliQ (de 12 a 30 µL) e mantido sob refrigeração.

A verificação da extração foi realizada em gel de agarose 1%, corado com gel red e fotografado sob luz UV.

## 2.3 Reação de Polimerização em Cadeia

### 2.3.1 Utilização de primers para amplificação de genes COI, 28S, ITS

Foram testados primers universais para amplificação do fragmento da citocromo oxidase (COI), assim como foram desenhados alguns específicos para a pérola-da-terra, a partir de dados do mesmo gene e de organismos da mesma família da cochonilha, obtidos no “GenBank”. Também foram testados primers universais para amplificação de fragmentos ITS e do gene 28S (Tabela 2).

As reações eram feitas em tubos apropriados com volume final de 20 – 25 µL através de:

- kit Ready-to-go (Amersham Pharmacia Biotech®): contendo os reagentes necessários (Taq polimerase, tampão, MgCl<sub>2</sub>, dNTP’s, etc) e 2 µL de DNA template, 1,5 µL de cada primer (0,2-0,4 µM).

- kit Qiagen<sup>®</sup>: mix com 12,5 µL de buffer Qiagen<sup>®</sup>, 0,05 µL de cada primer (100 µM) e 2 µL de DNA template.

- mix feito a partir da Taq Promega<sup>®</sup>: contendo 2,5 – 5 µL de tampão; 1,0 a 2,5 µL de MgCl<sub>2</sub>; 1,0 µL de dNTP; 0,15 – 0,25 µL de taq polimerase (5U/µL); 1,0 – 1,5 µL (1mM) de cada primer e 1 µL de DNA template.

Os programas utilizados no termociclador também foram distintos, variando de acordo com cada primer. Cada vez que a PCR não apresentava amplificação para os primers testados, os parâmetros eram modificados, especialmente em relação ao tempo de denaturação e a temperatura de anelamento (Tabela 3), com DNA puro e/ou diluído (1:10; 1:50; 1:100). Se mesmo assim a PCR não apresentasse produto de amplificação, utilizava-se o recurso da *PCR nested* (ou PCR aninhada), sendo o DNA “template” a diluição do produto da primeira PCR na proporção de 1:9.

A confirmação da amplificação sempre foi testada em gel de agarose 1% corado com Gel Red.



**Tabela 2** – Relação de primers (5' - 3') utilizados para amplificação de fragmentos dos genes COI, 28S e ITS das amostras de pérola-da-terra. As combinações testadas e as referências dos primers também estão demonstradas. Primers sem referências foram desenhados.

| Primers              | Sequências 5' - 3'                  | Região amplificada | Combinações testadas | Referências             |
|----------------------|-------------------------------------|--------------------|----------------------|-------------------------|
| <b>desenhados</b>    |                                     |                    |                      |                         |
| F1                   | TTTTAATAAAATAATAATTTATGTC           |                    | F1+R2; F1+R3;        |                         |
| F2                   | GTATGAGCWCATCAYATAITTTAC            |                    | F3+R2; F3+R3;        |                         |
| F3                   | MACWRGWATYAAAATTTTYAGATG            |                    | F1+R1; F1+R4;        |                         |
| R2                   | TATWAKTGTGATCCYAWWGATG              | COI                | F2+R2; F2+R1;        |                         |
| R3                   | CTGTCATAITAAAATTTTRWWATTAWGGWDWTTTC |                    | F2+R3; F2+R4;        |                         |
| R4                   | TATWWTGAAATTTAARTTCAATAC            |                    | F3+R1; F3+R4;        |                         |
| PF                   | CGTTATTGTAGATAACCTTA                |                    | PF+PR; F2+PR;        |                         |
| PR                   | TCATGATCAATTCCAITCAA                |                    |                      |                         |
| <b>já existentes</b> |                                     |                    |                      |                         |
| mtD-10               | TTGATTTTTTTGGTCATCCAGAAGT           | COI I-II           | mtD-10+mtD-18        | Yokogawa; Yahara (2009) |
| mtD-18               | CCACAAATTTCTGAACATTGACCA            | COI I-II           |                      |                         |
| GeoCIJ 2792          | ATACCTCGACGTTATTCAGA                | COI                | Geo+Eva              | Simon et al. (1994)     |
| EvaTKN3772           | GAGACCATTACTTGCITTCAGTCATCT         | COI                |                      |                         |
| LEP-F1               | ATTCAACCAATCATAAAGATAT              | COI I              |                      |                         |
| LEP-R1               | TAAACTTCTGGATGTCCAAAAA              | COI I              | LEP-F1+R1; LEP-F1+R2 | Hebert et al. (2004)    |
| LEP-R2               | CTTATATATTTATTCGTGGAAAGC            | COI I              |                      |                         |
| COI-F                | GATTTTTTGGKCA YCCMGAAG              | COI                |                      | Gusmão et al. (2010)    |
| COI-R                | GCRAATACRGCTCCTATWGATAAWAC          | COI                | COI-F+COI-R          |                         |
| LCO-1490             | GGTCAACAAAATCATAAAGATATTGG          | COI                | LCO-1490+C1-N-       |                         |
| HCO-2198             | TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA          | COI                | 2568; LCO-           | Malaua et al. (2011)    |
| C1-N-2568            | GCWACWACRTAATAKGTATCATG             | COI II             | 1490+HCO-2198        |                         |
| 28SD2F               | AGAGAGAGTTCAAGAGTACGTCG             | 28S                | 28SD2F+28SD2R        |                         |

| Primers   | Sequências 5' – 3'            | Região amplificada | Combinações testadas | Referências              |
|-----------|-------------------------------|--------------------|----------------------|--------------------------|
| 28SD2R    | TTGGTCCGTGTTTCAAGACGGG        | 28S                | 28SD2F+28SD2R        | Malausa et al.<br>(2011) |
| ITS2MF    | CTCGTGACCAAAAGAGTCCTG         |                    | ITS2MF+MR            |                          |
| ITS2MR    | TGCTTAAGTTCAGGGGTAG           | ITS                |                      |                          |
| ITS1-5.8s | TACACACCGCCCGTCGCTACTA        |                    | ITS1-5.8s+ITS2       |                          |
| ITS2      | TTCCTTTCCTCCSCTAYTRATATGCTTAA |                    |                      |                          |

**Tabela 3** – Parâmetros utilizados nas reações de polimerização em cadeia para a pérola-da-terra.

| Parâmetros              | Temperatura (°C) | Tempo          | Número de ciclos |
|-------------------------|------------------|----------------|------------------|
| Denaturação inicial     | 94-98            | 30 s – 15 min  |                  |
| Denaturação             | 94-98            | 10 s – 1 min   |                  |
| Anelamento (hibridação) | 40-58            | 15 s – 90 s    | 35 a 40          |
| Elongação               | 72               | 15 s – 90 s    |                  |
| Extensão                | 72               | 4 min – 10 min |                  |

## **2.4 Reações de purificação e sequenciamento de DNA**

As amostras que apresentavam resultados positivos de amplificação foram purificadas a partir do kit “illutra™ GFX™ PCR DNA and Gel Band” (GE Healthcare®), seguindo o protocolo do fabricante.

Após quantificação do DNA as reações de sequenciamento foram feitas com a química BigDye Terminator (v.3.1) (Applied Biosystem Inc) seguindo o protocolo padrão fornecido pelo fabricante. Utilizou-se um sequenciador automático modelo ABI 3130 (Applied Biosystem TM). As sequências obtidas foram alinhadas a partir do software BioEdit 7.0 e comparadas com o banco de dados do “GenBank”.

## **2.5 Análise dos dados**

As sequências obtidas foram analisadas separadamente com o uso do programa BioEdit, alinhadas por meio do aplicativo Clustal (HIGGINS et al., 1992) e editadas manualmente. Foram excluídas algumas bases do final do fragmento para que todas ficassem do mesmo tamanho antes da realização das análises.

Após o alinhamento, os dados foram submetidos à análise do sinal filogenético no programa DAMBE (XIA; XIE, 2001). A reconstrução da filogenia a partir de Máxima Parcimônia foi realizada com o uso do programa PAUP, versão 4.0 (SWOFFORD, 2003). Os dados foram tratados com mesmo peso tanto para gaps quanto para substituição. Para gerar os índices de “bootstrap” foram utilizadas 1000 réplicas.

As sequências obtidas também foram submetidas ao software NETWORK4.5 (fluxus-engineering.com) usando o método de median-joining (BANDELT et al., 1999) para estabelecer a rede de haplótipos.

## **2.6 Utilização de primers para RAPD**

O polimorfismo de marcadores RAPD é revelado pela amplificação de loci cromossômicos utilizando-se primers compostos de sequências curtas de oligonucleotídeos. Na PCR, estes primers se hibridizam com sequências genômicas que lhes são complementares. Como a sequência de cada iniciador é determinada de modo aleatório, este pode encontrar várias regiões complementares à sua sequência e, por isso, revelar vários loci.

Os fragmentos amplificados são separados em um gel de poliacrilaminada ou agarose (LOPES et al, 2002).

Foram testados 40 primers (Prodimol<sup>®</sup>), sendo selecionados 18 para análise. As reações de PCR foram realizadas para um volume final de 12,5  $\mu$ L, utilizando 1  $\mu$ L de DNA ‘template’ com uma concentração de 12,5 ng, 1  $\mu$ L de primer (1mM) (Tabela 3), 0,25  $\mu$ L de Taq polimerase (5U/ $\mu$ L), 1,0  $\mu$ L de MgCl<sub>2</sub> (25mM), 2,5  $\mu$ L Tampão 5X (Promega<sup>®</sup>) e água. Um controle negativo foi incluído nas reações, utilizando todos os reagentes, com ausência do DNA “template”.

As amplificações foram realizadas em um termociclador modelo 96 Well Thermal Cycler (Applied Biosystems<sup>®</sup>) como segue: denaturação inicial a 95°C (4 min) seguidos por 45 ciclos de denaturação a 92°C (15 seg), anelamento (variável de acordo com a T<sub>m</sub> de cada primer – Tabela 4, por 15 segundos) e extensão a 72°C (70 seg) e com extensão final de 72°C (6 min) (SMITH et al., 1994 modificado). O produto amplificado foi verificado por eletroforese a 1,2%, corado com gel red e submetido a 120 V, 50 mA, durante 70 minutos e, posteriormente, fotografado sob luz UV.

**Tabela 4** – Código, sequência e temperatura de anelamento de cada um dos primers testados. Em negrito, destacam-se os primers que apresentaram amplificação para todas as localidades estudadas e foram utilizados para análises.

| Código do primer | Seq 5' – 3'       | Ta   |
|------------------|-------------------|------|
| OPM 01           | GTTGGTGGCT        | 37.5 |
| OPM 02           | ACAACGCCTC        | 37.5 |
| <b>OPM 03</b>    | <b>GGGGGATGAG</b> | 41.6 |
| <b>OPM 04</b>    | <b>GGCGGTTGTC</b> | 41.6 |
| OPM 05           | GGGAACGTGT        | 37.5 |
| OPM 06           | CTGGGCAACT        | 37.5 |
| OPM 07           | CCGTGACTCA        | 37.5 |
| OPM 08           | TCTGTTCCCC        | 37.5 |
| OPM 09           | GTCTTGCGGA        | 37.5 |
| <b>OPM 10</b>    | <b>TCTGGCGCAC</b> | 41.6 |
| OPM 11           | GTCCACTGTG        | 37.5 |
| <b>OPM 12</b>    | <b>GGGACGTTGG</b> | 41.6 |

| Código do primer | Seq 5' – 3'       | Ta   |
|------------------|-------------------|------|
| <b>OPM 13</b>    | <b>GGTGGTCAAG</b> | 37.5 |
| OPM 14           | AGGGTCGTTC        | 37.5 |
| OPM 15           | GACCTACCAC        | 37.5 |
| OPM 16           | GTAACCAGCC        | 37.5 |
| OPM 17           | TCAGTCCGGG        | 41.6 |
| OPM 18           | CACCATCCGT        | 37.5 |
| OPM 19           | CCTTCAGGCA        | 37.5 |
| OPM 20           | AGGTCTTGGG        | 37.5 |
| <b>OPV 01</b>    | <b>TGACGCATGG</b> | 37.5 |
| <b>OPV 02</b>    | <b>AGTCACTCCC</b> | 37.5 |
| OPV 03           | CTCCCTGCAA        | 37.5 |
| <b>OPV 04</b>    | <b>CCCCTCACGA</b> | 41.6 |
| <b>OPV 05</b>    | <b>TCCGAGAGGG</b> | 41.6 |
| <b>OPV 06</b>    | <b>ACGCCCAGGT</b> | 41.6 |
| <b>OPV 07</b>    | <b>GAAGCCAGCC</b> | 41.6 |
| <b>OPV 08</b>    | <b>GGACGGCGTT</b> | 41.6 |
| OPV 09           | TGTACCCGTC        | 37.5 |
| <b>OPV 10</b>    | <b>GGACCTGCTG</b> | 41.6 |
| OPV 11           | CTCGACAGAG        | 37.5 |
| OPV 12           | ACCCCCACT         | 41.6 |
| OPV 13           | ACCCCTGAA         | 37.5 |
| OPV 14           | AGATCCCGCC        | 41.6 |
| <b>OPV 15</b>    | <b>CAGTGCCGGT</b> | 41.6 |
| <b>OPV 16</b>    | <b>ACACCCACA</b>  | 37.5 |
| <b>OPV 17</b>    | <b>ACCGGCTTGT</b> | 37.5 |
| <b>OPV 18</b>    | <b>TGGTGGCGTT</b> | 37.5 |
| <b>OPV 19</b>    | <b>GGGTGTGCAG</b> | 41.6 |
| OPV 20           | CAGCATGGTC        | 37.5 |

## 2.7 Análise dos dados

Para análise dos fragmentos de DNA amplificados pela técnica de RAPD, foram utilizados *ladders* de tamanhos distintos: 50 pb, 200 pb e 1 kb (Promega<sup>®</sup>) e 1 kb (Fermentas<sup>®</sup>). Dessa maneira, o tamanho das bandas visualizadas no gel pode ser diferenciado (Figura 5). A presença da banda em cada uma das posições no gel foi classificada como 1 e a ausência como 0 para construir uma matriz binária. Estes dados foram submetidos à análise de UPGMA, utilizando distância Euclidiana, a partir do software NTSYS (APPLIED BIOSTATISTICS, 1998).

Foi realizada também uma análise de correlação (Pearson) entre as distâncias genética e geográfica, sendo que a distância geográfica foi considerada sempre o caminho mais curto entre as localidades.

### 3 RESULTADOS

Os três métodos apresentados foram eficientes na extração, porém, em função da praticidade, a utilização dos kits comerciais prepGEM™ e Wizard Genomic foram padronizados para as extrações. Houve muita dificuldade na extração de DNA de *E. brasiliensis* em função da grande quantidade de lipídeos que a cochonilha apresenta quando na forma de cisto, dessa maneira foi verificado que com a utilização de uma pequena parte do tegumento do cisto da cochonilha obtiveram-se os melhores rendimentos. É importante ressaltar que, no caso da pérola-da-terra, o sucesso no rendimento da extração está mais relacionado com o próprio material biológico utilizado do que com outros fatores da extração.

Os testes iniciais com primers para região COI já descritos na bibliografia (HEBERT et al., 2004; YOKOGAWA; YAHARA, 2009; MALAUSA, et al. 2011) (Tabela 1) não apresentaram sucesso na amplificação da região de interesse e, dessa maneira, buscou-se no “GenBank” as únicas quatro sequências disponíveis de espécies da mesma Família de *Eurhizococcus brasiliensis* (Margarodidae) depositadas por Yokogawa e Yahara (2009), sob os registros: AB439510, AB439511, AB439512, AB439513. O alinhamento destas sequências apresentou poucas regiões conservadas e, a partir de uma destas regiões, desenharam-se vários primers (F1, F2, F3, R2, R3, R4, PF, PR) com modificações em alguns nucleotídeos, que estão descritos na Tabela 2 e, os resultados destes testes na Tabela 5.

**Tabela 5** – Resultados das ampliações de pérola-da-terra com a utilização de todas as combinações de primers. O tamanho aproximado do fragmento amplificado, a procedência das amostras e o grupo mais próximo identificado no “GenBank” estão demonstrados.

| Primers            | Amplificação |     | Procedência                            | Tamanho aproximado do fragmento (pb) | “GenBank”                   |
|--------------------|--------------|-----|--|--------------------------------------|-----------------------------|
|                    | Sim          | Não |  |                                      |                             |
| F1+R2              | X            |     |  |                                      |                             |
| F1+R3              | X            |     |  |                                      |                             |
| F3+R2              | X            |     | Louveira, Indaiatuba e Flores da Cunha | 410                                  | Scarabaeidae (COI I)        |
| F3+R3              | X            |     |  |                                      |                             |
| F1+R1              | X            |     |  |                                      |                             |
| F1+R4              | X            |     |  |                                      |                             |
| F2+R2              | X            |     | Louveira, Indaiatuba e Flores da Cunha | 500                                  | Scarabaeidae (COI I)        |
| F2+R1              | X            |     |  |                                      |                             |
| F2+R3              | X            |     |  |                                      |                             |
| F2+R4              | X            |     | Indaiatuba, Louveira, São Roque        | 640                                  | Cerococcidae (COI II)       |
| F3+R1              | X            |     |  |                                      |                             |
| F3+R4              | X            |     |  |                                      |                             |
| PF+PR              | X            |     |  |                                      |                             |
| F2+PR              | X            |     |  |                                      |                             |
| mtD-10+mtD-18      | X            |     |  |                                      |                             |
| C1J+Eva            | X            |     |  |                                      |                             |
| LEP-F1+R1          | X            |     | Petrolina                              |                                      |                             |
| LEPFI+R2           |              |     |  |                                      |                             |
| LCO-1490+C1-N-2568 | X            |     | São Roque                              |                                      | Nenhum resultado semelhante |
| LCO-1490+HCO-2198  | X            |     |  |                                      |                             |



| Primers        | Amplificação |     | Procedência  | Tamanho aproximado do fragmento (pb) | “GenBank”                                |
|----------------|--------------|-----|--|--------------------------------------|--|
|                | Sim          | Não |  |                                      |  |
| COI-F+COI-R    | X            |     | Indaiaatuba, Pinto Bandeira, Videira, Tangará, Pinheiro Preto, Petrolina                                       | 450                                  | Coccoidea/Diptera/Fungo/Aphidoidea (COI) |
| 28SD2F+28SD2R  | X            |     | Indaiaatuba, Louveira, São Roque, São Miguel Arcanjo, Videira, Pinheiro Preto, Flores da Cunha, Pinto Bandeira | 400                                  | Pseudococcidae (28S)                     |
| ITS2MF+MR      |              | X   |  |                                      |  |
| ITS1-5.8s+ITS2 | X            |     | Indaiaatuba, Louveira, Videira   | 800                                  | Fungo (ITS)                              |

Apenas os primers 28S amplificaram amostras correspondentes a todas as localidades estudadas (Tabela 4). Os demais primers amplificaram as regiões de interesse para algumas amostras, mas não para outras. A comparação das sequências obtidas com aquelas depositadas no “GenBank”, resultou em algumas próximas a cochonilhas ou insetos e outras bem distantes do grupo, o que mostra a inespecificidade da maioria dos primers utilizados. Outro fator que merece ser destacado é que o banco gênico compara a sequência inserida no *blast* com as sequências já depositadas e, como não existem muitas sequências de organismos taxonomicamente próximos da pérola-da-terra depositadas, a comparação entre a similaridade das sequências resulta, na maioria das vezes, em grupos distintos da cochonilha.

Deste modo, não foram utilizadas porções do gene da citocromo oxidase (COI) para fazer análises filogenéticas, como usualmente é feito, como por exemplo, nos trabalhos de Shoemaker et al. (2003); Shoemaker et al. (2006) e Ross et al. (2009).

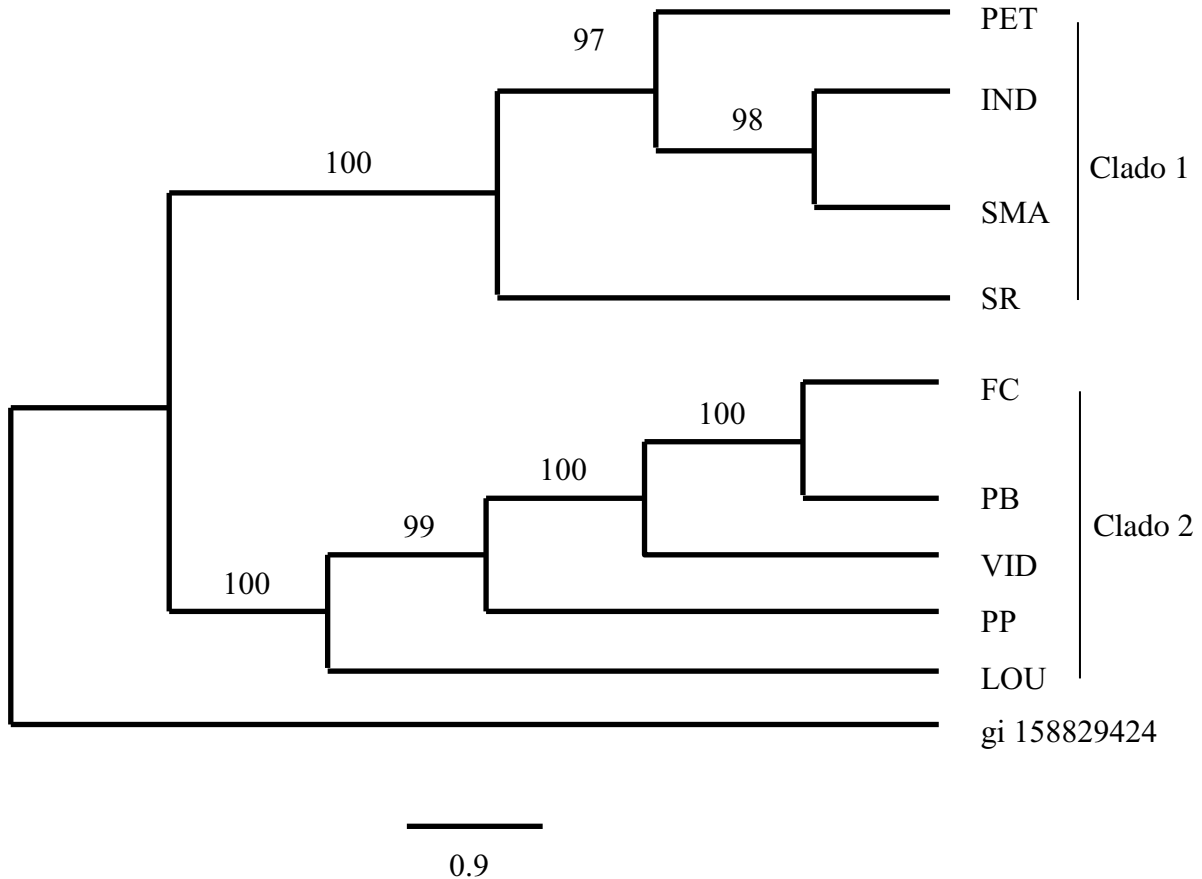
As sequências com porções do gene 28S embora curtas, porém de boa qualidade foram utilizadas para construir uma árvore filogenética e, ambas as análises (de Máxima Parcimônia – MP e de inferência bayesiana – IB) foram praticamente congruentes. Optou-se pela árvore de MP uma vez que houve uma melhor separação dos terminais, além de que praticamente todos os valores de “bootstrap” apresentaram valor máximo (Figura 2). Para o enraizamento da árvore na análise filogenética foi utilizado como grupo externo *Marchalina hellenica* (Gennadius), representante da família Margarodidae, disponível no banco gênico. Na análise filogenética de MP foi encontrada apenas uma árvore parcimoniosa.

A partir dos altos valores de “bootstrap” gerados pela análise, obteve-se a divisão em dois clados principais:

Clado 1: Monofilético, encontram-se agrupados nesse grupo representantes da região Sudeste e Nordeste, das localidades de Indaiatuba, São Miguel Arcanjo, São Roque e Petrolina.

Clado 2: Monofilético, nesse grupo estão representantes das regiões Sul, com as localidades de Flores da Cunha, Pinto Bandeira, Videira, Pinheiro Preto e apenas Louveira da região Sudeste.

**Figura 2** – Árvore de Máxima Parcimônia (MP) reconstruída a partir do gene 28S de representantes de pérola-da-terra provenientes das regiões Sul, Sudeste e Nordeste do Brasil. Valores de “bootstrap” estão ilustrados acima dos ramos. A árvore foi enraizada com representante de *Marchalina hellenica* (gi 158829424).



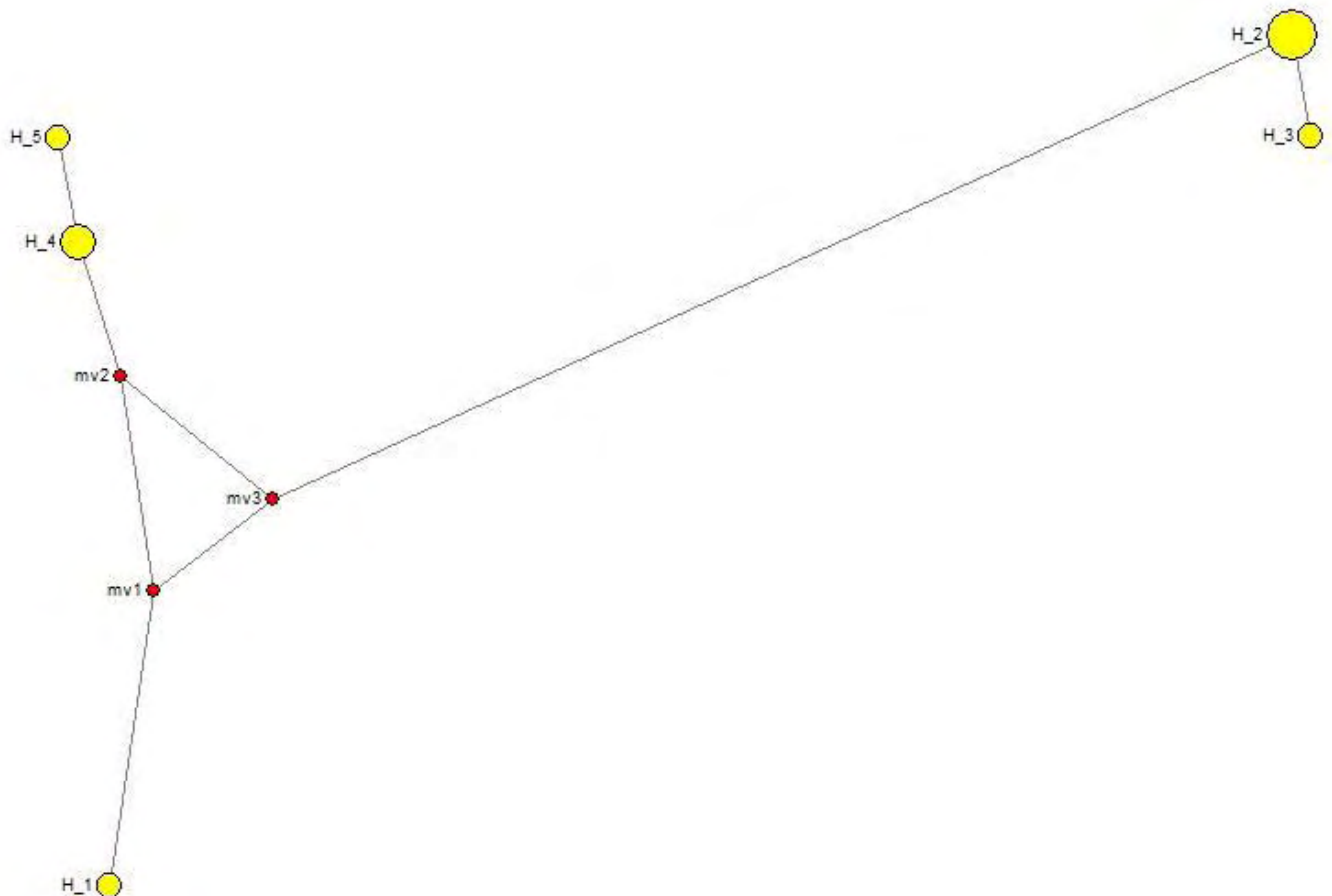
IND – Indaiatuba; FC – Flores da Cunha; LOU – Louveira; PB – Pinto Bandeira; PET – Petrolina; PP – Pinheiro Preto; SMA – São Miguel Arcanjo; SR – São Roque; VID – Videira.

Considerando que os dois clados foram muito bem suportados, pode-se inferir a existência de pelo menos, dois “grupos de espécies” da pérola-da-terra no Brasil.

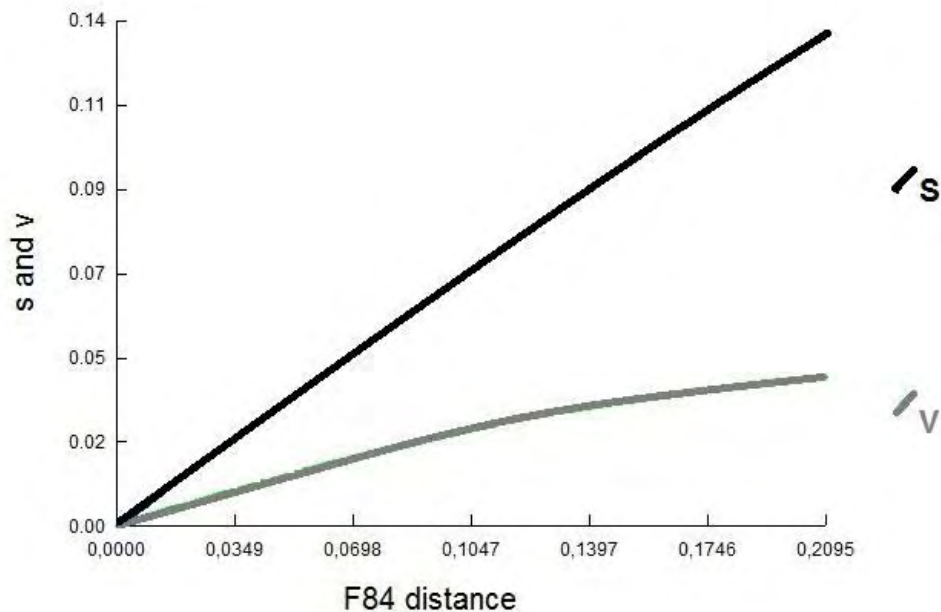
Os espécimes do Estado do Rio Grande do Sul (FC e PB) apresentaram semelhanças entre si, assim como os espécimes do Estado de Santa Catarina (VID e PP). Todavia espécimes da cidade de Louveira (São Paulo) se assemelharam mais com espécimes da região Sul do País (Rio Grande do Sul e Santa Catarina) do que com as demais cidades do Estado de São Paulo (Indaiatuba, São Miguel Arcanjo e São Roque), que por sua vez, apresentaram grande similaridade entre si. Espécimes de Petrolina (Pernambuco) também ficaram mais próximos dos espécimes do Estado de São Paulo. Em visitas a campo foram observadas também diferenças no comportamento dos espécimes de pérola-da-terra da região Sul e Sudeste comparadas com espécimes da região Nordeste.

As nove sequências do gene 28S analisadas resultaram em cinco haplótipos (Figura 3), sendo o H\_1 de Petrolina, o H\_2 correspondente às localidades de Flores da Cunha, Pinto Bandeira, Louveira e Videira, o H\_3 de Pinheiro Preto, o H\_4 de Indaiatuba e São Miguel Arcanjo e o H\_5 correspondente a São Roque. Estes resultados reforçam os que foram obtidos na análise de MP. O resultado gerado na análise do sinal filogenético (Figura 4) indicou que o número de transições ficou acima do de transversões, indicando um forte sinal filogenético.

**Figura 3** – Rede de haplótipos gerada para os haplótipos de pérola-da-terra a partir do gene 28S das localidades estudadas: H\_1 corresponde a Petrolina; H\_2 corresponde a Flores da Cunha, Pinto Bandeira, Louveira e Videira; H\_3 à Pinheiro Preto; H\_4 à Indaiatuba e São Miguel Arcanjo e H\_5 corresponde a São Roque; mv1, mv2 e mv3 indicam possíveis ancestrais; as linhas que ligam os haplótipos representam nucleotídeos divergentes entre eles.



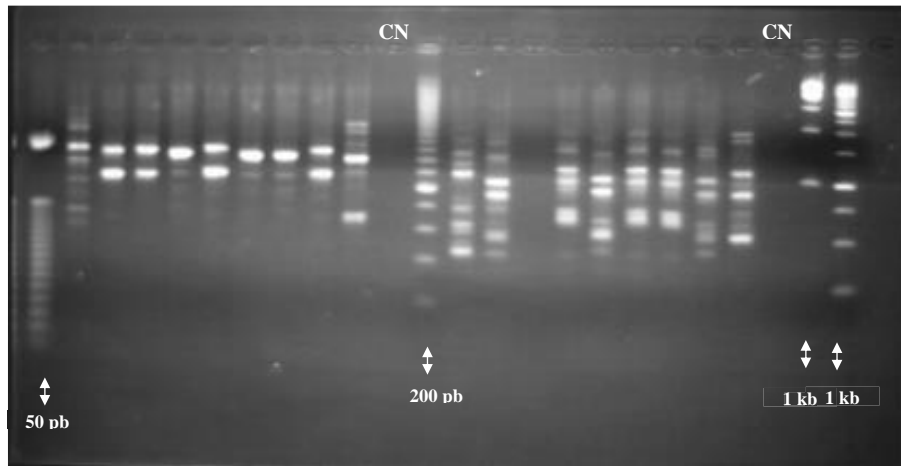
**Figura 4** – Análise do sinal filogenético, demonstrando a frequência das transições (s) e transversões (v) em função da divergência nucleotídica do gene 28S.



Em função da dificuldade em se amplificar regiões genômicas da pérola-da-terra com primers específicos, optou-se em utilizar também a técnica de RAPD, a qual amplifica fragmentos aleatórios e de tamanho reduzido.

Todos os primers da Tabela 3 foram testados e dezoito resultaram em ampliações para todos os espécimes de pérola-da-terra estudados e foram então selecionados. Em conjunto, os primers geraram 132 fragmentos, sendo que cada primer produziu de 4 a 35 bandas. O tamanho dos produtos amplificados variaram de 400 pb a 4 kb, e o controle negativo não apresentou nenhuma amplificação. A Figura 5 ilustra um exemplo de fragmentos amplificados, no caso para os primers OPV 10 e OPV 19.

**Figura 5** – Fragmentos amplificados a partir dos primers OPV 10 e OPV 19. Os *ladders* estão indicados pela seta com seus respectivos tamanhos; o controle negativo (CN) também está demonstrado.



pb – pares de bases; kb – pares de bases (x1000); CN – controle negativo

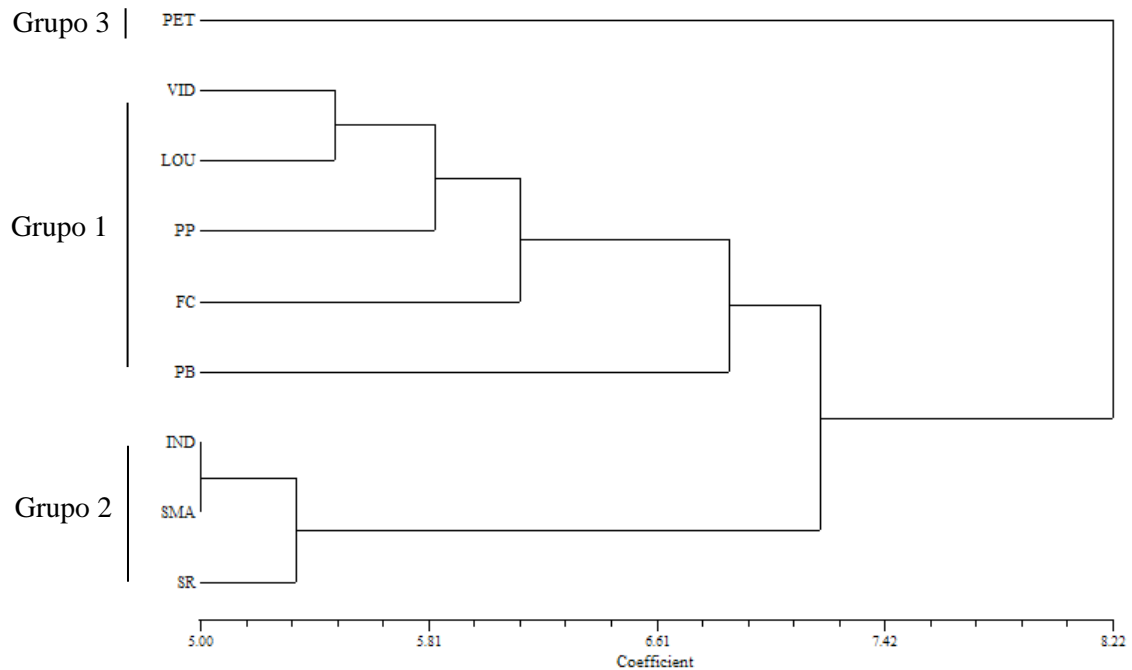
O dendrograma gerado a partir da distância Euclidiana (Figura 6) revelou a existência de três grupos:

Grupo 1: formado por espécimes da região Sul – Videira, Pinheiro Preto, Flores da Cunha, Pinto Bandeira e da região Sudeste – Louveira.

Grupo 2: formado por espécimes da região Sudeste – Indaiatuba, São Miguel Arcanjo e São Roque.

Grupo 3: formado por espécimes da região Nordeste – Petrolina.

**Figura 6** – Dendrograma obtido pelo método UPGMA de distância Euclidiana para os municípios representantes de pérola-da-terra provenientes das regiões Sul, Sudeste e Nordeste do Brasil, a partir de primers de RAPD.

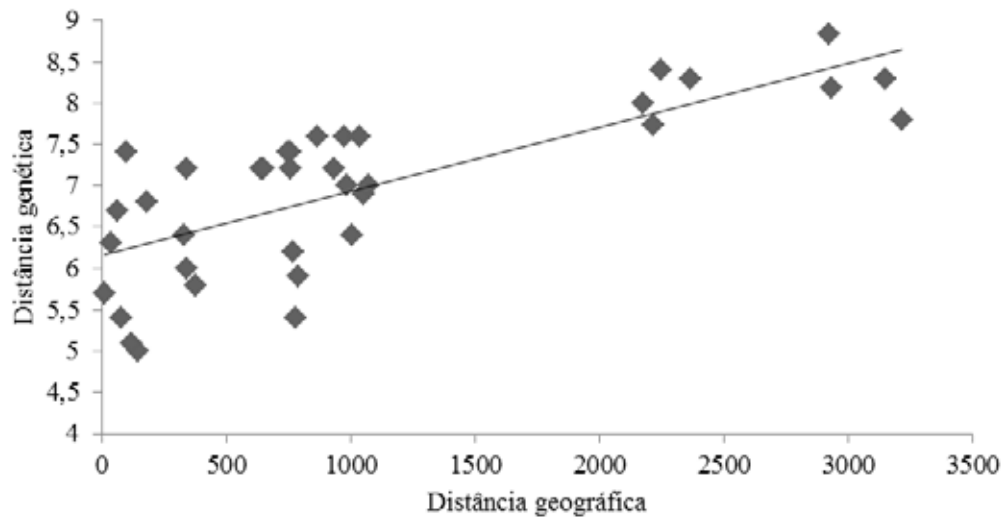


IND – Indaiatuba; FC – Flores da Cunha; LOU – Louveira; PB – Pinto Bandeira; PET – Petrolina; PP – Pinheiro Preto; SMA – São Miguel Arcanjo; SR – São Roque; VID – Videira.

As amostras de Petrolina foram as que ficaram mais distantes das demais. Os espécimes do Estado do Rio Grande do Sul (FC e PB) apresentaram semelhanças entre si, como também os espécimes do Estado de Santa Catarina (VID e PP). Assim como na análise de MP, espécimes da cidade de Louveira (São Paulo) se assemelharam mais com Videira (em Santa Catarina) do que com as demais cidades do Estado de São Paulo (Indaiatuba, São Miguel Arcanjo e São Roque), que por sua vez, apresentaram grande similaridade entre si.

A análise de distância genética e geográfica demonstrou que quanto maior a distância de procedência das amostras, maior é o valor de dissimilaridade (Figura 7), confirmada pela associação positiva do coeficiente de Pearson ( $r = 0,75$ ). Na Tabela 6 estão demonstradas as distâncias genéticas e geográficas entre as localidades amostradas.

**Figura 7** – Distância genética e distância geográfica (km) dos espécimes de pérola-da-terra, amostrados nas regiões Sul, Sudeste e Nordeste do Brasil.



**Tabela 6** – Distâncias genéticas (superior direito) dos espécimes de pérola-da-terra, a partir da análise de RAPD e distâncias geográficas – km (inferior esquerdo) entre as localidades amostradas.

|     | PET      | VID    | PP     | IND      | LOU      | SMA    | SR       | FC    | PB   |
|-----|----------|--------|--------|----------|----------|--------|----------|-------|------|
| PET | 0        | 8,83   | 8,18   | 7,74     | 8,00     | 8,30   | 8,40     | 8,30  | 7,80 |
| VID | 2.923,00 | 0      | 5,70   | 7,40     | 5,40     | 7,20   | 7,40     | 5,80  | 7,20 |
| PP  | 2.935,00 | 13,70  | 0      | 6,20     | 5,90     | 7,20   | 7,20     | 6,00  | 6,40 |
| IND | 2.216,00 | 757,00 | 769,00 | 0        | 6,30     | 5,00   | 5,40     | 7,00  | 6,90 |
| LOU | 2.177,00 | 778,00 | 790,00 | 37,50    | 0        | 6,80   | 7,40     | 6,40  | 7,00 |
| SMA | 2.367,00 | 640,00 | 652,00 | 146,00   | 181,00   | 0      | 5,10     | 7,60  | 7,20 |
| SR  | 2.247,00 | 748,00 | 759,00 | 79,50    | 100,00   | 120,00 | 0        | 7,60  | 7,60 |
| FC  | 3.149,00 | 377,00 | 342,00 | 985,00   | 1.006,00 | 866,00 | 975,00   | 0     | 6,70 |
| PB  | 3.214,00 | 344,00 | 330,00 | 1.051,00 | 1.072,00 | 932,00 | 1.039,00 | 62,60 | 0    |

IND – Indaiatuba; FC – Flores da Cunha; LOU – Louveira; PB – Pinto Bandeira; PET – Petrolina; PP – Pinheiro Preto; SMA – São Miguel Arcanjo; SR – São Roque; VID – Videira.



## 4 DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

Este trabalho, pela primeira vez, revela evidências de que há ocorrência de grupos distintos de *Eurhizococcus brasiliensis* no Brasil. Os resultados apresentados permitem inferir a possível existência de pelo menos dois “grupos de espécies” da pérola-da-terra em videiras nas diferentes regiões do País. Isto é caracterizado pelos altos valores de “bootstrap” que suportaram os clados tanto pela análise do gene 28S, como pela congruência com a análise de RAPD.

A utilização da técnica de RAPD tem sérias restrições de uso baseado no fato de que alguns produtos de RAPD de pesos moleculares similares observados no gel podem não ser necessariamente produtos de amplificação de segmentos de DNA homólogos. Esse problema pode ser minimizado, aumentando-se o tempo de corrida dos géis com uma baixa voltagem para melhorar a resolução dos fragmentos de DNA (SMITH et al., 1994). Apesar disso, trabalhos como os de Hellsten; Sundberg (2000), McCormack; Keegan (2000); Yan et al. (2005); Chong et al. (2000); Kovacs et al. (2001); Román et al. (2003); Nagarajan et al. (2006), Premanandh et al. (2009), Matta et al. (2013) utilizaram com sucesso marcadores RAPD para diferenciar espécies, grupos, colônias de formigas ou até mesmo inferir relações filogenéticas. Penner et al. (1993) afirmam que, embora existam algumas limitações no método, a análise de RAPD pode ser reproduzida entre laboratórios distintos, desde que se mantenham as mesmas condições de PCR e concentrações de reagentes.

Outro fato favorável à utilização do RAPD é quando não se tem nenhuma informação molecular a respeito do organismo analisado e os testes com primers universais que são normalmente utilizados para a separação das espécies não apresentam resultados suficientes, assim, a técnica pelo menos permite a separação em grupos principais. Acrescenta-se que no presente estudo isto foi corroborado pela análise de Máxima Parcimônia do gene 28S na separação de grupos da cochonilha.

A dificuldade encontrada no presente trabalho em relação ao uso do gene da citocromo oxidase para diferenciar espécies de cochonilhas está coerente com os relatos de Malausa et al. (2011). Neste trabalho, conforme já demonstrado na Tabela 5, os primers utilizados para amplificação da citocromo oxidase, apresentaram resultado de amplificação para poucas amostras. Mesmo assim, utilizando como exemplo o par F2R2, pode-se observar grandes diferenças nos nucleotídeos das três localidades amplificadas (Apêndice A), sendo Louveira (da região Sudeste) mais similar a Flores da Cunha (da região Sul) do que a Indaiatuba (Sudeste), confirmando as demais análises realizadas.

Malausa et al. (2011) trabalharam com cochonilhas farinhentas (Pseudococcidae), grupo que detém maiores informações moleculares quando comparados com a pérola-da-terra (Margarodidae) e, mesmo assim, encontraram dificuldades para a amplificação do gene COI. Isto sugere uma dificuldade generalizada para identificar cochonilhas a partir da utilização do gene COI (metodologia proposta pelo Barcode para insetos).

O agrupamento resultante da análise de UPGMA obtida pelo RAPD foi similar com a árvore de Máxima Parcimônia, a partir do gene 28S. Os espécimes de Videira, Pinheiro Preto, Pinto Bandeira, Flores da Cunha e Louveira apresentaram maior proximidade entre si do que com os espécimes de Indaiatuba, São Roque e São Miguel Arcanjo. Apenas as amostras procedentes de Petrolina apresentaram ligações diferentes nas duas análises, sendo um grupo distinto na análise de RAPD e, fazendo parte do Clado 1 da análise de Máxima Parcimônia. Essa diferença pode estar relacionada ao fato de que para análise de MP foi utilizado um fragmento do gene 28S, com 400 pb, limitando assim a obtenção de maior número de informações genéticas e conseqüentemente melhor separação dos clados.

Os resultados obtidos permitiram estabelecer duas hipóteses que podem estar relacionadas com a separação dos grupos de cochonilhas: hipótese (i) ação do efeito fundador; (ii) interdependência de espécies regionais. É importante destacar que estas hipóteses são preliminares e necessitam da realização de outros estudos para que se possa afirmar como esse grupo de cochonilha colonizou e se dispersou pelas diversas regiões do Brasil.

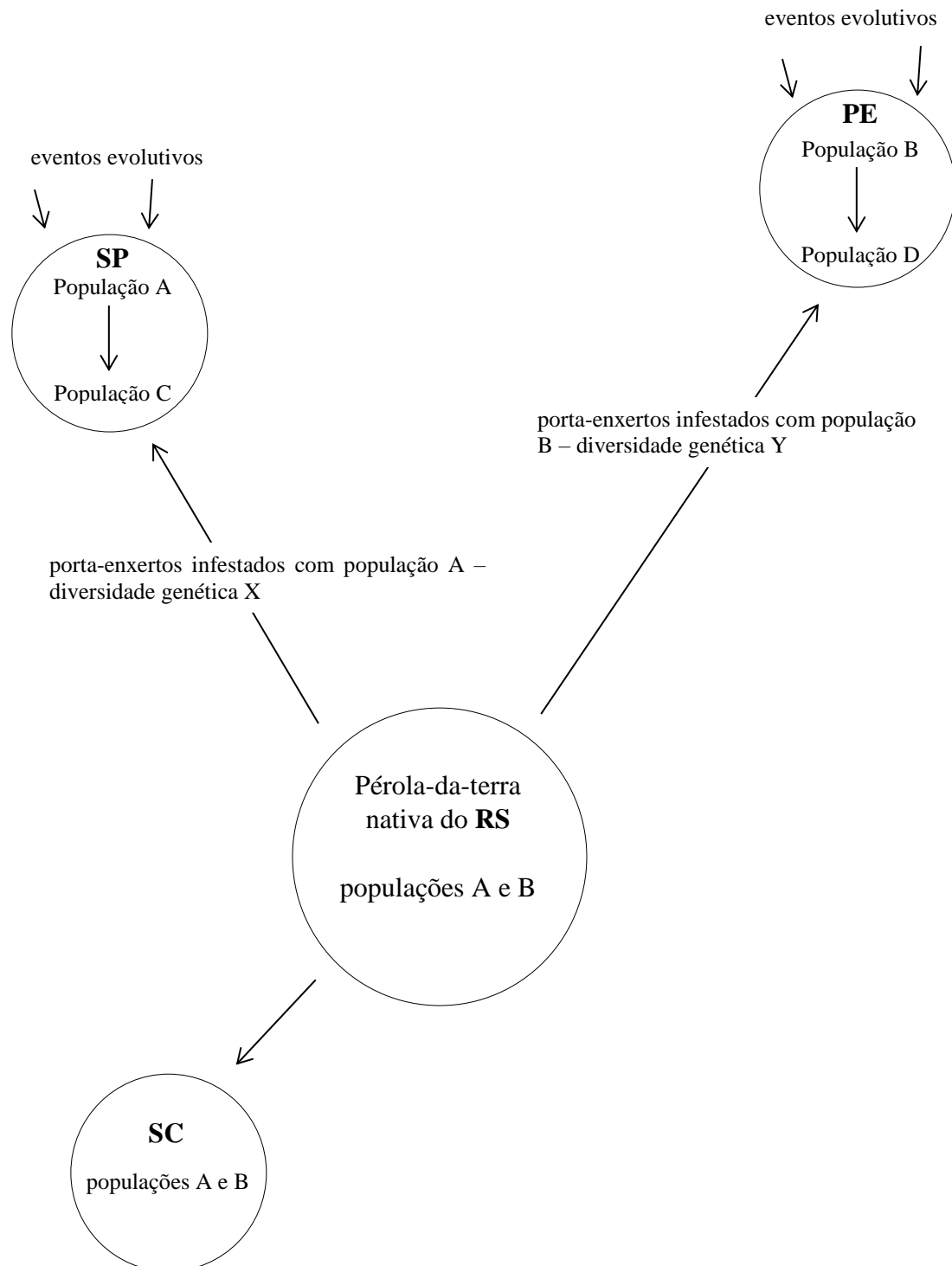
As possibilidades de explicação sobre a separação de grupos distintos observados nas análises estão relacionadas com a origem da pérola-da-terra, que acredita ser da região Sul do País, em virtude do primeiro registro ter ocorrido em Santa Maria (RS) e pelo fato do inseto ter ampla ocorrência nessa região (M. BOTTON, comunicação pessoal). Se a premissa de que a pérola-da-terra é nativa da região Sul do Brasil for verdadeira, pode ter ocorrido o fenômeno “efeito fundador” (i); porém, como o fato do primeiro registro da cochonilha ter sido na região Sul não ser o suficiente para afirmar categoricamente que a pérola-da-terra é nativa daquela região, é possível considerar a existência de grupos de espécies diferentes e cada um deles nativo das diferentes regiões que foram separadas nas análises (ii).

No caso da pérola-da-terra ser nativa da região Sul, ela poderia ter sido transportada para a região Nordeste a partir de mudas enraizadas ou porta-enxertos infestados. Segundo informações de pesquisadores da Embrapa Semi-árido, todos os porta-enxertos utilizados na região do Vale do São Francisco (Nordeste do País) foram originários da Embrapa Uva e Vinho (Sul do País), há aproximadamente duas décadas, o que pode ter transportado a pérola-da-terra em suas raízes. Dessa maneira, não se pode excluir a possibilidade da ação do efeito

fundador (hipótese i) ter sido o responsável pela variação entre os grupos da pérola-da-terra presentes na região Sul, Sudeste e Nordeste do País. O mesmo fenômeno pode ter ocorrido na região Sudeste. O efeito fundador é caracterizado como o estabelecimento de uma nova população por meio de poucos indivíduos que carregam consigo uma pequena fração da variação genética total da população parental (RIDLEY, 2003). A partir desses poucos indivíduos, com o passar do tempo, a população se expande podendo até colonizar outros locais. Nesse caso, o que pode ter acontecido é que saíram dois grupos de cochonilhas com variabilidade genética distinta e que fundaram duas novas populações, uma em cada região (Sudeste e Nordeste). Essas populações se fixaram e outros eventos evolutivos também podem ter moldado-as geneticamente, como por exemplo, a ocorrência de mutações e o próprio processo de seleção natural ou deriva genética (Figura 8). O fato de os espécimes de Petrolina terem apresentado maior similaridade genética com os espécimes de São Paulo do que com os do Rio Grande do Sul na análise de Máxima Parcimônia, pode ser devido às mutações que ocorreram posteriormente à introdução, o que fez com que os espécimes dessas regiões se aproximassem. A correlação positiva entre a distância genética e a distância geográfica também é um fator que reforça esses dados. Além disso, não se pode descartar que um aumento na amostragem poderia modificar os resultados, levando a uma melhor separação dos grupos.

Apesar do curto intervalo de tempo da possível introdução da pérola-da-terra no Nordeste, a diferenciação encontrada nos grupos é plausível de ter ocorrido uma vez que não se conhece a taxa evolutiva do gene 28S (ou de quaisquer outros genes) nesse grupo de cochonilha. Existe pouco conhecimento da biologia básica do organismo, tão pouco das inter-relações que mantém com o ambiente. Dessa maneira, não é possível inferir como a pressão do ambiente pode atuar na espécie. Assim, a ação do efeito fundador pode ter diferenciado grupos de pérola-da-terra em regiões distintas.

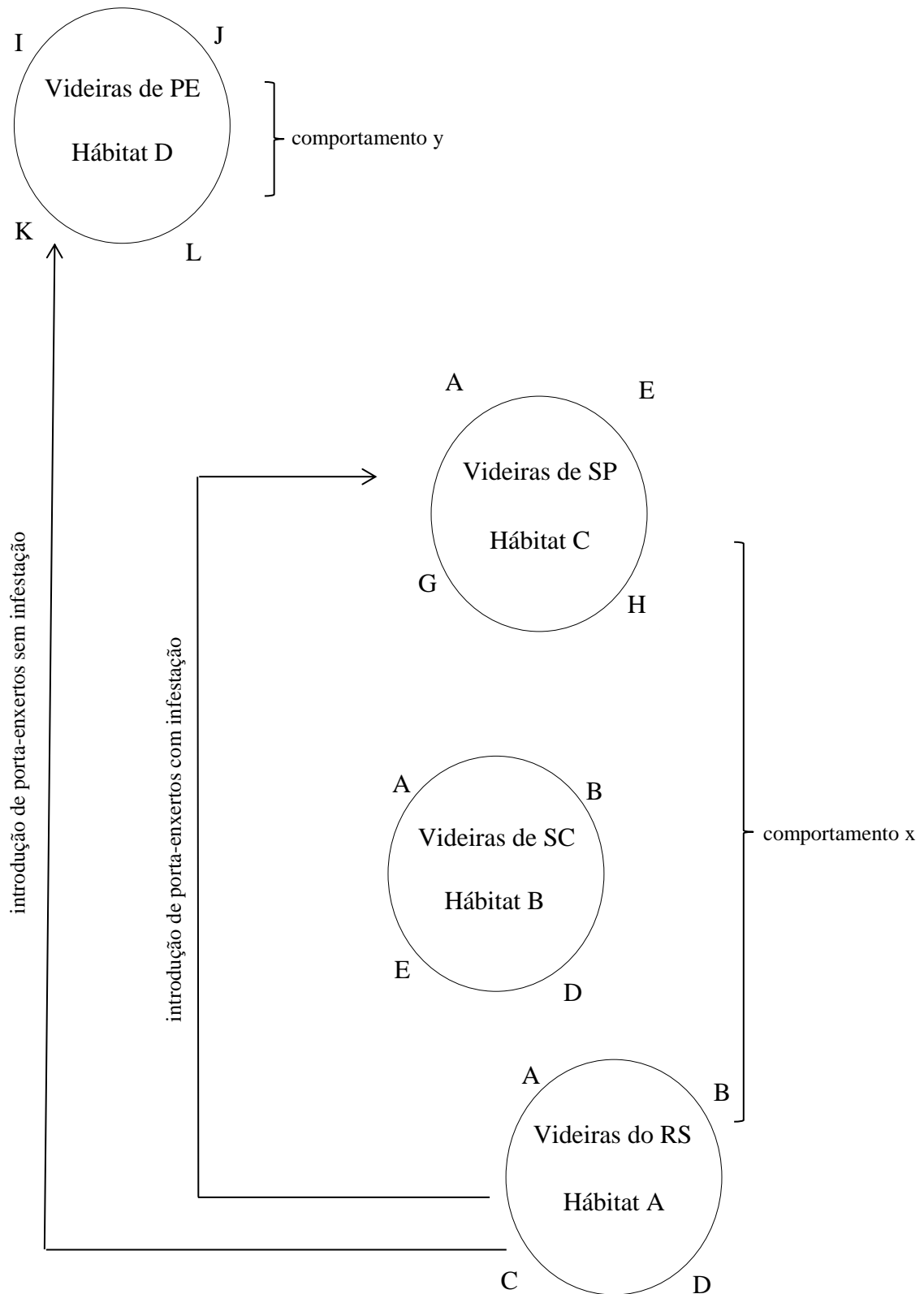
**Figura 8** – Esquema representativo da hipótese (i): ação do efeito fundador.



Em contrapartida, no caso da pérola-da-terra não ser nativa da região Sul, a formação de clados a partir das análises realizadas pode indicar a ocorrência de grupos distintos do inseto nas diversas regiões do Brasil (hipótese ii). As divergências nos grupos podem estar relacionadas às diferenças nos habitats em que vivem e no comportamento das cochonilhas que predominam nas regiões que os clados ou grupos representam. As localidades amostradas das regiões Sul e Sudeste estão situadas em área originária de Mata Atlântica, enquanto que a região amostrada em Pernambuco, na Caatinga. Isso representa diferenças não só na vegetação, como também no clima, no solo, entre outras. Aliado a esse fator, observações eventuais realizadas em campo permitiram constatar que o comportamento das cochonilhas na região Nordeste é distinto do que ocorre nas regiões Sul e Sudeste, sendo que em Petrolina é comum que as fêmeas ambulatórias saiam na superfície do solo nas primeiras horas da manhã como também, já foi verificada por alguns pesquisadores, a ocorrência ocasional de machos. Na região Sul e Sudeste, a frequência de fêmeas que saem do solo para a superfície é muito menor e, raramente, aparecem machos.

Considerando que a cochonilha é nativa do Brasil, esses grupos já deveriam ocorrer em plantas nativas ou cultivadas das distintas localidades e, portanto, colonizaram cada região de maneira independente. Neste caso, os porta-enxertos vindos da região Sul para a região Nordeste não deveriam ter a cochonilha em suas raízes. Pelo contrário houve uma introdução de uma população de cochonilha da região Sul no município de Louveira (SP) (Figura 9). Essa hipótese é outra possibilidade de explicar a dissimilaridade genética revelada na análise de Máxima Parcimônia do gene 28S e na análise de RAPD.

**Figura 9** – Esquema representativo da hipótese (ii): interdependência de espécies regionais. Letras de A a L indicam possíveis plantas que já hospedavam a pérola-da-terra anteriormente à introdução da videira.



Diante desses cenários, a filogenia da pérola-da-terra só será esclarecida a partir da realização de estudos moleculares complementares, com a utilização de outros genes e também com estudos de taxonomia e biologia básica do grupo. Contudo, a partir da possibilidade de ocorrência de grupos distintos da pérola-da-terra no Brasil cabe uma rápida discussão a respeito do processo de especiação.

O processo de especiação é, em linhas gerais, um evento de separação de uma linhagem produzindo duas ou mais espécies distintas, sendo que o tempo para que isso ocorra irá depender do tipo de organismo e de sua estrutura populacional, podendo ser bastante rápida algumas vezes (FUTUYMA, 2003). Segundo Bush (1992) é comum ocorrer especiação simpátrica entre grupos de pequenos animais como insetos, ácaros e nematóides. Bush (1969) sugeriu esse tipo de especiação na mosca de frutas *Rhagoletis pomonella* (Walsh), que teria se diferenciado quando exploraram um novo hospedeiro (originalmente estrepieiro e posteriormente maçãs e cerejas, após a introdução dessas fruteiras). Esse fato demonstra que a mudança de hospedeiro pode levar a especiação do inseto.

Considerando esse fenômeno no contexto do presente estudo, pode-se fazer a seguinte pergunta: a espécie de pérola-da-terra presente em outras plantas hospedeiras, já observadas em 71 espécies (BOTTON et al., 2008), é a mesma espécie que ocorre na videira? A resposta só pode ser obtida a partir de estudos que levem em consideração as cochonilhas de outros hospedeiros. Boni et al. (2003) diagnosticaram diferença na variabilidade genética da pérola-da-terra em diferentes hospedeiros presentes em uma mesma área. Este é um primeiro indício de que os espécimes podem ser distintos em hospedeiros diferentes, a exemplo do que ocorreu com *R. pomonella*. Como a uva (*Vitis* sp.) não é nativa do Brasil, quando de sua introdução, a pérola-da-terra já poderia estar em outros hospedeiros e, assim, quando ela passou a explorar a uva, pode ter ocorrido uma especiação simpátrica.

Todavia, não temos dados para explorar essa pergunta, tão pouco para discutir a respeito da variabilidade genética da pérola-da-terra em hospedeiros distintos, podendo evidenciar apenas que existe uma diversidade genética na pérola-da-terra que coloniza videiras. Nossos resultados revelaram, ao mesmo tempo, a falta de conhecimento e a complexidade do grupo em questão. Também pode ser considerado o primeiro trabalho a discutir hipóteses acerca da origem da pérola-da-terra no Brasil.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

APPLIED BIOSTATISTICS INC. NTSYS pc Version 2.02i. Copyright (C). 1998.

BANDELT, H-J.; FOSTER, P.; RÖHL, A. Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. **Molecular Biology and Evolution**. v. 16, p. 37-48, 1999.

BONI, E. C.; GARRIDO, L. R.; MACHADO, C. A. E.; REVERS, L. F.; BOTTON, M.; SÓRIA, S. J. Análise da variabilidade genética de *Eurhizococcus brasiliensis* em diferentes hospedeiros utilizando marcadores RAPD. In: **Anais do X Congresso Brasileiro de Viticultura e Enologia**. Bento Gonçalves, RS. 2003.

BOTTON, M.; SCHUCK, E.; SORIA, S.J.; HICKEL, E.R. **Manejo de pragas na cultura da videira**. Bento Gonçalves: Embrapa Uva e Vinho, 2008. (Capacitação Técnica em Viticultura).

BUSH, G.L. Sympatric hoste hace formation and speciation in frugivorous flies of the genus *Rhagoletis*. **Evolution**, v. 23, p. 237-51, 1969.

BUSH, G.L. A reaffirmation of Santa Rosalia, or why are there so many kinds of small animals. In: EDWARDS, D.; LEES, D.R. **Evolutionary patterns and processes**. New York: Academic Press, 1992, p. 229-249.

CHONG, L. K.; TAN, S. G.; YUSOFF, K.; SIRAJ, S. S. Identification and characterization of Malaysian River catfish *Mystus nemurus* (C and V) by RAPD and AFLP analysis. **Biochemical Genetics**, v. 38, p. 63–76, 2000.

FIGUEIRA JÚNIOR, E. R. Nova praga da videira em São Paulo – *Eurhizococcus brasiliensis* (Hempel). **O Biológico**, São Paulo, v. 36, n. 9, p. 229-234, 1970.

FOLDI, I. Ground pearls: a generic revision of the Margarodidae *sensu stricto* (Hemiptera: Sternorrhyncha: Coccoidea). **Annual Society Entomology**. v. 41, n.1, p.81:125, 2005.

FUTUYMA, D.J. *Biologia Evolutiva*. 2ª Edição. Ribeirão Preto: FUNPEC-RP. 2003.

GALLOTTI, B. J. **Contribuição para o estudo e para o controle químico do *Eurhizococcus brasiliensis* (Hempel, 1922)**. 1976. Dissertação de Mestrado - Programa de Pós-Graduação em Entomologia, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 1976.



GUSMÃO, F. A.; HARAKAVA, R.; CAMPOS, A. E. C. Fire-Ants of the *Solenopsis saevissima* Species-Group (Hymenoptera: Formicidae) Nesting in Parks in the city of São Paulo: Identification Based on mtDNA Sequences and Morphological Characters. **Sociobiology**, v. 56, n. 2, 2010.

HAJI, F. N. P.; ALENCAR, J. A. Pragas da videira e alternativas de controle. In: **A viticultura no semi-árido brasileiro**. Petrolina: Embrapa Semi-Árido, 2000. p. 273-291.

HAJI, F. N. P.; LIMA, M. P. L.; ALENCAR, J. A.; BARBOSA, F. R.; FERREIRA, R. C. F.; MATTOS, M. A. A. Cochonilha Pérola-da-Terra: Praga Emergente na Cultura da Uva, no Submédio do Vale do São Francisco. **Embrapa Semi-Árido: Circular Técnica**, Petrolina, v. 78, p.8, 2004.

HAJI, F.N.P.; ALENCAR, J.A.; BARBOSA, F.R. Pragas. In: LIMA, M.T.; MOREIRA, W.A. **Uva de mesa. Fitossanidade**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2002. p.53-68.

HEBERT, P. D. N.; PENTON, E. H.; BURNS, J. M.; JANZEN, D. H.; HALLWACHS, W. Ten species in one: DNA barcoding reveals cryptic species in neotropical skipper butterfly *Astraptes fulgerator*. **PNAS**, v. 101, n. 41, p. 14812-14817, 2004.

HELLSTEN, M. E.; SUNDBERG, P. Genetic variation in two sympatric European populations of *Bosmina* spp. (Cladocera) tested with RAPD markers. **Hydrobiologia**, v. 421, p. 157–164, 2000.

HICKEL, E. R. Pragas da videira. In: BRAGA SOBRINHO, R.; CARDOSO, J. E.; FREIRE, F. C. O. **Pragas de fruteiras tropicais de importância agroindustrial**. Brasília: Embrapa SPI; Fortaleza: Embrapa CNPAT, 1998. p. 191-194.

HICKEL, E. R.; PERUZZO, E. L.; SCHUCK, E. Pirâmide etária e distribuição espacial da pérola-da-terra no Meio-Oeste Catarinense. **Agropecuária Catarinense**, Florianópolis, v. 22, n. 1, p. 61-68, 2008.

HICKEL, E.R.; PERUZZO, E.L.; SCHUCK, E. Controle da pérola-da-terra, *Eurhizococcus brasiliensis* (Homoptera: Margarodidae), através da desinsetização. **Neotropical Entomology**. v. 30, n. 1, p. 125-132, 2001.

HIGGINS, D. G.; BLEASBY, A. J.; FUCHS, R. Clustal V: Improved software for multiple sequence alignment. **Computer Applications in the Biosciences**. v. 8, p. 189-191, 1992.

KOVACS, B.; EGEDI, S.; BARTFAI, R.; ORBAN, L. Male specific DNA markers from African catfish (*Clarias gariepinus*). **Genetica**, v. 110, p. 267–276, 2001.

LOPES, R.; LOPES, M. T. G.; FIGUEIRA, A. V. O.; CAMARGO, L. E. A.; FUNGARO, M. H. P.; CARNEIRO, M. S.; VIEIRA, M. L. C. Marcadore moleculares dominantes (Rapid e Aflp). **Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento**, n. 29, p. 56-60, 2002.

LOURENÇÃO, A.L.; MARTINS, F.P.; ALARCON, L.C.M. Ocorrência de *Eurhizococcus brasiliensis* (Hempel) (Homoptera: Margarodidae) em videira no município de Louveira, estado de São Paulo. **Bragantia**, v. 48, n. 2, p. 205-208, 1989.

MALAUSA, T.; FENIS, A.; WAROT, S.; GERMAIN, J-F.; RIS, N.; PRADO, E.; BOTTON, M.; VANLERBERGHE-MASUTTI, F.; SFORZA, R.; CRUAUD, C.; COULOUX, A.; KREITER, P. DNA markers to disentangle complexes of cryptic taxa in mealybugs (Hemiptera: Pseudococcidae). **Journal of Applied Entomology**, p.1-14, 2011.

MATOS, C. S.; SCHUCK, E. Controle de pragas da videira. **Agropecuária Catarinense**, v. 1, n. 2, p. 12-14, 1988.

MATTA, S. L. S. F.; MORINI, M. S. C.; HILSDORF, A. W. S. Genetic relationship among *Camponotus rufipes* Fabricius (Hymenoptera: Formicidae) nests by RAPD molecular markers. **Acta Scientiarum**. v. 35, n. 1, p. 89-92, 2013.

MCCORMACK, G. P.; KEEGAN, B. F. Comparative analysis of three populations of the Brittle star *Amphiura filiformis* (Echinodermata: Ophiuroides) with different life history strategies using RAPD markers. **Marine Biotechnology**, v. 2, p. 100–106, 2000.

MILANEZ, J. M. Diagnóstico de pragas de solo do Estado de Santa Catarina. In: **Reunião Sul Brasileira de Pragas de Solo**, 2001, Londrina. Anais. Londrina: Embrapa Soja, 2001. p. 26-28.

MORALES, L. Relatos de ocorrências de pragas de solo no Estado do Paraná – 2001. In: **Reunião Sul Brasileira de Pragas de Solo**, 2001, Londrina. Anais. Londrina: Embrapa Soja, 2001. p. 28-32.

NAGARAJAN, M.; HANIFFA, M. A.; GOPALAKRISHNAN, A.; BASHEER, V. S.; ABDUL MUNEEER, P. M. Genetic variability of *Channa punctatus* populations using randomly amplified polymorphic DNA. **Aquaculture Research**, v. 37, p. 1151–1155, 2006.

NOVO, J. P. S. Pérola-da-terra. **O Estado de São Paulo**, São Paulo, 1978. (Suplemento Agrícola).

PENNER, G. A.; BUSH, A.; WISE, R.; KIM, W.; DOMIER, L.; KASHA, K.; LAROCHE, A.; SCOLES, G.; MOLNAR, S. J.; FEDAK, G. Reproducibility of Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) Analysis among Laboratories. **Genome Research**, v. 2, p. 341-345, 1993.

PREMANANDH, J.; PRIYA, B.; PRABAHARAN, D.; UMA, L. Genetic heterogeneity of the marine cyanobacterium *Leptolyngbya valderiana* (Pseudanabaenaceae) evidenced by RAPD molecular markers and 16S rDNA sequence data. **Journal of Plankton Research**, v. 31, n. 10, p. 1141–1150, 2009.

RIDLEY, M. **Evolution**. Oxford: Blackwell, 2003. 768 p.

ROMÁN, B.; ALFARO, C.; TORRES, A. M.; MORENO, M. T.; SATOVIC, Z.; PUJADAS, A.; RUBIALES, D. Genetic relationships among *Oranbanche* species as revealed by RAPD analysis. **Annals of Botany**, v. 91, p. 637- 642, 2003.

ROSS, K. G.; GOTZEK, D.; ASCUNCE, M. S.; SHOEMAKER, D. D. Species delimitation: a case study in a problematic ant taxon. **Systematic Biology**, v. 59, p. 1-23, 2009.

SHOEMAKER, D. D.; AHRENS, M. E.; ROSS, K. G. Molecular phylogeny of the fire ants of the *Solenopsis saevissima* species-group based on mtDNA sequences. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 38, p. 200-215, 2006.

SHOEMAKER, D. D.; KELLER, G.; ROSS, K. G. Effects of *Wolbachia* on mtDNA variation in two fire ant species. **Molecular Ecology**, v. 12, p. 1757-1772, 2003.

SIMON, C.; FRATI, F.; BECKENBACH, A.; CRESPI, B.; LIU, H.; FLOOK, P. 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.

SMITH, J.J.; SCOTT-CRAIG, J.S.; LEADBETTER, J.R.; BUSH, G.L.; ROBERTS, D.L.; FULBRIGHT, D.W. Characterization of Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) products from *Xanthomonas campestris* and some comments on the use of RAPD products in Phylogenetic analysis. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 1.3, n. 2, p. 135-145. 1994.

SORIA, S. J.; DAL CONTE, A. F. Bioecologia e controle das pragas da videira no Brasil. **Entomologia y Vectores**, v. 7, n. 1, p. 73-102, 2000.

SORIA, S. J.; GALLOTTI, B. J. **O margarodes da videira *Eurhizococcus brasiliensis* (Homoptera: Margarodidae)**: biologia, ecologia e controle no Sul do Brasil. Bento Gonçalves: Embrapa CNPUV, 1986. 22 p. (Circular técnica, 13).

SWOFFORD, D. L. **Phylogenetic analyses using parsimony, version 4.0b10**. Washington DC: Smithsonian Institution. 2003.

XIA, X. e XIE, Z. DAMBE: Data analysis in molecular biology and evolution. **Journal of Heredity**, v. 92, p. 371-73, 2001.

YAN, J.; LIU, S.; SUN, Y.; ZHANG, C.; LUO, K.; LIU, Y. RAPD and microsatellite analysis of diploid gynogens from allotetraploid hybrids of red crucian carp (*Carassius auratus*) X common carp (*Cyprinus carpio*). **Aquaculture**, v. 243, p. 49–60, 2005.

YOKOGAWA, T.; YAHARA, T. Mitochondrial phylogeny certified PGL (Paternal Genome Loss) is of single origin and haplodiploidy sensu stricto (arrhenotoky) did not involve from PGL in the scale insects (Hemiptera: Coccoidea). **Genes and Genetic Systems**, v. 84, p.57-66, 2009.

**APÊNDICE A** – Sequências de nucleotídeos de um fragmento amplificado com as combinações de primers F2R2 para as localidades de Flores da Cunha (FC), Louveira (LOU) e Indaituba (IND). Em negrito destacam-se as principais regiões semelhantes entre FC e LOU e divergentes de IND.

|     |                     |                     |                              |                     |                      |
|-----|---------------------|---------------------|------------------------------|---------------------|----------------------|
|     | ..... .....         | ..... .....         | ..... .....                  | ..... .....         | ..... .....          |
|     | 5                   | 15                  | 25                           | 35                  | 45                   |
| FC  | AATTGGTATA          | AATATTAATT          | CAAATAC <b>TTA</b>           | TTTTT <b>CAT</b> CA | <b>ACT</b> ACAATAA   |
| LOU | AATTGGTATA          | AATATTAATT          | CAAATAC <b>TTA</b>           | TTTTT <b>CAT</b> CA | <b>ACT</b> ACAATAA   |
| IND | AATTGGAATA          | AATATTAATT          | CAAATTTATA                   | TTTCTCTCA           | ACAACAATAA           |
|     | ..... .....         | ..... .....         | ..... .....                  | ..... .....         | ..... .....          |
|     | 55                  | 65                  | 75                           | 85                  | 95                   |
| FC  | TTAT <b>C--GCA</b>  | <b>ATC</b> CCTACAA  | GAATTAAAAT                   | CTTCAGATGA          | ATATTATCCT           |
| LOU | TTAT <b>C--GCA</b>  | <b>ATC</b> CCTACAA  | GAATTAAAAT                   | CTTTAGATGA          | ATATTATC-T           |
| IND | TTATTTGGCA          | GTTCCAACTA          | GAATTAAAAT                   | CTTTAGATGA          | ATAATATC-A           |
|     | ..... .....         | ..... .....         | ..... .....                  | ..... .....         | ..... .....          |
|     | 105                 | 115                 | 125                          | 135                 | 145                  |
| FC  | TTTAATAATA          | AAAAAAT <b>TAA</b>  | <b>AATAA-CATT</b>            | AATAACTATA          | TCGATCAATA           |
| LOU | TTTAATAATA          | AAAAAAT <b>TAA</b>  | <b>AATAA-CATT</b>            | AATAACTATA          | -CGATCAATA           |
| IND | TTTAATAATA          | AAAAAATCAA          | ATTCTTCACT                   | AATAACTATA          | TAGATCATTA           |
|     | ..... .....         | ..... .....         | ..... .....                  | ..... .....         | ..... .....          |
|     | 155                 | 165                 | 175                          | 185                 | 195                  |
| FC  | <b>G</b> -GATTTATC  | TCAATATTTA          | <b>CTA</b> TAGGAGG           | AT-AACTCGG          | <b>AATA</b> AATCTTA  |
| LOU | <b>G</b> -GATTTATT  | TCAATATTTA          | <b>CTA</b> TAGGAGG           | ATTAAGTAGG          | <b>AATA</b> AATTTTA  |
| IND | GAGATTTATT          | ATAATATTTA          | CATTAGGAGG                   | AATAACTAGG          | ACTAATTTTA           |
|     | ..... .....         | ..... .....         | ..... .....                  | ..... .....         | ..... .....          |
|     | 205                 | 215                 | 225                          | 235                 | 245                  |
| FC  | TCAAACCTCAT         | C-AATTAATT          | <b>CCA</b> ATCTACA           | C-GATACTTA          | TTAC <b>CGT</b> AATT |
| LOU | TCAAACCTCAT         | CGAATTAATT          | <b>CCA</b> ATCTACA           | TAGATACTTA          | TTAC <b>CGT</b> AATT |
| IND | TCAAACCTCTT         | C-AATTAATA          | ATAATCTCCA                   | T-GATACTTA          | TTATGTAATT           |
|     | ..... .....         | ..... .....         | ..... .....                  | ..... .....         | ..... .....          |
|     | 255                 | 265                 | 275                          | 285                 | 295                  |
| FC  | CG <b>CCC</b> ATTTT | <b>CAT</b> TATATTTT | TATCAATAGG                   | <b>-GG</b> TAATCTT  | TTC-AATCTT           |
| LOU | <b>-GCC</b> ATTTT   | <b>CAT</b> TATATTTT | TATCAATAGG                   | <b>-GG</b> TAATCTT  | TTCGAATTTT           |
| IND | AGCTCATT            | CACTATATTC          | TATCTATAGG                   | TAGTAATTTT          | TTC-TATTTT           |
|     | ..... .....         | ..... .....         | ..... .....                  | ..... .....         | ..... .....          |
|     | 305                 | 315                 | 325                          | 335                 | 345                  |
| FC  | TATAAGTATA          | ATATTTTGAT          | TT <b>CC</b> T- <b>TT</b> AT | TATTTCGAATT         | TATTTATAAA           |
| LOU | TATAAGTATA          | ATATTTTGAT          | TT <b>CC</b> T- <b>TT</b> AT | TATTTC-AATT         | TATTTATAAA           |
| IND | TATAAGAATA          | ATATTTTGAT          | TCCCTATTAA                   | TATTT-AATT          | TATTAATAAA           |
|     | ..... .....         | ..... .....         | ..... .....                  | ..... .....         | ..... .....          |
|     | 355                 | 365                 | 375                          | 385                 | 395                  |
| FC  | TATTAAAT-G          | ATTAAAA <b>TTC</b>  | CTAATTTATT                   | AATTTATTTA          | TTTACTATTA           |
| LOU | TATTAAATAG          | ATTAAAA <b>TTC</b>  | C-AATTTATT                   | AATTTATTTA          | TTTAC-ATTA           |
| IND | TCAAAAAT-G          | ATTAAAAATTT         | C-AATTTATA                   | AATATATTTA          | TTTAT-ATTA           |
|     | ..... .....         | ..... .....         | ..... .....                  | ..... .....         | ..... .....          |
|     | 405                 | 415                 | 425                          | 435                 | 445                  |
| FC  | ATATAA <b>CAT</b> T | TTTT <b>C</b> TCAA  | CATTTT <b>C</b> TT-          | --GGGAATAA          | AT <b>AGA</b> ATACC  |
| LOU | ATATAA <b>CAT</b> T | TTTT <b>C</b> TCAA  | CATTTT <b>C</b> TT-          | --AGGAATAA          | AT <b>AGA</b> ATACC  |

```

IND      ATATAATTTT TTTCCCCCAA CCTATTTTTT AGGGAAATAA ATAATATGCC
          ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
          455      465      475      485      495
FC       ACGACGACAT AATAACTATT CAAACTTCTT TATTTTATGA AATATAATTT
LOU      ACGACGACAT AATAACTATT CAAACTTCTT TATTTTATGA AATATAATTT
IND      CCGACGTCAT AATAATTATT CAAATTTTTT TATATTATGA AATATAATTT

          ....|....| ...
          505
FC       -CATCTTGGG ---
LOU      -CATCTTTGG GAA
IND      TCATCTTTGG GA-

```

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados obtidos no presente estudo revelaram que *Solenopsis invicta* é a espécie de formiga com maior frequência de ocorrência e abundância nos parreirais do Estado de São Paulo; contudo, os dados não suportaram a hipótese de que a presença de *Eurhizococcus brasiliensis* possa interferir na composição da comunidade ou então na predominância de alguma espécie. Mesmo assim, pelo conhecimento que se tem de que depois de instalada em certa localidade, a dispersão da pérola-da-terra pode se dar pelas formigas que se associam a cochonilha em busca do “honeydew”, seria interessante que fossem realizados estudos que envolvam a interação entre os táxons mais frequentes nos parreirais estudados: *Pheidole aberrans*, *P. subarmata*, *Brachymyrmex incisus* e *S. invicta* com a cochonilha a fim de diagnosticar se essas espécies transportam ninfas da pérola-da-terra, para que possa ser realizado o controle das formigas juntamente com o controle da cochonilha.

De acordo com a distribuição das espécies do gênero *Solenopsis* (PITTS, 2002), ficou nítido que *S. invicta* pode estar sobrepondo as áreas de ocorrência de *S. saevissima*, fato que merece um acompanhamento ao longo dos anos para verificar se haverá substituição ou não das espécies, ou ainda se ambas poderão ocorrer nos ambientes em que hoje não ocorrem.

A possibilidade da existência de mais de um grupo de espécies de pérola-da-terra também ficou evidenciado neste estudo. Dois métodos moleculares distintos corroboraram a presença de pelo menos dois “grupos de espécies” da cochonilha no Brasil, enquanto que até o momento, apenas uma espécie é registrada.

Diante de todas as dificuldades de caracterização molecular descritas ao longo do Capítulo 2, outro método que pode ser eficiente para a melhor diferenciação entre e dentro dos grupos é a utilização de técnicas mais modernas de sequenciamento (pirosequenciamento, por exemplo) que permitem sequenciar todo o DNA do organismo. Assim poder-se-ia identificar o genoma mitocondrial e desenhar primers específicos para a cochonilha. Entretanto, diante da grande diversidade genética que esse grupo de inseto deve apresentar, o pirosequenciamento de um único exemplar poderia não ser suficiente e, haveria necessidade de sequenciar pelo menos um exemplar de cada região de ocorrência. Deve-se levar em consideração também a necessidade da realização de estudos taxonômicos básicos para sustentar as inferências moleculares.

Finalmente, a realização do presente trabalho permitiu acrescentar novas informações à bibliografia especializada.