

JOSIANE TERESINHA CARDOSO

Morfologia, bioecologia e comportamento alimentar de *Pineus boernerii* Annand, 1928 (Hemiptera: Adelgidae) em *Pinus* spp. (Pinaceae)

Tese apresentada à Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, Área de Concentração em Entomologia, da Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Ciências Biológicas.

Orientadora: Profª. Dra. Sonia Maria Noemberg Lazzari.

Co-Orientador: Dr. Edson Tadeu Iede

Curitiba

2007

“O jovem que deseja ser cientista – e à ciência dedicar todo o seu tempo e amor – tem pelo menos três certezas: a de que morrerá um dia (como todo mundo), a de que não ficará rico (como quase todo mundo) e a de que se divertirá muito (como pouca gente).”

Dr. Newton Freire-Maia

Dedico

**Aos meus pais, José e Terezinha
por toda luta, apoio e amor
incondicional à família.**

**Ao meu marido Gladston,
pela presença em minha
vida.**

AGRADECIMENTOS

A Deus, que em Sua infinita bondade permitiu que eu cumprisse mais esta etapa de minha vida.

À Profª. Dra. Sonia M. N. Lazzari pela orientação, apoio e amizade durante todo o período de minha vida acadêmica.

Ao Curso de Pós-Graduação em Entomologia pelas oportunidades concedidas e aos professores por seus ensinamentos.

Ao CNPq pela bolsa fornecida durante o período de execução do curso.

À EMBRAPA - Florestas pelas facilidades concedidas durante a execução dos trabalhos de campo e no desenvolvimento dos testes de EPG. Agradeço em especial aos pesquisadores Edson Tadeu Iede, por todo o apoio e paciência durante o desenvolvimento da tese; a Susete R. C. Penteado pela preciosa ajuda na execução dos testes de EPG e das tabelas de vida e ao Edilson B. de Oliveira pela ajuda nas análises estatísticas da tese.

À Empresa Placas do Paraná/Arauco do Brasil, pela liberação da área para as coletas, pelo suporte técnico e logístico disponibilizados. Agradeço em especial aos funcionários que me auxiliaram, com muita paciência, durante todo o período de trabalho na Empresa.

Ao SIMEPAR pelo fornecimento dos dados meteorológicos de Curitiba, na pessoa do Sr. Osmar Stringari.

Ao Dr. Ernesto C. Prado pelos esclarecimentos e pelas dicas acerca do desenvolvimento da técnica e da interpretação dos gráficos de monitoramento eletrônico.

À pesquisadora Regina C. Z. de Carvalho pela orientação no capítulo de morfologia, pelas fotografias e também pelos conselhos, ensinamentos e amizade ao longo de todos estes anos de minha vida acadêmica.

À pesquisadora e grande amiga Daniéla C. Calado, pelos esclarecimentos e ajuda no desenvolvimento da técnica de biologia molecular. Agradeço também pelo apoio, pelas conversas e pelo incentivo durante todos esses anos.

Ao colega do Curso de Entomologia Jaime I. R. Fernández pelas sugestões e ajuda na confecção da análise multivariada.

À amiga Crisleide M. Lazzarotto pela ajuda em todo o desenvolvimento da tese e pelo apoio e palavras de incentivo durante os momentos de crise.

Às amigas e colegas do curso de Entomologia Mariza Bortolanza, Larissa R. Borges, Scheila R. M. Zaleski, Fabiane C. Ceruttii, Juliana da C. Nakajo, Miriam N. Morales, Elaine D. G. Soares e Amanda C. Pires, por todo o carinho e apoio demonstrados durante todo este período.

Ao Gladston pelo apoio, paciência e carinho. Agradeço também pela disponibilidade e paciência para realizar comigo todas as coletas para o capítulo de distribuição, ajuda sem a qual não seria possível realizar esta etapa do trabalho.

A toda a minha família pelo incentivo, carinho e paciência, e em especial aos meus irmãos Giovaní, pela ajuda durante as viagens a campo e Leandro pela ajuda nas coletas e nos experimentos de biologia.

SUMÁRIO

RESUMO	viii
ABSTRACT.....	x
INTRODUÇÃO GERAL	1
CAPÍTULO I - Caracterização morfológica de <i>Pineus boernerii</i> Annand, 1928 (Hemiptera: Adelgidae)	2
RESUMO	3
ABSTRACT	4
1. INTRODUÇÃO	5
2. MATERIAL E MÉTODOS	8
2.1. Morfometria	8
2.2. Microscopia eletrônica e ótica.....	9
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	11
3.1. Caracterização das colônias de <i>P. boernerii</i>	11
3.2. Caracterização morfológica dos ovos.....	11
3.3. Caracterização morfológica das ninfas	12
3.4. Caracterização morfológica das fêmeas adultas.....	19
4. CONCLUSÕES	25
5. BIBLIOGRAFIA	26
CAPÍTULO II - Biologia de <i>Pineus boernerii</i> Annand, 1928 (Hemiptera: Adelgidae), com tabelas de vida e de fertilidade e taxa de colonização em <i>Pinus</i> spp. (Pinaceae)	28
RESUMO	29
ABSTRACT	30
1. INTRODUÇÃO	31
2. MATERIAL E MÉTODOS	33
2.1. Coleta e criação de <i>Pineus boernerii</i>	33
2.2. Taxa de colonização de <i>Pineus boernerii</i> em diferentes espécies de <i>Pinus</i>	33
2.3. Biologia de <i>Pineus boernerii</i>	34
2.4. Parâmetros avaliados	34

3. RESULTADOS E DISCUSSAO	36
3.1. Taxa de colonização de <i>Pineus boernerii</i>	36
3.2. Parâmetros biológicos	38
3.3. Tabela de esperança de vida	40
3.4. Tabela de fertilidade	43
4. CONCLUSÕES	50
5. BIBLIOGRAFIA	51

CAPÍTULO III - Ocorrência, flutuação e distribuição de *Pineus boernerii* Annand, 1928 (Hemiptera: Adelgidae) em plantas de *Pinus* spp. (Pinaceae)

RESUMO	55
ABSTRACT	56
1. INTRODUÇÃO	57
2. MATERIAL E MÉTODOS	60
2.1. Monitoramento de <i>Pineus boernerii</i> em árvores adultas isoladas de <i>Pinus taeda</i> e <i>Pinus elliottii</i>	60
2.2. Monitoramento de <i>Pineus boernerii</i> em área de cultivo comercial de <i>Pinus taeda</i>	60
2.3. Distribuição de <i>Pineus boernerii</i> na área de plantio comercial de <i>Pinus taeda</i>	61
2.4. Distribuição de <i>Pineus boernerii</i> nos estratos da planta.....	62
2.5. Análise estatística	63
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	64
3.1. Flutuação sazonal de <i>Pineus boernerii</i> em árvores adultas de <i>Pinus</i> spp.	64
3.2. Flutuação sazonal de <i>P. boernerii</i> em área de cultivo comercial de <i>P. taeda</i>	68
3.3. Distribuição de <i>Pineus boernerii</i> na área de plantio comercial de <i>P. taeda</i>	71
3.4. Distribuição de <i>Pineus boernerii</i> nas árvores de <i>Pinus</i>	72
4. CONCLUSÕES	78
5. BIBLIOGRAFIA	79

CAPÍTULO IV - Uso da técnica de monitoramento eletrônico (EPG) para avaliar o comportamento alimentar de *Pineus boernerii* Annand, 1928 (Hemiptera: Adelgidae)

.....	82
RESUMO	83
ABSTRACT	84

1. INTRODUÇÃO	85
2. MATERIAL E MÉTODOS	88
2.1. Coleta e criação dos afídeos	88
2.2. Avaliação do comportamento alimentar de <i>Pineus boerner</i> pelo EPG	88
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	90
4. CONCLUSÕES	99
5. BIBLIOGRAFIA	100
CAPÍTULO V - Distribuição geográfica de <i>Pineus boerner</i> Annand, 1928 (Hemiptera: Adelgidae) e análise da variabilidade genética das populações	103
RESUMO	104
ABSTRACT	105
1. INTRODUÇÃO	106
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	110
2.1. Distribuição e amostragem de <i>Pineus boerner</i>	110
2.2. Extração do DNA	110
2.3. Iniciadores utilizados e amplificação do DNA	112
3. RESULTADOS	113
3.1. Distribuição geográfica de <i>Pineus boerner</i>	113
3.2. Variabilidade genética das populações de <i>Pineus boerner</i>	116
4. CONCLUSÕES	122
5. BIBLIOGRAFIA	123
CONSIDERAÇÕES FINAIS	128
ANEXOS	131

RESUMO

O pulgão-lanígero-do pinus, *Pineus boernerii* Annand, 1928 (Adelgidae) vem sendo detectado em áreas de reflorestamento de *Pinus* no Brasil, desde 2000, mas pouco se conhece sobre esta espécie no país. O presente trabalho teve por objetivos: caracterizar morfológicamente *P. boernerii*; avaliar seu desempenho biológico em diferentes espécies de *Pinus*; determinar sua ocorrência e flutuação sazonal em diferentes localidades; avaliar o padrão de colonização na planta hospedeira; caracterizar padrões de alimentação e verificar sua distribuição geográfica e variabilidade genética. A análise morfométrica e com microscopia ótica e eletrônica de varredura permitiram a caracterização das diferentes formas. As ninfas de 1º ínstar apresentam o corpo e apêndices mais alongados que as demais formas; antena com três segmentos com um rinário e pelos sensoriais no terceiro segmento antenal; e pêlos no ápice do 2º segmento tarsal. A partir do 2º ínstar, as ninfas tornam-se sésseis e perdem o 3º segmento antenal e os pêlos tarsais. As fêmeas ovíparas são ápteras e arredondadas e apresentam apenas um segmento antenal reduzido, com grupos de glândulas de cera no abdômen, no tórax e cabeça. A taxa de colonização de *P. boernerii* foi determinada em mudas *Pinus taeda* L., *Pinus elliottii* Engelman, *Pinus caribaea* Morelet e *Pinus maximinoi* H. E. Moore, sendo que o maior número de colônias foi registrado em *P. elliottii*, seguido de *P. taeda*, mas foi significativamente menor em *P. maximinoi*. Mudanças de *P. taeda* e *P. elliottii* foram infestadas com ovos de *P. boernerii* para o estudo da biologia. O tempo total de desenvolvimento e a fecundidade média de *P. boernerii* não diferiram significativamente nas duas espécies; a fecundidade média diária, no entanto, foi significativamente maior em *P. elliottii* e a taxa de mortalidade ninfal foi superior em *P. taeda*, resultando na diminuição da esperança de vida das ninfas. A capacidade inata da espécie de aumentar em número e a razão finita de aumento foram semelhantes nas duas espécies de plantas, evidenciando a mesma capacidade reprodutiva nos dois hospedeiros, porém, a taxa líquida de reprodução foi superior em *P. elliottii*. A flutuação sazonal de *P. boernerii* foi avaliada em duas áreas, uma em Curitiba, PR, com árvores mais velhas e isoladas, e outra em plantio comercial de *P. taeda*, com árvores de quatro anos de idade, em Campo do Tenente, PR. Foi feita a contagem absoluta dos ovos, ninfas e adultos, as quais ocorreram durante todo o ano, especialmente nos períodos de temperaturas amenas e baixa pluviosidade. A distribuição sazonal de *P. boernerii* mostrou que as infestações iniciam-se das bordas para o centro, com um nível de 20% a 38% de árvores atacadas na área estudada. A distribuição de *P. boernerii* mostrou que a espécie

coloniza preferencialmente o terço inferior da planta e a porção basal dos galhos. O monitoramento eletrônico (EPG), realizado com 22 fêmeas ovíparas, perfazendo 24 horas de registro para cada uma, demonstrou dois padrões distintos de ondas. A onda M representa a atividade extracelular dos estiletos, com um padrão irregular de ondas e baixa frequência, em torno de 1,0 Hz. O segundo padrão, chamado P, representa atividade intracelular, com frequência em torno de 4,0 Hz, sendo observada a excreção de *honeydew* que evidencia que a onda está relacionada à alimentação. A distribuição geográfica de *P. boernerii* foi realizada em diversas regiões bioclimáticas de Santa Catarina, Paraná e São Paulo, tendo sido registrada nas principais áreas de importância econômica para o cultivo de *Pinus* nos três estados, sendo que diversas localidades representam novos registros de ocorrência do pulgão-lanífero-do-pinus. Amostras de 19 populações destas áreas foram submetidas à análise molecular através da técnica de RAPD para determinar sua variabilidade genética. Dos diversos iniciadores testados, três (OPM-06, OPX-11 e OPY-10) revelaram diversas bandas, porém não foram diagnosticadas bandas polimórficas nas amostras. Um maior número de amostras e iniciadores, bem como outros tipos de marcadores moleculares, deverá ser analisado para este tipo de estudo. Esta pesquisa comprovou que *P. boernerii* encontra-se amplamente distribuída e adaptada às diversas regiões e espécies de *Pinus* cultivadas no Brasil. Apesar de não haver informações, até o presente momento, de que o inseto venha causando danos econômicos em áreas de plantio de *Pinus* no Brasil é importante que se faça o monitoramento da espécie nas regiões de maior interesse comercial, visando a detecção de surtos populacionais potencialmente que poderiam vir a ocasionar perdas.

ABSTRACT

The pine woolly aphid, *Pineus boernerii* Annand, 1928 (Adelgidae), has been detected in several areas of *Pinus* cultivation in Brazil since 2000; however, very little is known about this species in the country. This research had the following objectives: to characterize *P. boernerii* morphologically; to evaluate its biological performance on different species of *Pinus*; to determine its occurrence and seasonal fluctuation in different areas; to evaluate its colonization behavior on the plant; to characterize feeding patterns; and to evaluate its geographical distribution and genetic variability. The morphometric analysis and optical and electronic scanning microscopy were useful to characterize the different morphs. The 1st instar nymphs have the body and appendices proportionally longer than the other morphs; antennae with three segments with a rhinarium and sensorial hairs on the 3rd segment; and sensorial hairs on the 2nd tarsal segment. From the 2^o instar and later, the nymphs become sessile and have only 2 antennal segments and lose the tarsal sensoria. The oviparous females are apterae and round; the antennae bear only one segment; and they have groups of wax glands on the abdomen, head and thorax. The colonizing rate of *P. boernerii* was determined on seedlings of *Pinus taeda* L., *Pinus elliottii* Engelmann, *Pinus caribaea* Morelet and *Pinus maximinoi* H. E. Moore. The larger number of colonies was found on *P. elliottii*, followed by *P. taeda*. On the other hand, the colonization was significantly lower on *P. maximinoi*. Seedlings of *P. taeda* and *P. elliottii* were infested with eggs of *P. boernerii* to study the species biology. The total development time and average fecundity of *P. boernerii* were not significantly different on both host plants; the average daily fecundity, however, was significantly higher on *P. elliottii*, whereas the nymphal mortality was higher on *P. taeda*, what resulted on low life expectancy for the nymphs on this last species. The intrinsic rate of natural increase and the finite rate of increase were similar on both plant species, what indicates that this insect has the same reproduction capability on both. On the other hand, the net reproductive rate was larger on *P. elliottii*. The seasonal fluctuation of *P. boernerii* was evaluated in two different areas, the first in Curitiba, PR, with older isolate trees, and the second in a production area with four year-old trees, in Campo do Tenente, PR. It was counted the absolute number of eggs, nymphs, and adults; all phorms occurred all year around, especially during the periods of mild temperatures and low precipitation. The distribution experiment showed that the infestations start from the boards towards the center of the area; and the infestation level was around 20% to 38% in the commercial area. The colonies of *P. boernerii* were distributed mainly on the lower parts of

the plant and on the basal portion of the branches. The electronic penetration graph technique (EPG) was performed for 22 oviparous females for 24 hours for each one, and showed two distinct wave patterns. The low frequency (1.0 Hz) irregular waveform M represents the extra cellular activity. The other was the waveform P, which represents intracellular activities, with frequency of about 4.0 Hz; the excretion of honeydew indicates that this waveform is related to the feeding activity. The geographic distribution of *P. boernerii* was carried out in different bioclimatic regions in the states of Santa Catarina, Paraná and São Paulo. The insect was recorded in the major *Pinus* cultivation areas, and many of these places represent new records for the pine woolly aphid distribution. Samples of 19 populations from these areas were analyzed to evaluate their genetic variability using RAPD markers. From the several primers tested, only three showed nice bands (OPM-06, OPX-11 e OPY-10), however no polymorphism was detected in the samples. A larger number of samples and primers, as well as other types of molecular markers should be analyzed for this purpose. This research showed that *P. boernerii* is largely distributed in the *Pinus* cultivation areas and adapted to several bioclimatic regions in Brazil. Although there is no indication that the insect is causing economic losses in plantation in areas of *Pinus* in Brazil, it is important the monitoring of the species in commercially sensitive regions in order to prevent potentially dangerous populational outbreaks.

INTRODUÇÃO GERAL

O Brasil apresenta, atualmente, uma área de plantio de espécies de *Pinus* (Pinaceae) de, aproximadamente, 2 milhões de ha, principalmente nos estados da região Sul e no estado de São Paulo. O estabelecimento dessas áreas iniciou-se na década de 1930 visando suprir a indústria madeireira e de papel no país. As espécies *Pinus taeda* L. e *Pinus elliottii* Engelm têm sido as mais utilizadas na região sul, por apresentarem características adequadas à indústria e por se adaptarem melhor ao clima desta região.

Assim como ocorre em outras culturas, a monocultura intensiva das espécies de *Pinus* tem favorecido o estabelecimento de insetos exóticos, que encontram condições ideais para a sua sobrevivência, reprodução e dispersão, assumindo, muitas vezes, o caráter de praga. Isto se deve, principalmente, ao cultivo de áreas extensas de plantas com uma base genética restrita e à ausência quase que total de inimigos naturais, particularmente de espécies de pragas recém-introduzidas. Dentre estas espécies de insetos, destacam-se os afídeos (Hemiptera), que têm ocasionado prejuízos em viveiros de produção de mudas e em áreas de plantio recém-estabelecidas no Brasil.

A espécie de afídeo detectada mais recentemente no país *Pineus boernerii* Annand, 1928 (Hemiptera: Adelgidae) é conhecido como pulgão-lanífero-do-pinus. Este inseto apresenta um alto grau de dispersão e de colonização em diversas espécies de *Pinus*, sendo considerado como uma praga em várias partes do mundo, onde foi introduzido.

Devido à ausência de estudos da dinâmica populacional de *P. boernerii* na América do Sul, a presente pesquisa teve por objetivos: caracterizar morfológicamente ovos, ninfas e fêmeas adultas ovíparas de *P. boernerii*; avaliar sua biologia e taxa de colonização; determinar sua ocorrência e flutuação sazonal; estabelecer seu padrão de distribuição na planta hospedeira; caracterizar seus padrões de alimentação através de monitoramento eletrônico e estabelecer a ocorrência da espécie em diferentes regiões bioclimáticas, bem como a sua variabilidade genética.

As informações geradas nesta pesquisa deverão subsidiar futuros estudos visando aprofundar o conhecimento da bioecologia do inseto e de suas relações com suas plantas hospedeiras.

Capítulo I

Caracterização morfológica de *Pineus boerner* Annand, 1928 (Hemiptera: Adelgidae)

Caracterização morfológica de *Pineus boernerii* Annand, 1928 (Hemiptera: Adelgidae)

RESUMO

O pulgão-lanífero-do-pinus, *Pineus boernerii* Annand, 1928, representa a primeira espécie de Adelgidae (Hemiptera) registrada no Brasil. Este inseto coloniza exclusivamente espécies de plantas do gênero *Pinus*, formando colônias extensas, com fêmeas ovíparas ápteras, ovos e ninfas recobertos por lanugem branca, nos ramos e tronco. As fêmeas adultas e as ninfas, a partir do 2º instar, são sésseis; sendo que as ninfas de 1º instar são as únicas formas que se deslocam e, portanto, responsáveis pela dispersão da espécie. A taxonomia do grupo é bastante confusa, e a espécie tem sido descrita em várias partes do mundo com diferentes nomes. Devido ao recente estabelecimento de *P. boernerii* no Brasil, esta pesquisa teve o objetivo de estudar detalhadamente a morfologia do ovo, ninfa e adulto para possibilitar a identificação correta de *P. boernerii*, como base para outros estudos. Foi realizada a morfometria de dois caracteres dos ovos, 20 caracteres das ninfas de 1º instar e 16 das ninfas de 2º, 3º e 4º instares e das fêmeas ovíparas adultas. Microscopia ótica e eletrônica de varredura foram usadas para estudar as ninfas de 1º instar e as fêmeas adultas. As ninfas de 1º instar são facilmente diferenciadas das demais pelo formato alongado do corpo, são amareladas, com as pernas bem desenvolvidas e as antenas com três artículos antenais, com um rinário e pêlos apicais bem distintos no último segmento. As pernas apresentam um par de pêlos sensoriais no ápice do 2º segmento tarsal. A partir do 2º instar as ninfas são avermelhadas com o corpo arredondado; perdem o 3º segmento antenal e também os pêlos e as estruturas sensoriais do 2º segmento tarsal. A distinção entre o 2º, 3º e 4º instares foi feita através da análise canônica das características morfométricas. As fêmeas adultas apresentam o corpo bem arredondado com o ovipositor distinto; as pernas reduzidas em relação a seu tamanho; e apenas um artículo antenal, bem reduzido. As glândulas de cera são numerosas, principalmente, na região da cabeça; facilmente visíveis nas micrografias de varredura. Este estudo morfológico, usando microscopia ótica e de varredura, contribui para a identificação precisa de *P. boernerii* e para sua distinção de outras espécies de Adelgidae.

**Morphological characterization of *Pineus boernerii* Annand, 1928 (Hemiptera:
Adelgidae)**

ABSTRACT

The pine woolly aphid, *Pineus boernerii* Annand, 1928, represents the first Adelgidae species (Hemiptera) recorded in Brazil. This insect feeds exclusively on *Pinus* trees; forming extensive colonies of wingless adult oviparous females on the top of eggs and with many nymphs around them. The oviparous females and the nymphs of 2nd instar and older are sessile, whereas the 1st instar nymphs are crawlers and are responsible for dispersion. The taxonomy of this group is very confused, and has been described under different names in several regions. Since *P. boernerii* is a newly introduced insect in Brazil the objective of this research is to study, in details, the morphology of egg, nymphs and adults to help with its identification. The morphometry was based on two characteres for the egg, 20 for the 1st instar nymph, and 16 for the other nymphal instars and for the oviparous female. Optical and scanning electron microscopy were used to study characters of the 1st instar nymph and of the adult female. The 1st instar nymph can be easily distinguished from the other instars by its elongate diminute yellowish body, well developed legs, and antenna with three segments with a large rhinarium and distinct apical hairs on the last segment. The legs have a pair of sensorial hairs at the apex of the second tarsomere. After the 2nd instar, the nymphs become red and roundish; they lost the 3rd antennal segment and its sensorial structures and also the hairs on the second tarsomere. The distincion between the 2nd, 3rd and 4th instars was possible using canonical analisys. The oviparous female is round with a distinct ovipositor; the legs are reduced in relation to its size; and the antenna bears only one segment. The wax glands are numerous, mainly on the head, and easily seen on the electron micrographies. This morphological study using both, optical and scanning microscopy, is an important contribution for the identification of *P. boernerii* and to distinguish it from other Adelgidae species.

1. INTRODUÇÃO

O gênero *Pineus* Shimer, 1869 (Aphidoidea: Adelgidae) apresenta cerca de 29 espécies, caracterizadas principalmente pela presença de apenas quatro pares de espiráculos abdominais em contraste com o outro gênero desta família, *Adelges* Vallot, 1836 que apresenta cinco pares (Eastop 1966; Blackman & Eastop 1994; Havill & Foottit 2007).

As espécies de *Pineus* infestam exclusivamente plantas de Pinaceae dos gêneros *Picea* A. Dietr. e *Pinus* L., com exceção de *Pineus abietinus* Underwood e Balch, que tem o gênero *Abies* Mill. como planta hospedeira na América do Norte (Blackman & Eastop 1994). A maioria das espécies são holocíclicas, alternando as gerações entre os dois gêneros de hospedeiros, *Picea* como hospedeiro primário e *Pinus* como hospedeiro secundário; outras são anolocíclicas, colonizando principalmente o *Pinus*, seu hospedeiro secundário evolutivamente (Eastop 1966; Blackman & Eastop 1994; Havill & Foottit 2007). O ciclo anolocíclico nos adelgides ocorre mais facilmente nos hospedeiros secundários, uma vez que requer uma quantidade menor de mudanças, em relação à sua permanência no hospedeiro primário (Havill & Foottit 2007).

Segundo Havill & Foottit (2007), os Adelgidae apresentam, de maneira geral, uma redução de caracteres morfológicos, como segmentos antenais e pernas e uma perda na variação interespecífica, principalmente nas formas adultas, o que torna difícil a identificação de muitas espécies.

No Brasil, foi registrado, recentemente, o pulgão-lanífero-do-pinus, *Pineus boernerii* Annand, 1928, que representa a primeira espécie da família Adelgidae introduzida no País (Penteado *et al.* 2004). Esta espécie foi inicialmente detectada no sul do país, no ano de 2000 e hoje está amplamente distribuída no sul e sudeste, até Minas Gerais (Penteado *et al.* 2004, Wilcken *et al.* 2004).

Pineus boernerii foi descrita, inicialmente, infestando *Pinus radiata* D. Don, na Califórnia, porém, possivelmente tenha origem no leste asiático, onde sua planta hospedeira é *Pinus thumbergiana* Franco (McClure 1990). A sua taxonomia é bastante confusa, e possivelmente tenha sido descrita em várias partes do mundo com diferentes nomes.

A espécie *Pineus laevis* (Maskell, 1885) Börner, 1907 foi inicialmente descrita por Maskel em 1885 (McClure 1982) infestando três espécies exóticas de *Pinus* na Nova Zelândia. Segundo Eastop (1966) e McClure (1982) esta espécie seria, possivelmente, *P. boernerii*, a qual seria simplesmente uma sinonímia. Eastop (1966) descreve a presença de

duas espécies de *Pineus* na Austrália: *Pineus pini* Gmelin, 1790, ocorrendo em *Pinus sylvestris* L. e *P. laevis* ocorrendo em *P. radiata*, porém, o autor discute que não se conhecem caracteres para separar adequadamente os espécimens presentes nos dois hospedeiros, e que talvez se trate da mesma espécie de afídeo ou de ambas ocorrendo juntas. Tanton & Alder (1977) tratam *P. boernerii* como *P. laevis*, e trabalham com ambas as espécies formando o complexo *laevis/pini*. McClure (1982) discute a necessidade de se estudar o material tipo de *P. laevis* e *P. boernerii* comparados para confirmação de que sejam a mesma espécie ou não.

Blackman & Eastop (1994), no entanto, tratam *P. laevis* como uma sinonímia de *P. pini*. Segundo os autores, a espécie descrita por Maskel, 1895 (Blackman & Eastop 1994) seria, na verdade, *P. pini* e que ocorreria junto com *P. boernerii* na Austrália e na Nova Zelândia, cuja diferenciação morfológica seria complicada. As duas espécies também são confundidas na África (Blackman & Eastop 1994), e trabalhos publicados sobre *P. pini* podem referir-se a *P. boernerii* ou a ambas as espécies.

Segundo Blackman & Eastop (1994), *P. boernerii* pode ter sido descrita na Argentina como *Pineus havrylenkoi* (Blanchard 1944). O autor descreve a presença de fêmeas partenogenéticas ápteras e fêmeas sexúparas aladas, causando danos em *P. sylvestris*. Barnes *et al.* (1976), por sua vez, tratam a espécie como sendo, possivelmente, *P. pini*, na Rodésia.

Ainda, de acordo com Blackman & Eastop (1994), Yassen & Ghani (1971) podem ter descrito *P. boernerii* com o nome de *Pineus simmondsi* Yaseen & Ghani, 1971, baseando-se apenas em fêmeas partenogenéticas ápteras ocorrendo em *Pinus roxburghii* Sargent, no Paquistão.

Atualmente, a espécie *P. boernerii* encontra-se amplamente distribuída na América do Norte, Europa, Nova Zelândia, Austrália, Chile, África do Sul, Malásia, Taiwan, Quênia, Malawi e Paquistão (Blackman & Eastop 1994), infestando mais de 40 espécies de *Pinus*. No Brasil, *P. boernerii* foi observada em árvores de *Pinus taeda* L., *Pinus elliottii* Engelman e *Pinus caribaea* Morelet (Penteado *et al.* 2004, Wilcken *et al.* 2004).

As fêmeas adultas de *P. boernerii* caracterizam-se pelo tamanho pequeno (aproximadamente 0,76 mm), de cor marrom-avermelhada, apresentando glândulas de cera no tórax e na cabeça, sendo que não são conhecidas formas sexuadas para a espécie (Yassen & Ghani 1971; Zondag 1977; Blackman & Eastop 1994). McClure (1989) constatou grande variação de tamanho das formas jovens e adultas entre indivíduos de diferentes gerações de *P. boernerii*, nos Estados Unidos, em *Pinus resinosa* Soland. Os ovos e as ninfas de inverno foram menores que as de primavera-verão, porém, esse quadro se inverteu para as fêmeas

adultas, que se mostraram relativamente maiores no inverno e com uma maior taxa de fecundidade.

Como *P. boernerii* é um inseto recentemente introduzido no Brasil, representando a única espécie de Adelgidae detectada no país, esta pesquisa foi desenvolvida com o objetivo de estudar detalhadamente a morfologia do ovo, ninfa e adulto para possibilitar a identificação correta de *P. boernerii* como base para estudos futuros.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Morfometria

a) Obtenção das populações

As ninfas e parte dos adultos utilizados para a morfometria foram coletados em Adrianópolis, PR, em área de plantio de *P. taeda*, em julho/2006. Os ovos e parte dos adultos foram obtidos a partir da criação estoque mantida em mudas de *P. taeda* e *P. elliottii* no laboratório do Departamento de Zoologia da UFPR.

O instar das ninfas foi identificado a partir do número de exúvias presentes próximas a indivíduos isolados. As ninfas de 1º instar que ainda não haviam se estabelecido também foram consideradas. Selecionou-se apenas as fêmeas adultas que já continham ovos.

Os indivíduos selecionados foram fixados em álcool etílico a 70% antes da montagem das lâminas.

b) Preparação e montagem das lâminas

Os exemplares foram dispostos em placas de porcelana escavadas e deixados por um período de duas a 24 horas mergulhados em ácido láctico, dependendo do grau de esclerotinização. As lâminas semi-permanentes foram montadas com os indivíduos dispostos em ácido láctico. Colocou-se, entre a lâmina e a lamínula, um pequeno pedaço de lamínula para evitar que o inseto fosse danificado pelo peso do vidro.

c) Morfometria e análise dos resultados

Para os ovos, mediu-se o comprimento e a largura máxima de um total de 30 ovos. Para as ninfas de 1º instar foram medidos os seguintes caracteres: comprimento e largura do corpo; comprimento e largura dos segmentos antenais I, II e III; comprimento do pêlo apical da antena; comprimento e largura do fêmur III, da tíbia III e do 2º segmento tarsal III; comprimento do pêlo do 2º segmento tarsal III, comprimento e largura dos segmentos rostrais III e IV+V. Foram medidos 11, 17, 16 e 20 indivíduos, respectivamente dos instares 1, 2, 3 e 4.

Para as formas adultas (fêmeas adultas ovíparas), os caracteres medidos, de 16 espécimes, foram: comprimento e largura do corpo; comprimento e largura do segmento

antenal I, do fêmur III, da tibia III, do 2° segmento tarsal III, dos segmentos rostrais III e IV+V; comprimento da placa anal e comprimento do ovipositor.

Os indivíduos foram fotografados pelo sistema Window Canon Power Shot A620 e em seguida tiveram os caracteres medidos no programa Axion Vision 4,5.

As medidas foram tabuladas e submetidas à comparação de médias pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Os dados referentes à morfometria das ninfas de 2°, 3° e 4° instares foram submetidos à análise de variância.

Os dados de morfometria das ninfas foram submetidos à análise de componentes principais e análise de variáveis canônicas, com grupos variando de 10 a 16 indivíduos cada. Utilizou-se 16 variáveis comuns a todos os instares, cujos dados foram transformados em log 10. Espécimens que não apresentaram algumas das estruturas medidas foram eliminados das análises. O índice de Kappa que mede a concordância das medidas, foi calculado. As análises e gráficos foram confeccionados no Aplicativo Computacional JPM 3.2.2.

Lâminas permanentes de referência foram depositadas na Coleção de Entomologia Pe. Jesus Santiago Moure, do Departamento de Zoologia da UFPR (DZUP).

2.2. Microscopia eletrônica e ótica

a) Fotografias eletrônicas de varredura

Os espécimes foram obtidos a partir da criação estoque mantida em laboratório. Os ovos, as ninfas de 1° instar e as fêmeas adultas foram separados da colônia, limpos com um pincel fino de modo a retirar o máximo possível da cera e colados diretamente nos suportes, utilizando-se fita dupla-face. Após a fixação, o material sofreu metalização em ouro no metalizador SCD030 – Balzers Union FL 9496 no Centro de Microscopia Eletrônica de Varredura da Universidade Federal do Paraná. A observação dos exemplares foi feita no Instituto de Tecnologia para o Desenvolvimento (LACTEC) em um microscópio eletrônico de varredura marca Philips, modelo da série XL 30 com analisador por energia dispersiva de raios-X marca EDAX e modelo DX-4i.

b) Fotografias das colônias e das formas clarificadas

As colônias utilizadas para as fotografias foram obtidas a partir da criação estoque, de mudas de *P. taeda* de aproximadamente um ano de idade. As ninfas de 1° instar foram obtidas em Adrianópolis, PR, e as lâminas preparadas em ácido láctico, conforme descrito no item anterior. As fêmeas adultas foram coletadas em Buri, SP (setembro/2002) e Colombo, PR,

(outubro/2002) ocorrendo em *P. taeda* e em Coronel Domingues Soares, PR (janeiro/2005) em *Pinus gregii* Engelman. As lâminas foram preparadas a partir da técnica proposta por Martin (1983). As fotos de todas as formas foram tiradas em estereomicroscópio Zeiss com o sistema de câmera Window Canon Power Shot A620, no Laboratório de Fitoparasitologia do Centro de Diagnóstico Marcos Enrietti (CDME-SEAB).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Caracterização das colônias de *P. boernerii*

As colônias são formadas pelas fêmeas adultas, pelos ovos e, dependendo do grau de infestação, por ninfas que se instalam próximas às fêmeas das quais se originaram. Todo o conjunto é envolvido por uma grande quantidade de lanugem branca produzida pelas ninfas e adultas, conferindo um aspecto de algodão desfiado sobre as colônias (Figs. 1 A- F). Pode-se observar que, em colônias jovens, a lanugem apresenta uma tonalidade branca, enquanto em colônias velhas, onde uma grande quantidade ou todos os indivíduos estão mortos, a cera torna-se branca amarelada.

Os fios de cera começam a ser produzidos assim que ocorre a instalação da ninfa de 1° instar em seu sítio de alimentação, os quais a envolvem completamente após poucos dias. As exúvias ficam presas próximas às fêmeas pelo estilete e pelos fios de cera, tornando possível a determinação do instar das ninfas isoladas.

A infestação começa de forma pontual, com colônias isoladas. Pode-se observar que a maioria das ninfas de 1° instar procura sítios de colonização distante das fêmeas adultas, porém, à medida que a população vai aumentando, elas se instalam cada vez mais próximas uma das outras, até que se formam colônias contínuas na planta. A deterioração das colônias é evidenciada por uma grande quantidade de indivíduos mortos e pela presença de fungos associados.

3.2. Caracterização morfológica dos ovos

Os ovos de *P. boernerii* são ovais, de cor amarela (Figs. 1 D, E), quando recém-ovipositados, passando para uma coloração alaranjada até à eclosão da ninfa. São colocados agrupados, envoltos na lanugem produzida pela fêmea adulta; o cório é liso, não apresentando ornamentações (Fig. 5H).

O comprimento e a largura média (valor máximo e valor mínimo) foram, respectivamente, de 338,2 µm (299,7–388,7) e 173,0 µm (137,2–239,8). Estas medidas são maiores que os valores obtidos por McClure (1989) para os ovos desta mesma espécie nos Estados Unidos, variando de 250 a 320 µm de comprimento por 150 a 200 µm de largura, em diferentes gerações.

3.3. Caracterização morfológica das ninfas

As ninfas recém-eclodidas de *P. boerneri* têm coloração amarela (Fig. 1F), escurecendo a cada instar, chegando ao vermelho escuro no 4^o instar. Segundo descrição de Yassen & Ghani (1971), as ninfas de 1^o instar desta espécie apresentam coloração marrom clara, no Paquistão.

A forma do corpo das ninfas de 1^o instar é alongada (Figs. 3E; 5A, B), com uma relação média comprimento/largura do corpo de 1,79. A partir do segundo instar, o corpo assume um aspecto arredondado, com uma diminuição gradativa da relação comprimento/largura: 1,42 para o 2^o; 1,36 para 3^o e 1,34 para o 4^o instar. O comprimento e a largura de corpo foram significativamente diferentes de um instar para outro, exceto entre as ninfas de 2^o e 3^o instares (Tabela 1).

McClure (1989) também registrou diferenças significativas no tamanho e na largura do corpo entre os instares de *P. boerneri*, nos Estados Unidos, porém foram menores que o registrado neste trabalho. Também observou que as ninfas criadas durante o inverno eram menores do que aquelas de primavera/verão. No Paquistão, o tamanho do corpo das ninfas de 1^o instar foi mais próximo ao observado no presente trabalho, variando de 0,40 a 0,45 mm de comprimento por 0,23 a 0,27 mm de largura (Yassen & Ghani 1971).

As ninfas de 1^o instar apresentam antenas com três segmentos, com um rinário no terceiro segmento antenal e um par de pêlos curtos e um pêlo longo no ápice (Figs. 3G, 5G). A partir do 2^o instar, as ninfas não desenvolvem o terceiro segmento, com um encurtamento significativo no comprimento e na largura do segmento I (Tabela 1). A espécie *P. havrylenkoi*, descrita na Argentina, que supostamente poderia se tratar de *P. boerneri* (Blackman & Eastop 1994), apresenta um rinário na porção mediana e quatro rinários na porção pré-apical do terceiro segmento antenal das ninfas de 1^o instar, diferindo do que foi observado nas ninfas estudadas neste trabalho, e indicando que se tratam de espécies diferentes.

O segmento antenal II e as pernas posteriores tiveram o mesmo padrão de diminuição no tamanho de um instar para outro, porém, de maneira menos evidente (Tabela 1). As ninfas de 1^o instar apresentam um par de pêlos apicais no segundo segmento tarsal (Figs. 3H, 5F), os quais são perdidos após a primeira muda. Segundo Havill & Footitt (2007), as ninfas de 1^o instar dos Adelgidae sempre apresentam pernas e antenas mais longas que os demais instares, para poderem localizar sítios de alimentação na planta hospedeira. A presença de pêlos sensoriais e do rinário na ponta das antenas e de pêlos nas pernas das ninfas de 1^o instar,

provavelmente também esteja relacionada à sua função de selecionar sítios de alimentação, para o estabelecimento das futuras colônias. Como esse processo de estabelecimento ocorre principalmente durante esta fase, essas estruturas são perdidas posteriormente.

Não houve variação no comprimento dos segmentos rostrais III e IV+V nos diferentes instares, com exceção do segmento IV+V que foi mais longo na ninfa de 1° instar. A largura dos dois segmentos, no entanto, apresentou um aumento de um instar para outro, evidenciado pela diminuição das relações médias entre o comprimento e a largura do segmento III: 0,82 para o 1°; 0,70 para o 2°; 0,67 para o 3° e 0,65 para o 4° instar e entre o comprimento e a largura do segmento IV+V, que foi de 1,57; 1,26; 1,13 e 1,09, respectivamente, para o 1°, 2°, 3° e 4° instares.

Apesar da análise de variância (Tabela 2) ter mostrado diferença significativa em vários caracteres para as ninfas de 2°, 3° e 4° instares, o teste de Tukey (Tabela 1) mostra que apenas o comprimento do segmento antenal I e a largura do segmento rostral III tiveram as médias significativamente diferentes entre os três instares. A largura do segmento antenal I, o comprimento do segmento antenal II, do fêmur III e do segundo segmento tarsal foram capazes de diferenciar o 2° dos demais instares, enquanto o comprimento e a largura do corpo mostraram-se significativamente diferentes para o 4° instar. Analisando os valores máximos e mínimos (Tabela 1) obtidos, no entanto, pode-se verificar que há sobreposição dos valores encontrados, não sendo possível considerar essas características como sendo robustas para se diferenciar os instares de *P. boernerii*.

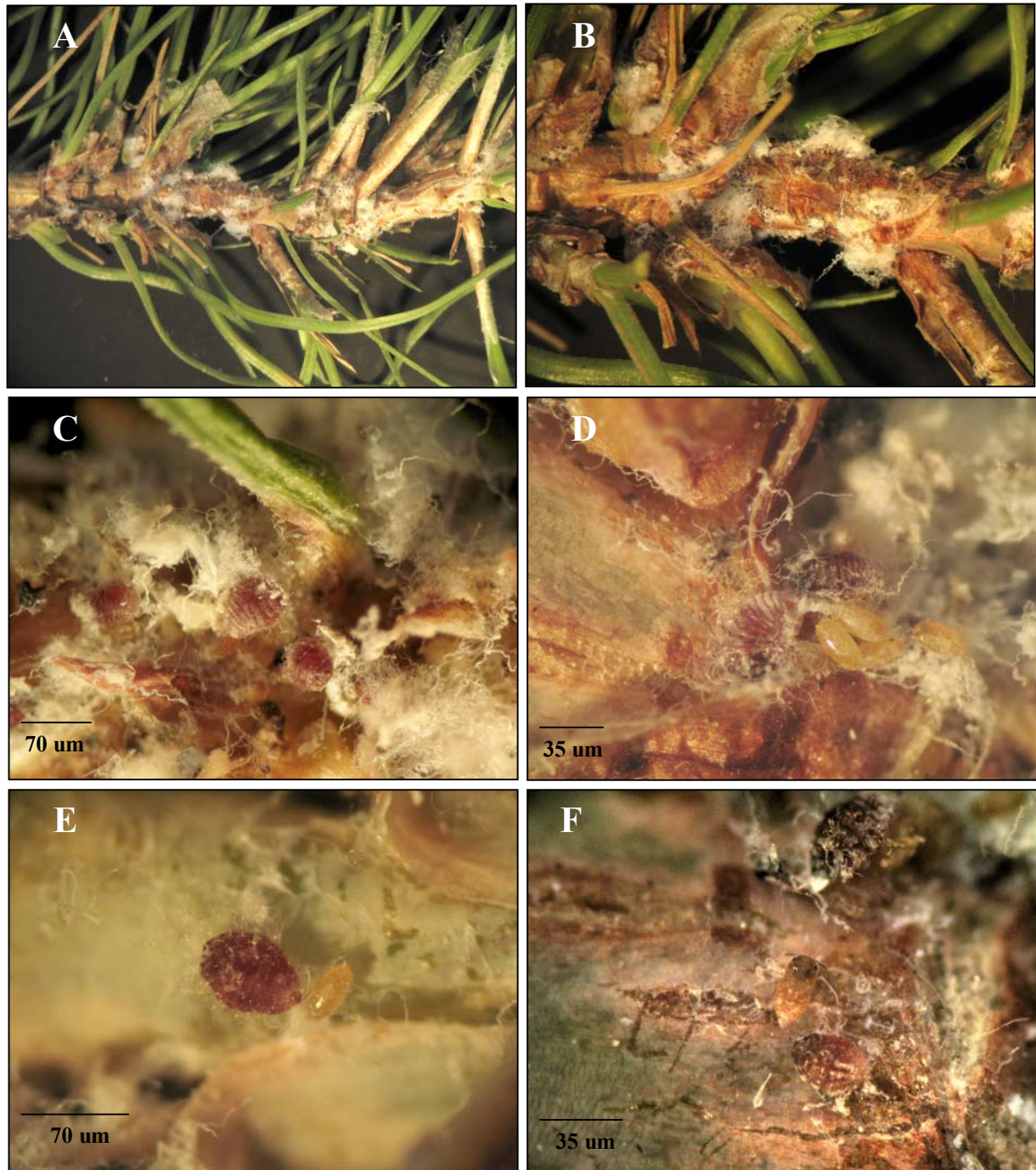


Fig. 1: Colônias de *Pineus boernerii* em mudas de 1 ano de idade de *Pinus taeda*. A e B: Aspecto da lanugem na planta. C: Posição das fêmeas adultas em meio à lanugem. D: Posição das fêmeas adultas e dos ovos em meio à lanugem. E: Fêmea adulta áptera e ovo. F: Ninfas.

Tabela 1: Medidas dos caracteres morfológicos (média ± erro padrão e medidas máxima e mínima) dos ínstarres ninfais de *Pineus boernerii* coletados no Paraná, Brasil.

Caracteres (mm)	Ínstar I (n = 11)	Ínstar II (n = 17)	Ínstar III (n = 16)	Ínstar IV (n = 20)
Comprimento do corpo	0,391 ± 0,78 c (0,358 – 0,448)	0,519 ± 0,10 b (0,456 – 0,617)	0,533 ± 0,10 b (0,468 – 0,603)	0,597 ± 0,65 a (0,532 – 0,642)
Largura do corpo	0,220 ± 0,6 c (0,175 – 0,255)	0,368 ± 0,11 b (0,288 – 0,480)	0,394 ± 0,83 b (0,394 – 0,421)	0,445 ± 0,55 a (0,390 – 0,488)
Comprimento segmento antenal I	0,22 ± 0,06 a (0,18 – 0,25)	0,16 ± 0,08 b (0,11 – 0,26)	0,11 ± 0,05 c (0,96 – 0,17)	0,94 ± 0,03 d (0,71 – 0,12)
Largura segmento antenal I	0,24 ± 0,06 a (0,19 – 0,27)	0,21 ± 0,07 b (0,16 – 0,27)	0,17 ± 0,05 c (0,15 – 0,21)	0,17 ± 0,06 c (0,14 – 0,22)
Comprimento segmento antenal II	0,24 ± 0,09 a (0,20 – 0,30)	0,20 ± 0,11 b (0,13 – 0,28)	0,12 ± 0,06 c (0,72 – 0,16)	0,11 ± 0,07 c (0,62 – 0,16)
Largura segmento antenal II	0,18 ± 0,05 a (0,17 – 0,23)	0,17 ± 0,06 ab (0,13 – 0,22)	0,15 ± 0,06 b (0,11 – 0,19)	0,15 ± 0,06 b (0,11 – 0,21)
Comprimento segmento antenal III	0,60 ± 0,08 (0,57 – 0,65)	-	-	-
Largura segmento antenal III	0,15 ± 0,04 (0,13 – 0,18)	-	-	-
Comprimento pêlo apical antena	0,34 ± 0,07 (0,30 – 0,37)	-	-	-
Comprimento Fêmur III	0,50 ± 0,09 a (0,46 – 0,55)	0,49 ± 0,07 a (0,44 – 0,53)	0,46 ± 0,09 b (0,36 – 0,52)	0,46 ± 0,07 b (0,40 – 0,52)
Largura fêmur III	0,22 ± 0,05 b (0,20 – 0,26)	0,27 ± 0,08 a (0,21 – 0,32)	0,27 ± 0,10 a (0,21 – 0,35)	0,25 ± 0,05 ab (0,22 – 0,30)
Comprimento tibia III	0,48 ± 0,12 a (0,43 – 0,55)	0,41 ± 0,12 b (0,33 – 0,51)	0,38 ± 0,17 b (0,27 – 0,48)	0,40 ± 0,08 b (0,33 – 0,46)
Largura tibia III	0,23 ± 0,11 ab (0,20 – 0,30)	0,23 ± 0,12 a (0,18 – 0,34)	0,20 ± 0,03 b (0,18 – 0,22)	0,22 ± 0,06 ab (0,18 – 0,28)
Comprimento 2° segmento tarsal III	0,23 ± 0,06 a (0,20 – 0,25)	0,19 ± 0,06 b (0,16 – 0,25)	0,16 ± 0,07 c (0,11 – 0,21)	0,16 ± 0,05 c (0,12 – 0,20)
Largura segundo segmento tarsal III	0,13 ± 0,03 a (0,11 – 0,15)	0,12 ± 0,04 ab (0,10 – 0,16)	0,11 ± 0,04 c (0,09 – 0,14)	0,11 ± 0,03 bc (0,09 – 0,14)
Comprimento pêlo tarsal III	0,25 ± 0,04 (0,22 – 0,27)	-	-	-
Comprimento segmento rostral III	0,33 ± 0,07 a (0,28 – 0,36)	0,33 ± 0,05 a (0,27 – 0,35)	0,34 ± 0,07 a (0,28 – 0,38)	0,34 ± 0,05 a (0,31 – 0,39)
Largura segmento rostral III	0,40 ± 0,06 c (0,35 – 0,43)	0,47 ± 0,11 c (0,39 – 0,54)	0,50 ± 0,06 b (0,44 – 0,55)	0,53 ± 0,05 a (0,49 – 0,57)
Comprimento segmento rostral IV+V	0,46 ± 0,09 a (0,43 – 0,52)	0,40 ± 0,05 b (0,35 – 0,44)	0,38 ± 0,07 b (0,33 – 0,43)	0,39 ± 0,04 b (0,36 – 0,42)
Largura segmento rostral IV+V	0,30 ± 0,08 c (0,24 – 0,34)	0,32 ± 0,08 bc (0,25 – 0,39)	0,33 ± 0,06 ab (0,29 – 0,37)	0,35 ± 0,04 a (0,34 – 0,39)

Letras minúsculas indicam diferenças estatísticas significativas nas linhas, pelo Teste de Tukey (p < 0,05%).

Tabela 2: Análise de variância dos caracteres morfométricos de ninfas de 2^o, 3^o e 4^o instares de *Pineus boernerii* coletadas no Paraná, Brasil.

Fontes de variação	GL	Quadrados médios (MS)	Valores de F
Comprimento do corpo	2	32283,0	22,6*
Largura do corpo	2	28596,3	23,1*
Comprimento segmento antenal I	2	211,0	33,0*
Largura segmento antenal I	2	71,9	12,1*
Comprimento segmento antenal II	2	368,9	34,0*
Largura segmento antenal II	2	20,6	3,5*
Comprimento Fêmur III	2	67,3	6,6*
Largura fêmur III	2	19,5	1,8
Comprimento tibia III	2	57,5	2,1
Largura tibia III	2	58,9	5,1*
Comprimento 2 ^o segmento tarsal III	2	54,6	7,4*
Largura segundo segmento tarsal III	2	50,3	2,6
Comprimento segmento rostral III	2	1,9	0,2
Largura segmento rostral III	2	212,8	10,6*
Comprimento segmento rostral IV+V	2	12,7	2,3
Largura segmento rostral IV+V	2	55,3	8,6*

* Significativo a 5% de probabilidade

Para a análise canônica foram utilizados cinco agrupamentos formados pela análise de correlação (Tabela 3) e que foram responsáveis por explicar 87,2% da variabilidade entre cada ínstar. Os principais componentes presentes em cada um dos grupos foram: o comprimento e largura do corpo e o comprimento dos segmentos antenais I e II, estruturas que, como verificado pela análise de variância, mostraram-se significativamente diferentes entre si (Tabela 2). Os cinco grupos formados a partir da análise de correlação foram submetidos à análise de variáveis canônicas e mostraram uma clara distinção entre quatro grupos: o primeiro contendo apenas ninfas de 1° ínstar, as quais se separaram claramente dos demais; o segundo formado em 94% por ninfas de 2° ínstar; o terceiro com 94% de ninfas de 3° e o quarto grupo contendo cerca de 93% de indivíduos do 4° ínstar (Tabela 4). O índice de Kappa foi de 0,93 evidenciando uma alta precisão dos dados analisados.

Tabela 3: Componentes principais utilizados para análise de variáveis canônicas de ninfas de *Pineus boernerii* coletadas no Paraná, Brasil.

Vetores	Componentes Principais				
Comprimento do corpo	-0,21094	0,32716	0,15552	0,02156	0,07405
Largura do corpo	-0,35887	0,50306	0,28327	0,00429	0,10728
Comprimento segmento antenal I	0,51999	-0,22473	0,60749	0,21731	0,41381
Largura segmento antenal I	0,21867	0,11383	-0,1203	0,10257	-0,1525
Comprimento segmento antenal II	0,57119	0,47722	0,03798	-0,60296	-0,18154
Largura segmento antenal II	0,15597	0,27194	-0,14841	0,33845	-0,16931
Comprimento Fêmur III	0,0622	0,10344	-0,05673	-0,01932	0,01564
Largura fêmur III	-0,05386	0,27392	0,44793	0,17226	-0,06801
Comprimento tibia III	0,15202	0,1934	-0,18841	0,46594	-0,15572
Largura tibia III	0,05095	0,21323	-0,44645	-0,06577	0,77041
Comprimento 2° segmento tarsal III	0,25593	0,07329	-0,19433	0,33135	-0,16242
Largura segundo segmento tarsal III	0,12144	0,17174	-0,07193	0,19735	0,27101
Comprimento segmento rostral III	0,11442	0,01049	-0,01678	0,17789	-0,01785
Largura segmento rostral III	-0,10548	0,17258	0,03296	0,12231	0,01883
Comprimento segmento rostral IV+V	0,0057	0,05481	0,00638	0,10249	0,04845
Largura segmento rostral IV+V	-0,14474	0,1959	0,07457	0,07967	0,03742
Valor	0,0666	0,0111	0,0056	0,0051	0,0039
Porcentagem	62,9561	10,4754	5,2779	4,7991	3,6582
Porcentagem acumulada	62,9561	73,4315	78,7094	83,5085	87,1667

Tabela 4: Contribuição de cada ínstar de ninfas de *Pineus boernerii* coletadas no Paraná, Brasil, para formação dos grupos visualizados através da análise de variáveis canônicas dos caracteres morfométricos.

	1 ^o ínstar (N=10)	2 ^o ínstar (N = 16)	3 ^o ínstar (N = 16)	4 ^o ínstar (N = 15)
Grupo 1	10 (100%)	0	0	0
Grupo 2	0	15 (94%)	0	0
Grupo 3	0	1 (6%)	15 (94%)	1 (7%)
Grupo 4	0	0	1 (6%)	14 (93%)
Índice Kappa	0,929			

As variáveis canônicas 1 e 2, responsáveis pela maior quantidade de variabilidade, foram plotadas graficamente (Fig. 2), sendo possível visualizar o agrupamento dos instares. Sendo assim, a análise canônica foi capaz de separar, de forma bastante precisa, os diferentes instares de *P. boernerii*, com apenas uma pequena margem de erro, que é devida a fatores não determinados. Ninfas de 2^o, 3^o e 4^o instares coletados em colônias contínuas, onde não é possível fazer sua distinção através da contagem de exúvias, podem ser separados através da análise multivariada, com a utilização de vários caracteres relacionados entre si. Essa distinção, no entanto, não é bastante clara quando se consideram apenas caracteres isolados, como ficou evidente pela análise de comparação de médias.

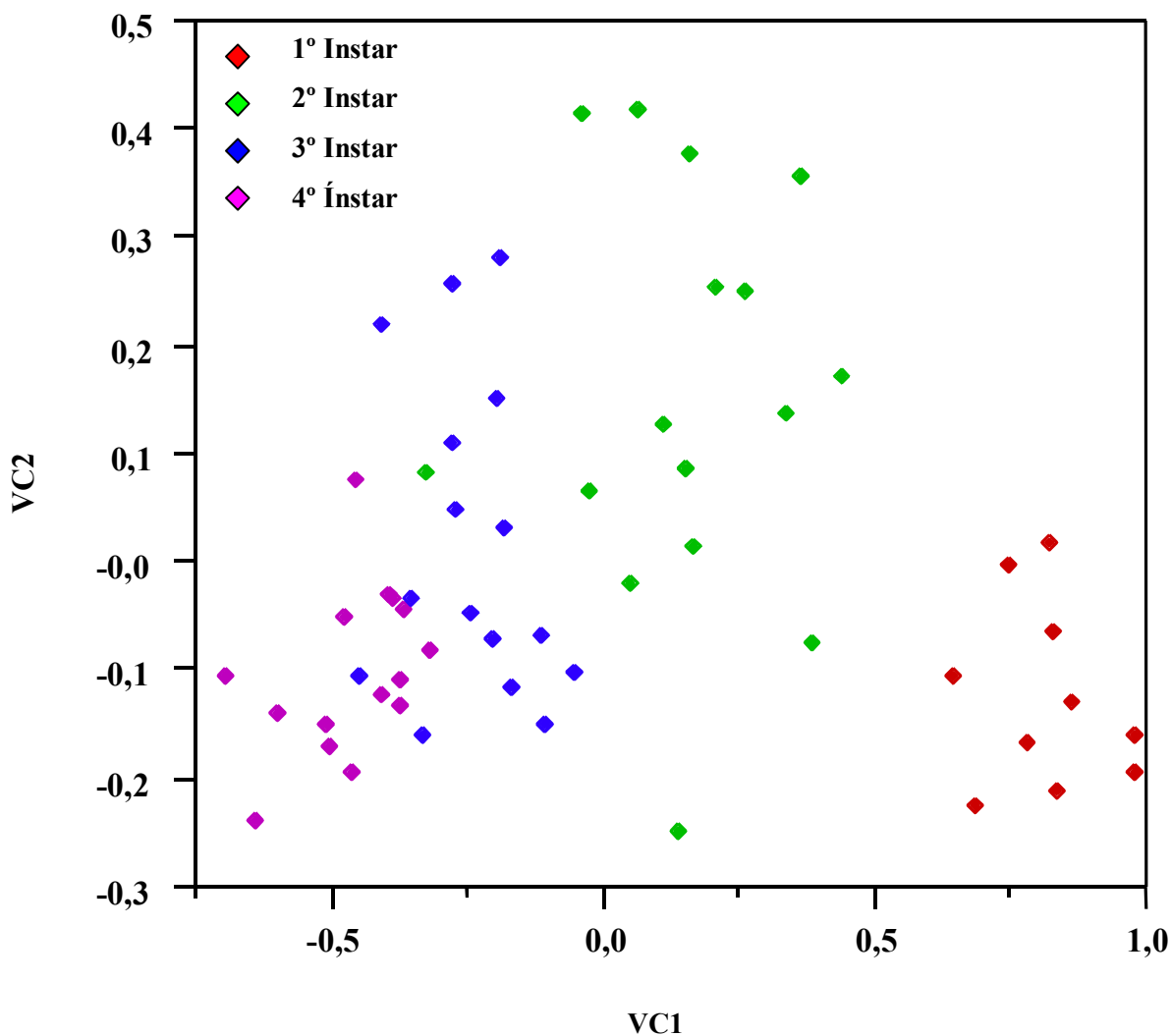


Fig. 2. Plotagem da primeira (VC1) e segunda (VC2) variáveis canônicas dos caracteres morfométricos de ninfas de *Pineus boernerii* coletadas no Paraná, Brasil.

3.4. Caracterização morfológica das fêmeas adultas

As fêmeas ovíparas, que são as únicas formas adultas observadas no Brasil, são sésseis e ápteras, apresentam forma arredondada (Figs. 3A, 4A), são maiores, vermelhas escuras (Figs. 1C – F) e se diferenciam das ninfas por apresentarem apenas um segmento antenal (Fig. 3C) e o ovipositor bem desenvolvido (Fig. 4F). Yassen & Ghani (1971) apresentam a coloração das formas adultas de *P. boernerii*, no Paquistão, como marrom amarelado.

Estas formas apresentam glândulas de cera, em grupos de tamanho variado e formato arredondado (Fig. 4C), na cabeça, no tórax e no abdome (Fig. 3A). Apresentam uma maior

quantidade de glândulas na cabeça (Fig. 3B, 4B), decrescendo gradativamente em número no tórax e abdome. As facetas que compõem as glândulas de cera não são subdivididas, e estão presentes em grupos de 2 a 10 na região entre os olhos, conforme descrito por Blackman & Eastop (1994), que complementam a informação, citando que os grupos medianos das glândulas estão freqüentemente presentes em dois ou mais tergitos abdominais.

O comprimento e a largura do corpo das fêmeas adultas diferiram significativamente das medidas das ninfas de 4^o ínstar (teste de Tukey 5%), variando de 0,55 a 0,82 mm e de 0,47 a 0,62 mm, respectivamente (Tabela 5). As medidas médias obtidas são menores que aquelas registradas por McClure (1989) para as fêmeas de *P. boernerii* em *P. resinosa* nos Estados Unidos: 0,74 a 0,94 mm de comprimento por 0,60 a 0,70 mm de largura, em diferentes gerações. No Paquistão, essas formas apresentaram-se também relativamente maiores: variando de 0,63 a 0,67 mm de comprimento por 0,61 a 0,67 mm de largura (Yassen & Ghani 1971). Na África, Mills (1990) encontrou formas adultas de *P. boernerii* com aproximadamente 1 mm de comprimento.

As fêmeas ovíparas de *P. boernerii* apresentaram apenas um segmento antenal, dado este corroborado por Yassen & Ghani (1971) para esta mesma espécie no Paquistão. Segundo a chave para afídeos do *Pinus*, proposta por Blackman & Eastop (1994), as fêmeas adultas partenogênicas ápteras de *P. pini* diferenciariam-se das fêmeas ovíparas de *P. boernerii* por apresentarem de dois a três segmentos antenais, articulados à cabeça. Segundo Blanchard (1944), as fêmeas adultas ápteras de *P. havrylenkoi* apresentam três segmentos antenais; este autor descreve também a sexúpura alada da espécie, forma não encontrada para *P. boernerii* em nenhuma parte do mundo, até o momento. Faz-se necessária a verificação da espécie tipo de *P. havrylenkoi*, porém, os dados encontrados neste trabalho, levam a acreditar que não se trata da mesma espécie (*P. boernerii*), como suposto por Blackman & Eastop (1994). Há possibilidade que seja *P. pini*, já que apresenta o mesmo número de segmentos antenais e formas sexuadas.

Tabela 5: Medidas dos caracteres em mm (média ± erro padrão e medidas máxima e mínima) de fêmeas adultas ovíparas ápteras de *Pineus boernerii* coletadas no Paraná, Brasil.

Caracteres	Fêmea Adulta
Comprimento do corpo	0,672 ± 0,17 (0,548 – 0,819)
Largura do corpo	0,535 ± 0,10 (0,470 – 0,621)
Comprimento segmento antenal I	0,17 ± 0,05 (0,14 – 0,20)
Largura segmento antenal I	0,18 ± 0,1 (0,13 – 0,29)
Comprimento Fêmur III	0,53 ± 0,09 (0,45 – 0,61)
Largura fêmur III	0,28 ± 0,09 (0,23 – 0,34)
Comprimento tibia III	0,47 ± 0,1 (0,35 – 0,54)
Largura tibia III	0,24 ± 0,1 (0,16 – 0,32)
Comprimento 2° segmento tarsal III	0,18 ± 0,08 (0,14 – 0,24)
Largura segundo segmento tarsal III	0,12 ± 0,03 (0,10 – 0,15)
Comprimento segmento rostral III	0,39 ± 0,07 (0,34 – 0,43)
Largura segmento rostral III	0,51 ± 0,1 (0,41 – 0,59)
Comprimento segmento rostral IV+V	0,42 ± 0,07 (0,39 – 0,47)
Largura segmento rostral IV+V	0,35 ± 0,07 (0,29 – 0,38)
Comprimento da placa anal	0,35 ± 0,1 (0,28 – 0,41)
Comprimento do ovipositor	0,63 ± 0,1 (0,57 – 0,74)

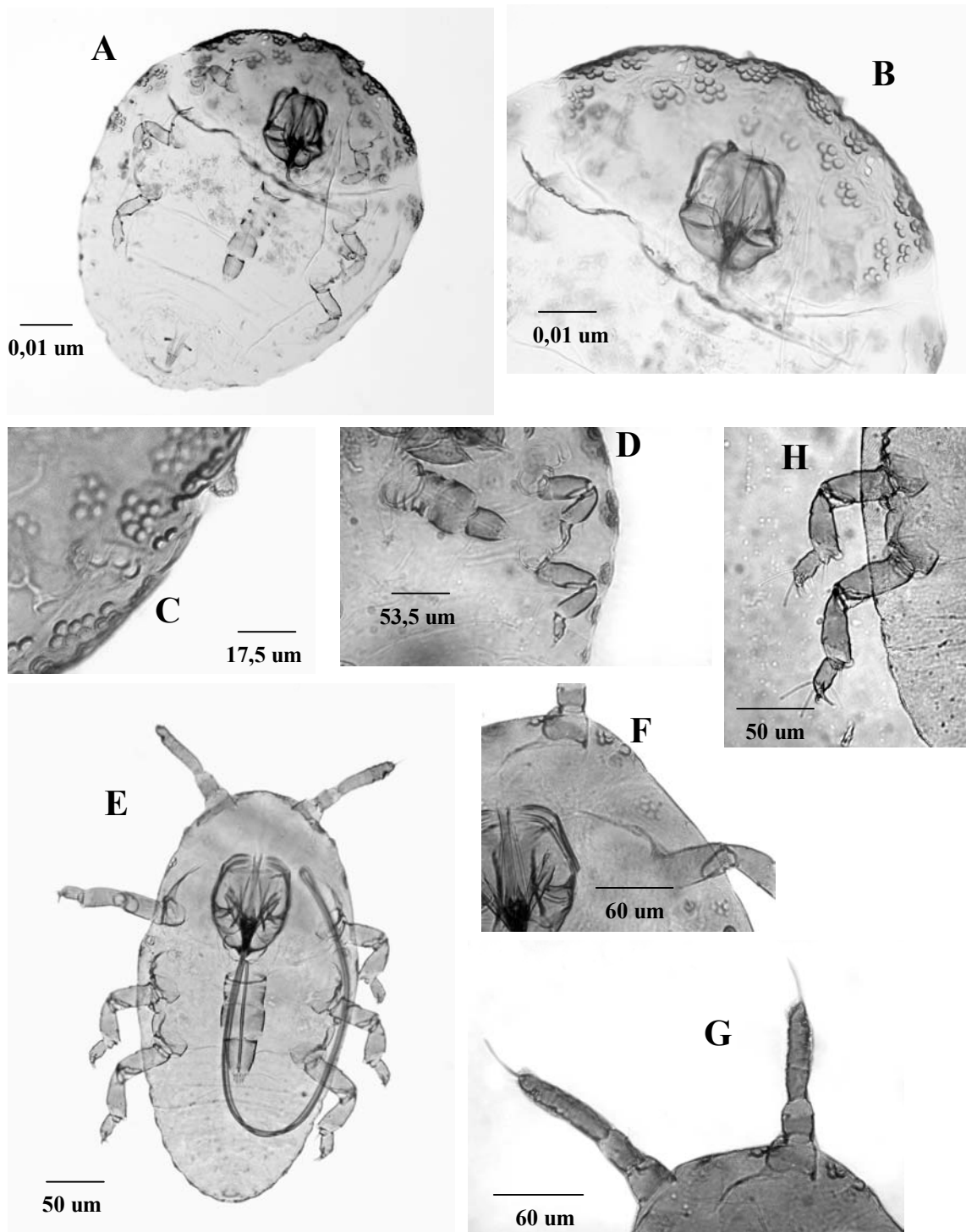


Fig. 3: *Pineus boernerii*: A – D: fêmea adulta áptera – A. Vista ventral, B. Cabeça, C. Antena, D. Pernas média e posterior; E – H: ninfa de 1º ínstar – E. Corpo vista ventral com os estiletes, F. Cabeça, G. Antena; H. Pernas média e posterior. Ver Tabelas 1 e 3 para as medidas.

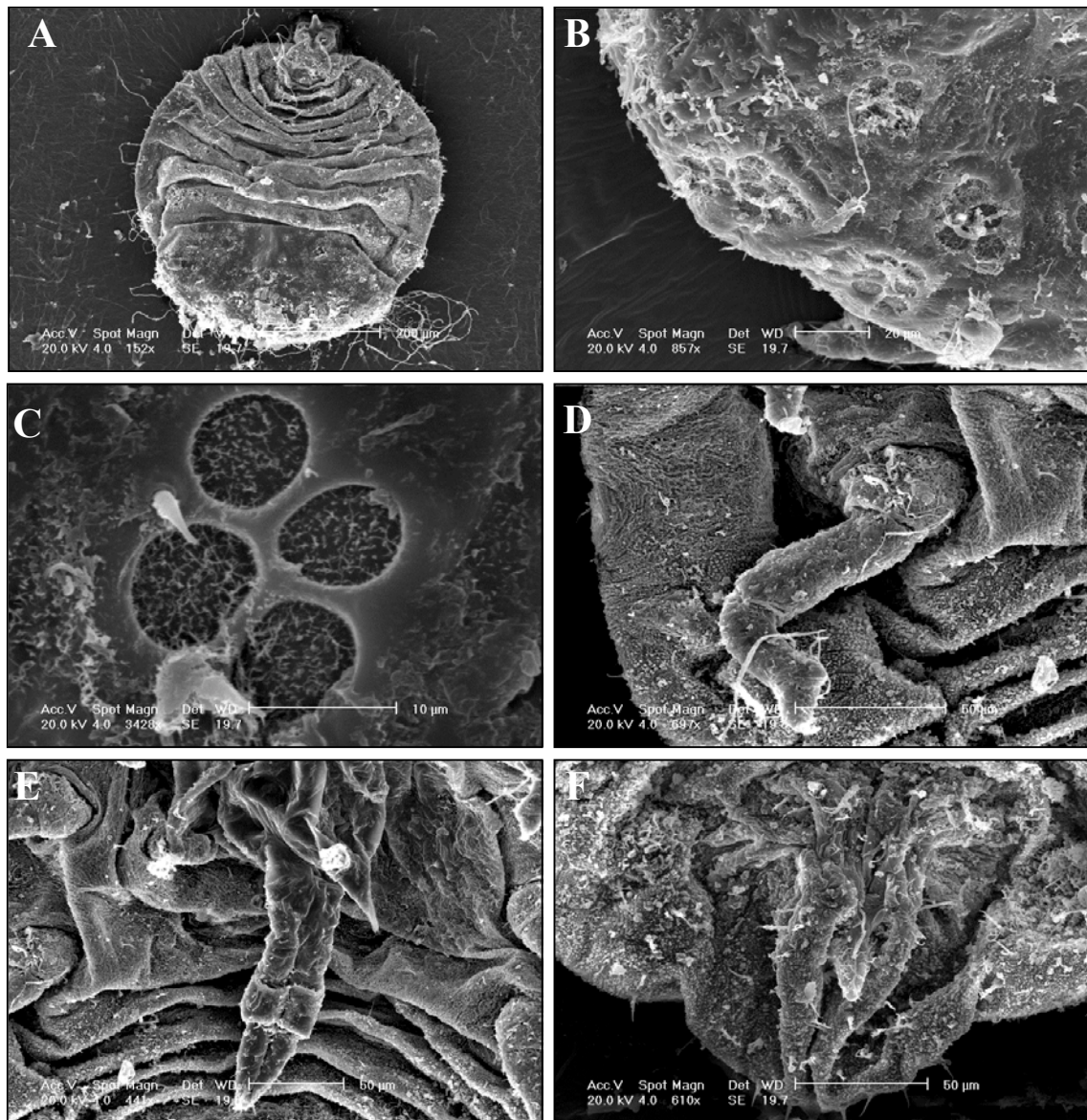


Fig. 4: Fêmea ovípara áptera de *Pineus boernerii* - A. Vista dorsal; B. Aspecto geral das glândulas de cera; C. Glândula de cera; D. Perna posterior; E. Rostro; F. Ovipositor.

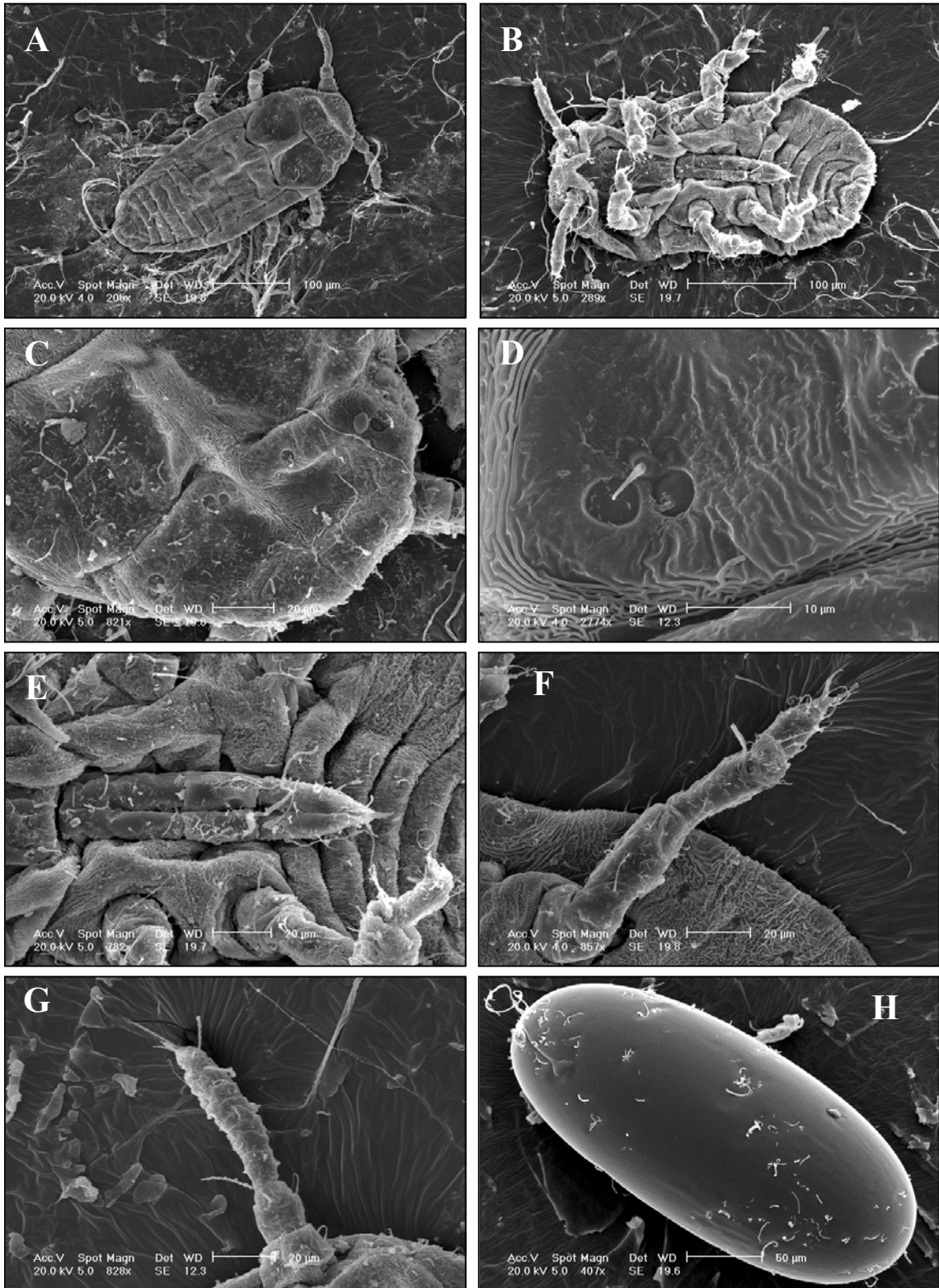


Fig. 5: *Pineus boernerii*: A – G: Ninfa de 1^o ínstar; A. Vista dorsal; B. Vista ventral; C. Cabeça; D. Glândula de cera; E. Rostro; F. Perna posterior; G. Antena; H. Ovo.

4. CONCLUSÕES

A colônia e todas as formas de *P. boernerii* são claramente caracterizadas pela morfometria e fotografias em microscópio ótico e/ou de varredura.

As ninfas de 1^o instar de *P. boernerii* são facilmente distinguidas dos outros instares, por diversos caracteres morfológicos.

Os caracteres morfométricos isolados não permitem diferenciar o 2^o, 3^o e 4^o instares, porém essa distinção pode ser feita através de uma análise de variáveis canônicas.

Há uma redução e modificação de diversas estruturas ao longo do desenvolvimento ninfal, em função do hábito sésil.

O número e tipo de agrupamento das glândulas de cera, que são caracteres importantes para a distinção dos gêneros e espécies de Adelgidae, são bem visíveis nas fotomicrografias de varredura.

5. BIBLIOGRAFIA

- Barnes, R. D.; R. F. Jarvis; M. A. Schweppenhauser & L. J. Mullin. 1976. Introduction, spread and control of the pine woolly aphid, *Pineus pini* (L), in Rhodesia. **South African Forestry Journal** **96**: 1 – 11.
- Blackman, R. L. & V. F. Eastop 1994. **Aphids on the world's trees: an identification and information guide**. Wallingford, CAB International, 987 p.
- Blanchard, E. E. 1944. Descripciones y anotaciones de afidoideos argentinos. **Acta Zoologica Lilloana, Parte II**: 15 – 62.
- Eastop, V. F. 1966. A taxonomic study of Australian Aphidoidea (Homoptera). **Australian Journal of Zoology** **14**: 399 – 592.
- Havill, N. P. & R. G. Foottit. 2007. Biology and Evolution of Adelgidae. **Annual review of Entomology** **52**: 325 – 349.
- Martin, J. H. 1983. The identification of common aphid pest of tropical agriculture. **Tropical pest management** **29**: 395 – 411.
- McClure, M. S. 1982. Distribution and damage of two *Pineus* species (Homoptera: Adelgidae) on red pine in New England. **Annals of Entomological Society of America** **75**: 150 – 157.
- McClure, M. S. 1989. Biology, population trends and damage of *Pineus boernerii* and *P. coloradensis* (Homoptera: Adelgidae) on red pine. **Environmental Entomology** **18**: 1066 – 1073.
- McClure, M. S. 1990. Cohabitation and host species effects on the population growth of *Matsucoccus resinosa* (Homoptera: Margarodidae) and *Pineus boernerii* (Homoptera: Adelgidae) on red pine. **Environmental Entomology** **19**: 672 – 676.
- Mills, N. J. 1990. Biological control of forest aphid pests in Africa. **Bulletin of Entomological Research** **80**: 31 – 36.
- Penteado, S. R. C., M. S. P. Leite, S. M. N. Lazzari, R. C. Zonta-de-Carvalho, W. Reis-Filho & E. T. Iede. 2004. Primeiro registro de *Pineus boernerii* Annand (Hemiptera: Adelgidae) em *Pinus* spp. (Pinaceae) no Brasil. **Anais do XX Congresso Brasileiro de Entomologia**, Gramado, RS.

- Tanton, M. T. & D. Alder. 1977. The distribution and possible effects of the woolly aphid *Pineus* (Homoptera: Adelgidae) on *Pinus radiata* D. Don growing in the Australian capital territory. **Australian Forest Research** 7: 253 – 263.
- Wilcken, C. F., N. C. Oliveira, R. C. Zonta-de-Carvalho, E. B. Couto & P. J. Ferreira-Filho. 2004. Ocorrência do pulgão lanígero do pinus *Pineus boernerii* (Hemiptera: Adelgidae) em plantios de *Pinus* nos estados de São Paulo e Minas Gerais. **Anais do XX Congresso Brasileiro de Entomologia**, Gramado, RS.
- Yaseen, M. & M. A. Ghani. 1971. Descriptions and notes on the biology of four new species of Adelgidae from West Pakistan. **Bulletin of Entomological Research** 61: 191 – 205.
- Zondag, R. 1977. *Pineus laevis* (Maskell) (Hemiptera: Aphidoidea: Adelgidae), pine twig chermes or pine woolly aphid. **New Zealand Forest Service, Forest and Timber Insects in New Zealand** 25. Compiled: 1977, limited revision 2001.

Capítulo II

Biologia de *Pineus boernerii* Annand, 1928 (Hemiptera: Adelgidae), com tabelas de vida e de fertilidade e taxa de colonização em *Pinus* spp. (Pinaceae)

Biologia de *Pineus boernerii* Annand, 1928 (Hemiptera: Adelgidae), com tabelas de vida e de fertilidade e taxa de colonização em *Pinus* spp. (Pinaceae)

RESUMO

A espécie *Pineus boernerii* Annand, 1928 (Hemiptera: Adelgidae) encontra-se amplamente distribuída no mundo, infestando mais de 40 espécies de *Pinus*. As condições climáticas e as características das plantas hospedeiras são os principais fatores que afetam o desenvolvimento das populações. O objetivo desta pesquisa foi determinar a taxa de colonização de *P. boernerii* em diferentes plantas hospedeiras e avaliar parâmetros biológicos do inseto quando criado em espécies comerciais de *Pinus* plantadas no Brasil. A taxa de colonização foi medida em mudas de *Pinus taeda* L., *Pinus elliottii* Engelman, *Pinus caribaea* Morelet e *Pinus maximinoi* H. E. Moore. Vinte e cinco mudas de cada espécie foram infestadas com 20 ovos e ninfas de 1^o instar; o número de colônias foi contado aos 30, 60 e 90 dias. A biologia de *P. boernerii* foi avaliada em 52 mudas de *P. taeda* e 46 de *P. elliottii*, infestadas com 10 ovos, e acompanhado o desenvolvimento completo das ninfas. *P. elliottii* apresentou o maior número de colônias, mas sem diferença significativa com *P. taeda*. A espécie mais resistente à infestação foi *P. maximinoi*, constatada pela elevada mortalidade das colônias até o final do período. O tempo total de desenvolvimento de *P. boernerii* não diferiu significativamente em *P. taeda* e *P. elliottii*, tendo sido, respectivamente, de 69,1 e 65,1 dias. O mesmo ocorreu com a fecundidade média, a qual foi de 39,9 ovos/fêmea em *P. taeda* e 52,9 em *P. elliottii*, porém, quando se considera a fecundidade média diária, houve diferença significativa entre *P. taeda* (1,3 ovos/dia/fêmea) e *P. elliottii* (1,8). A taxa de mortalidade ninfal foi mais alta em *P. taeda* (50%) do que em *P. elliottii* (28%). Esse padrão refletiu a esperança de vida de *P. boernerii*, que foi maior em *P. elliottii* para o estágio ninfal, mas semelhante para o estágio adulto. A capacidade inata de *P. boernerii* aumentar em número e a razão finita de aumento foram semelhantes, indicando que este inseto apresenta a mesma capacidade reprodutiva nos dois hospedeiros. A taxa líquida de reprodução foi significativamente mais alta em *P. elliottii* (23,8 ovos/fêmea) que em *P. taeda* (15,4). A maior taxa de sobrevivência ninfal e taxa reprodutiva em *P. elliottii* evidenciam que esta planta hospedeira é mais propícia para o desenvolvimento de *P. boernerii* que *P. taeda*, a qual pode ter algum fator de resistência não determinado nesta pesquisa.

Biology of *Pineus boernerii* Annand, 1928 (Hemiptera: Adelgidae), with life and fertility tables and colonization index on *Pinus* spp. (Pinaceae)

ABSTRACT

The species *Pineus boernerii* Annand, 1928 (Hemiptera: Adelgidae) has a worldwide distribution and infests more than 40 species of *Pinus*. The environmental conditions and host plant characteristics are the main factors affecting the biology of this species. This research was conducted to evaluate the insect biology and colonization rate on the commercial *Pinus* species planted in Brazil. The colonizing rate was determined for *Pinus taeda* L., *Pinus elliottii* Engelman, *Pinus caribaea* Morelet e *Pinus maximinoi* H. E. Moore. Twenty-five seedlings of each species were infested with 20 eggs and 1^o instar nymphs; the number of colonies was counted at 30, 60 and 90 days. The biology of *P. boernerii* was evaluated in laboratory, using 52 seedlings of *P. taeda* and 46 of *P. elliottii*, each one infested with 10 eggs; the nymphs were observed along their development. The largest number of colonies was observed on *P. elliottii*, however, the statistical analysis did not show significant difference compared to the *P. taeda* colonization. The most resistant species to *P. boernerii* infestation was *P. maximinoi*, verified by a high mortality of the colonies by 90 days. The total development time of the nymphs was not significantly different on *P. taeda* and *P. elliottii*, being, respectively, 69.1 and 65.1 days. The same trend was observed for the mean fecundity, with 39.9 eggs/female on *P. taeda* and 52.9 on *P. elliottii*. However, when the daily mean fecundity was considered, the difference was significant, being 1.3 eggs/female/day on *P. taeda* and 1.8 on *P. elliottii*. The nymphal mortality was greater on *P. taeda* (50%) than on *P. elliottii* (28%). These results reflected on the life expectancy of *P. boernerii*; for the nymphal stage it was higher on *P. elliottii*, but for the adult stage there was no significant difference between both host plants. The intrinsic rate of natural increase of *P. boernerii* to increase in number and the finite rate of increase were similar, what indicates that this insect shows the same reproductive capacity on both hosts, despite the net reproductive rate being much greater on *P. elliottii* (23.8 eggs/female) than on *P. taeda* (15.4). The highest nymphal survival rate and reproductive rate on *P. elliottii* indicate that this host plant is more suitable for the development of *P. boernerii* than *P. taeda*, which may have a non-determined resistance factor.

1. INTRODUÇÃO

A espécie *Pineus boernerii* Annand, 1928 (Hemiptera: Adelgidae) é exclusivamente ovípara anolócica. A fêmea ovípara, que é a única forma adulta conhecida, é áptera e sésil, e envolve os ovos entre fios de cera produzidos por glândulas presentes no tórax e na cabeça, mantendo-os próximos a si (McClure 1989b, Blackman & Eastop 1994). McClure (1989b) registrou quatro instares ninfais para a espécie nos Estados Unidos, enquanto Yassen & Ghani (1971) determinaram a presença de apenas três instares no Paquistão. As ninfas de 1º instar, chamadas de migradoras porque são as únicas formas móveis, são as principais responsáveis pela dispersão na planta e pela escolha dos sítios de alimentação (Blackman & Eastop 1994; McClure 1989a).

As condições climáticas e as características das plantas hospedeiras, juntamente com a ação de inimigos naturais e as características genéticas dos insetos, são os principais fatores capazes de alterar padrões no desenvolvimento biológico das populações. No Paquistão, Yassen & Ghani (1971) observaram a ocorrência de três a quatro gerações anuais de *P. boernerii*. Observaram também que as condições climáticas influenciam no período de incubação dos ovos, de pré-reprodução, de oviposição e na fecundidade da espécie. Períodos de latência foram observados para as ninfas de 1º instar durante o inverno. Nos Estados Unidos, McClure (1989b) detectou variações no período de desenvolvimento de *P. boernerii*, em diferentes épocas do ano.

Mailu *et al.* (1980) avaliaram a biologia de *P. boernerii* em condições de campo no Quênia, e encontraram uma mortalidade de 94% da população, com a maior perda ocorrendo na fase de ovos (72,5%), seguida das ninfas (18,6%) e dos adultos (2,9%). Os autores atribuíram o alto índice de mortalidade a fatores como infertilidade, ação de predadores, perda por dispersão, dessecação, excesso de chuvas, ação da resina e inanição.

A escolha do hospedeiro por um afídeo é um processo complexo, envolvendo uma grande variedade de fatores, dentre eles a espécie, idade e arquitetura da planta, que podem afetar a quantidade e qualidade dos nutrientes e, dessa forma, alterar os padrões de escolha dos insetos (Klingauf 1988; Smith *et al.* 1994). A planta pode, ainda, ser capaz de produzir formas de defesa químicas e físicas, as quais podem impedir que um inseto se estabeleça, torná-lo mais suscetível ao ataque de predadores ou a intempéries, ou ainda alterar seus padrões biológicos, podendo levá-lo mesmo à morte (Smith *et al.* 1994; Awmack & Leather 2002).

Na África do Sul, *P. boernerii* tem demonstrado preferência por *Pinus pinaster* Aiton, com uma média de 89,2% das árvores infestadas durante um período de 2,5 anos, seguido de *Pinus elliottii* Engelman, com 54,2% de infestação e *Pinus radiata* D. Don, com apenas 27,2% de árvores infestadas (Zwolinski 1990). O autor não encontrou correlação entre o diâmetro e a altura das árvores e o grau de infestação. Já, na Austrália, a espécie mostrou preferência por *P. radiata*, infestando menos *Pinus muricata* D. Don (Simpson & Ades 1990). Estes autores observaram variação na suscetibilidade de diferentes variedades de *P. radiata* e mesmo para diferentes plantações dentro de uma mesma variedade. Tanton & Alder (1977) também registraram diferenças na susceptibilidade de 49 clones de *Pinus* para o complexo *boernerii/pini*, na Austrália.

No Quênia, *Pinus halepensis* P. Mill. mostrou-se altamente suscetível ao complexo de espécies *boernerii/pini*, enquanto *P.elliottii*, *Pinus oocarpa* Schiede & Schltldl e *Pinus caribaea* Morelet mostraram-se moderadamente suscetíveis (Mailu *et al.* 1982 *apud* Mailu *et al.* 1980). Barnes *et al.* (1976) listam nove graus de suscetibilidade de espécies/subespécies de *Pinus* para *Pineus pini* Gmelin, 1790. Segundo os autores, ocorre um alto grau de variação não apenas entre diferentes espécies de árvores, mas também dentro de uma mesma espécie, caracterizando uma grande diversidade genética dentro de uma população de plantas.

Devido à escassez de dados sobre o desempenho biológico de *P. boernerii* em diferentes plantas hospedeiras, esta pesquisa teve por objetivos determinar a taxa de colonização e parâmetros biológicos do inseto nas principais espécies comerciais de *Pinus* do sul do Brasil.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Coleta e criação de *P. boernerii*

Colônias de *P. boernerii* foram coletados em árvores infestadas no Centro Politécnico da Universidade Federal do Paraná, em Curitiba, e em Campo do Tenente, PR, durante os anos de 2004 e 2005.

Mudas de 4 a 12 meses de *P. taeda* e *P. elliottii*, plantadas em tubetes e/ou garrafas plásticas de 1 L, foram infestadas com cerca de 20 a 50 ovos e ninfas de 1º instar de *P. boernerii*, retirados dos galhos trazidos do campo, com o auxílio de estiletes ou pincel fino. As mudas foram mantidas em laboratório e em casa de vegetação para formar a criação estoque para fornecer insetos para os experimentos. Repiques para mudas novas eram feitos a cada 4 – 5 meses, quando as colônias começavam a deteriorar-se.

Foram feitas tentativas para manter as mudas em temperaturas de 15°C, 20°C e 25°C, em câmaras de criação (tipo BOD) para realizar a biologia sob condições totalmente controladas, porém, as colônias não se desenvolveram de forma adequada, apresentando uma baixa taxa de colonização e uma alta taxa de mortalidade das ninfas, principalmente nas temperaturas de 15°C e 25°C.

2.2. Taxa de colonização de *P. boernerii* em diferentes espécies de *Pinus*

Quatro espécies de *Pinus*: *P. taeda*, *P. elliottii*, *P. caribaea* e *Pinus maximinoi* H. E. Moore foram estabelecidas em casa de vegetação com cobertura plástica, no Setor de Ciências Biológicas da UFPR, no período de maio a setembro de 2006.

Utilizou-se 25 mudas de cada espécie de *Pinus*, com aproximadamente oito meses de idade, as quais foram transplantadas em garrafas plásticas de 1 L com terra adubada com húmus e pó-de-xaxim. Após quinze dias, cada muda foi infestada com cerca de 20 ovos de *P. boernerii* retirados da criação estoque. As mudas de *Pinus* foram dispostas em blocos por espécie, sendo mantidas em contato, de forma a permitir a passagem das ninfas de uma planta para a outra no mesmo bloco. As plantas foram mantidas dentro de bandejas plásticas, as quais eram periodicamente molhadas, no chão da casa de vegetação e estavam dispostas de forma a receber a mesma quantidade de luz e vento.

Foram feitas três avaliações, contando-se o número de colônias aos 30, 60 e 90 dias; sendo as colônias classificadas em pequenas (com uma a duas fêmeas adultas), médias (com mais de duas fêmeas adultas) e grandes (colônias sobrepostas com várias fêmeas e sua prole).

2.3. Biologia de *P.boernerii*

Para este estudo foram utilizadas 58 mudas em tubetes de *P. taeda* e 42 de *P.elliottii*, com aproximadamente cinco meses de idade, mantidas em laboratório, no Departamento de Zoologia da UFPR. Bandejas contendo as mudas infestadas ficavam, ao acaso, em uma estante de aço, em frente à janela, de onde recebiam luz natural. Não havia contato entre as mudas, de modo a não permitir a passagem das ninfas de 1^o ínstar de uma planta para a outra.

A temperatura e a umidade relativa máxima e mínima do ambiente foram medidas diariamente. O primeiro teste ocorreu de maio a setembro de 2006, com *P. taeda*, quando as temperaturas médias máxima e mínima foram, respectivamente 22°C e 18°C. A umidade relativa média máxima, durante o período, foi de 60% e a mínima de 46%. O experimento com *P. elliottii* foi realizado de agosto a novembro de 2006, quando a temperatura média máxima foi 25°C e a mínima 19°C; a umidade relativa média máxima e mínima foram, respectivamente, 60% e 45%.

Para o início dos experimentos, fêmeas adultas foram selecionadas nas mudas da criação estoque, o local onde estavam presentes foi marcado com caneta hidrocor e elas foram isoladas das demais, de modo a facilitar a obtenção dos ovos a cada 24 h. Cada muda foi infestada com 7 a 10 ovos de uma mesma idade, sendo observadas diariamente até à eclosão das ninfas. A partir do segundo dia após a eclosão, as plantas eram examinadas sob lupa e o local onde as ninfas se estabeleciam era marcado com caneta hidrocor, pois eram diminutas e a marcação facilitava o acompanhamento diário do desenvolvimento de cada uma.

2.4. Parâmetros avaliados

Os parâmetros biológicos avaliados para *P. boernerii* foram: tempo de incubação e viabilidade dos ovos, número de ínstars e tempo de desenvolvimento ninfal, longevidade, fecundidade diária e fecundidade média das fêmeas adultas.

Os dados obtidos para ambos os experimentos foram tabulados, transformados em $\sqrt{x + 0,5}$, para análise de variância, e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Tabelas de esperança de vida e de fertilidade foram calculadas baseando-se em Silveira Neto *et al.* (1976) e Godoy & Cividanes (2002). A viabilidade dos ovos não entrou na contagem das tabelas de esperança de vida e de fertilidade, pois muitas ninfas de 1° instar dispersaram-se rapidamente e não foram mais localizadas nas plantas, de maneira que se considerou uma viabilidade dos ovos de 100%.

Para a confecção da tabela de esperança de vida, determinou-se a porcentagem de sobreviventes (L_x); o número de indivíduos mortos (d_x); a estrutura etária (E_x); a esperança de vida (e_x) e a probabilidade de morte na idade x ($100q_x$), onde:

$$E_x = [L_x + (L_x+1)]/2$$

$$e_x = T_x/L_x$$

$$100q_x = (d_x/L_x) \cdot 100$$

Para a confecção da tabela de fertilidade, considerou-se os valores de intervalo de idade (x), fertilidade específica (m_x) e probabilidade de sobrevivência (l_x) para o cálculo da taxa líquida de reprodução (R_0), do intervalo de tempo entre cada geração (T), da capacidade inata de aumentar em número (r_m), da razão finita de aumento (λ) e do tempo necessário para a espécie duplicar em número de indivíduos (TD), onde:

$$R_0 = \sum (m_x l_x)$$

$$T = (\sum m_x \cdot l_x \cdot x) / (\sum m_x \cdot l_x)$$

$$r_m = \log_e R_0 / T = \ln R_0 / T$$

$$\lambda = e^{r_m}$$

$$TD = \ln(2) / r_m$$

Os dados obtidos foram tabulados e os principais índices representados graficamente utilizando-se o aplicativo computacional Statistica versão 5.5. Os dados da tabela de esperança de vida foram comparados através do Teste G com 5% de significância.

As variâncias dos índices obtidos na tabela de fertilidade foram calculados através da estimativa "Jackknife" (Meyer *et al.* 1986), e tiveram as médias comparadas, entre os dois tratamentos, através do teste T a 5% de significância.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Taxa de colonização de *P. boernerii*

As mudas de *P. elliottii* e *P. taeda* apresentaram 100% de ataque, enquanto que *P. caribaea* e *P. maximinoi* apresentaram, respectivamente, 84% e 76% das mudas infestadas. Além disso, o número de colônias foi significativamente maior para *P. elliottii* em relação à *P. caribaea* e *P. maximinoi*, não diferindo significativamente de *P. taeda*. Esta informação é importante, pois, as espécies de *Pinus* que se mostraram mais suscetíveis à infestação por *P. boernerii* foram justamente *P. elliottii* e *P. taeda*, que são as espécies mais plantadas no sul do Brasil. Na África, *P. elliottii* é considerada altamente suscetível ao ataque de *P. pini*, enquanto *P. taeda* é moderadamente atacada (Barnes *et al.* 1976). Não houve diferença significativa entre *P. taeda* e *P. caribaea* durante todo o período avaliado, apesar da primeira apresentar, em todas as avaliações, um número maior de indivíduos.

Pode-se observar, ainda, que *P. maximinoi* não apresentou diferença significativa em relação à *P. taeda* e *P. caribaea* nos primeiros 60 dias de infestação (Tabela 1), porém, ao final desse período, *P. maximinoi* apresentou uma redução significativa no número de colônias em aproximadamente 46% das mudas, enquanto em *P. taeda* essa redução ocorreu em apenas 20% das mudas e *P. caribaea* em 25%, evidenciando a melhor capacidade de *P. boernerii* em se manter nestas espécies de plantas.

Tabela 1. Número médio de colônias (\pm erro padrão) de *Pinus boernerii* em 25 mudas de quatro espécies de *Pinus* em casa de vegetação, Curitiba, PR, no período de maio a agosto/2006.

	<i>P. elliottii</i>	<i>P. taeda</i>	<i>P. caribaea</i>	<i>P. maximinoi</i>
30 dias	3,8 \pm 0,39 a	3,0 \pm 0,44 ab	2,0 \pm 1,63 b	1,76 \pm 0,33 b
60 dias	10,16 \pm 1,15 a	7,24 \pm 1,15 ab	6,44 \pm 6,68 b	3,88 \pm 1,02 b
90 dias	18,12 \pm 1,77 a	16,36 \pm 2,31 ab	11,92 \pm 16,86 bc	6,17 \pm 2,36 c
Média Total	10,69 \pm 0,98 a	8,87 \pm 1,08 ab	6,97 \pm 1,31 bc	3,99 \pm 0,89 c

Letras minúsculas indicam diferenças significativas nas linhas, pelo Teste de Tukey ($p < 0,05\%$).

Na presente pesquisa, características de resistência podem ter se manifestado nas mudas de *P. maximinoi*, após o período de 60 dias, já que a taxa de mortalidade foi elevada e a taxa de colonização de *P. boernerii* passou a diferir significativamente de *P. caribaea* e *P. taeda*, porém não foi possível avaliar, neste trabalho, quais seriam essas características e de que maneira elas estariam se manifestando na planta hospedeira.

Nos Estados Unidos, *P. boernerii* apresentou padrões de fecundidade e sobrevivência superiores em *P. resinosa* quando comparados à sua planta hospedeira nativa, *P. thumbergiana* (McClure 1990). Essa superioridade poderia explicar parte do sucesso da espécie no país, onde ela veio a se tornar uma séria praga na década de 1980, enquanto em sua região de origem a espécie é inócua (McClure 1990). Na Austrália, *P. radiata* mostrou-se mais suscetível ao ataque de *P. boernerii* do que *P. muricata* (Simpson & Ades 1990). Os autores consideram que a diferenciação pode estar relacionada a características do genótipo da planta somada às condições ambientais. As características que podem levar uma planta a ser mais ou menos resistente ao ataque de uma determinada espécie de inseto vão desde características físicas (tricomas, casca, etc) e químicas (voláteis e outros compostos químicos que são produzidos em resposta a infestação pelo inseto) até condições de plantio, os quais podem acarretar mudanças anatômicas, químicas e nutricionais nas plantas hospedeiras (Thorsteinson 1960; Hanover 1975; Barnes *et al.* 1976; Simpson & Ades 1990; Smith *et al.* 1994; Collins *et al.* 2001; Smith 2005). Além disso, a capacidade do inseto vir a se tornar praga em determinados ambientes está diretamente relacionada, entre outros fatores, à capacidade de resistência da planta.

Apesar das duas espécies de *Pinus* mais cultivadas no sul do Brasil serem os hospedeiros preferenciais de *P. boernerii*, são as mais recomendadas para as regiões com maior produtividade tanto no Rio Grande do Sul, quanto em Santa Catarina e Paraná, por estarem melhor adaptadas ao bioclima dessas regiões (Golfari *et al.* 1978; EMBRAPA 1986, 1988). O plantio das variedades tropicais como *P. caribaea* e *P. maximinoi*, mais resistentes ao ataque do inseto, no sul do Brasil, estaria restrito à faixa litorânea de Santa Catarina e às regiões mais quentes do Paraná, como o litoral, a região do Vale do Ribeira, a região oeste e a região centro-norte (Golfari *et al.* 1978; EMBRAPA 1986, 1988).

Sendo assim, a avaliação dos cultivares mais utilizados comercialmente dessas espécies de *Pinus* quanto à seus fatores de resistência para *P. boernerii* poderiam auxiliar no estabelecimento de áreas comerciais mais resistentes à colonização do inseto.

3.2. Parâmetros biológicos

Do total de 58 mudas de *P. taeda* infestadas com ovos de *P. boernerii*, 48 apresentaram ninfas estabelecidas, ao final de 10 dias de infestação. Dos 522 ovos utilizados para infestar as mudas, 447 eclodiram, ou seja, 85,5%, porém, apenas 65 ninfas (12,5%) conseguiram estabelecer-se e iniciar uma colônia nas mudas, sendo que 52 foram acompanhadas durante todo o seu desenvolvimento.

No experimento com *P. elliottii*, das 42 mudas infestadas com 364 ovos de *P. boernerii*, 289 eclodiram (79%). Do total de ninfas eclodidas, 66 estabeleceram-se em 40 mudas (18%), e destas, 46 foram acompanhadas até o final de seu desenvolvimento.

Observou-se que, aparentemente, os principais fatores de mortalidade dos ovos foram a dessecação, a infertilidade e possivelmente dificuldade na manipulação devido ao seu tamanho diminuto. Mailu *et al.* (1980), avaliando a biologia de *P. boernerii* em condições de campo no Quênia, contaram uma média de 167 ovos/cm de galho, e após duas semanas contabilizaram apenas 46 ninfas de 1^o ínstar/cm do galho (27,5% do total). Os autores relacionaram os fatores de perda dos ovos à infertilidade, dessecação, excesso de chuvas, ação de predadores e outros fatores não determinados, porém, como observado no presente trabalho, pode ter ocorrido a dispersão e perda das ninfas recém-eclodidas nas plantas avaliadas.

O período médio de incubação dos ovos foi significativamente mais curto (Tabela 2) para *P. elliottii* em comparação a *P. taeda*. A espécie apresentou quatro instares ninfais, com apenas um dos espécimes com três instares, concordando com as observações de McClure (1989b) nos Estados Unidos em *P. resinosa*. Yassen & Ghani (1971), porém, detectaram apenas três instares de *P. boernerii* e outras espécies do gênero, em *Pinus roxburghii* Sargent, no Paquistão.

O tempo de desenvolvimento da ninfa de 1^o ínstar foi maior em *P. elliottii*. Com relação à duração de cada ínstar, o 1^o ínstar apresentou-se mais longo que os demais nas duas espécies de *Pinus*. A razão do período mais prolongado deste ínstar ocorreu em função da dispersão da espécie que se dá nesta fase, e como se observou, as ninfas levam até três dias para achar um local para se estabelecer. Yassen & Ghani (1971) encontraram um padrão similar para *P. boernerii* e *Pinus wallichianae* Yassen & Ghani, 1971, com as ninfas percorrendo as plantas por, respectivamente, 2 a 3 dias e 1 a 2 dias, antes de se estabelecerem. Já, McClure (1984) observou que as ninfas de 1^o ínstar de *P. boernerii* e de *Pinus coloradensis* Gillette 1907 encontravam rapidamente um sítio de alimentação após eclodirem.

Geralmente, depois que as ninfas iniciam o processo de alimentação em um determinado sítio, tornam-se sésseis e permanecem no mesmo local durante todo o período de vida, comportamento também observado por McClure (1984) para *P.boernerii* e *P. coloradensis*. Foi observado, entretanto, que quando ocorre a manipulação do local onde as ninfas estão se estabelecendo, principalmente nos primeiros dias, elas podem abandonar aquele sítio de alimentação. O fato de saírem do local marcado, torna bastante complicada a observação para o estudo da biologia desta espécie.

Tabela 2. Desenvolvimento de *Pineus boernerii* (média \pm erro padrão e intervalo de confiança a 95%) em duas espécies de plantas hospedeiras, sob condições de laboratório, Curitiba, PR, com temperatura média de 20°C para *P. taeda* e 22°C para *P. elliottii*, e UR média de 55%.

Parâmetros	<i>P. taeda</i> (n = 52)	<i>P.elliottii</i> (n = 46)
Ovos (dias)	7,5 \pm 0,1 b (7,2 – 7,8)	6,2 \pm 0,1 a (5,9 – 6,5)
1º instar (dias)	8,9 \pm 0,2 a (8,5 – 9,3)	11,0 \pm 0,3 b (10,5 – 11,63)
2º instar (dias)	5,8 \pm 0,2 a (5,3 – 6,3)	5,8 \pm 0,2 a (5,3 – 6,2)
3º instar (dias)	6,7 \pm 0,9 a (4,9 – 8,4)	5,4 \pm 0,3 a (4,8 – 6,0)
4º instar (dias)	5,1 \pm 0,5 a (4,1 – 6,2)	5,1 \pm 0,2 a (4,5 – 5,6)
Período ninfal total (dias)	24,5 \pm 0,8 a (22,9 – 26,0)	27,3 \pm 0,7 b (25,9 – 28,7)
Longevidade do adulto (dias)	37,4 \pm 4,6 a (27,94 – 46,82)	31,7 \pm 3,4 a (24,8 – 38,6)
Ciclo de vida (dias)	69,1 \pm 4,5 a (59,9 – 78,3)	65,1 \pm 3,5 a (57,9 – 72,4)
Período de oviposição (dias)	32,2 \pm 4,4 a (23,0 – 41,3)	27,2 \pm 3,1 a (20,8 – 33,6)
Fecundidade	39,8 \pm 6,5 a (26,4 – 53,3)	52,9 \pm 8,3 a (35,9 – 69,9)
Fecundidade média diária	1,3 \pm 0,1 a (1,1 – 1,6)	1,8 \pm 0,1 b (1,5 – 2,1)

Letras minúsculas indicam diferenças estatísticas significativas nas linhas, pelo Teste de Tukey (p < 0,05%).

A duração do ciclo de vida foi de aproximadamente 69 dias em *P. taeda* e 65 em *P. elliottii*, sem diferença significativa entre os dois hospedeiros. Odera (1972), *apud* Mailu *et al.* (1980), registrou um ciclo de 75 dias, em condições de campo, com a temperatura variando de

19°C a 24°C. McClure (1989b) observou um ciclo mais amplo, variando de 8 a 24 semanas, dependendo da geração observada.

3.3. Tabela de esperança de vida

Uma alta taxa de mortalidade (dx) de *P. boernerii* em *P. taeda* (Tabela 3) foi observada entre os dias 18 e 21 da vida dos insetos, com três indivíduos mortos e entre 21 e 24 dias, quando morreram seis indivíduos. A probabilidade de morte no primeiro caso foi de 6% e no segundo de 13,3%, sendo que estes dois períodos correspondem ao final do 1° instar e início do 2° juntos. Houve, também, um alto índice de mortalidade entre o 36° e o 39° dias, com cinco indivíduos mortos durante o período, o que corresponde a uma probabilidade de morte em torno de 15% e que está relacionado ao final do 4° instar e começo do estágio adulto. Desta forma, 50% das mortes ocorreram no período ninfal, com cerca de 31% no 1° instar, 27% no 2°, 15% no 3° e 27% no 4° instar.

Em *P. elliottii* (Tabela 4), as maiores taxas de mortalidade também ocorreram entre o 18° e o 21° dias e entre o 21° e o 24°, com três mortes em cada período, porém, a probabilidade de morte em ambas as idades foram menores quando comparadas a *P. taeda*, 6,8% para o primeiro e 7,3% para o segundo período. Este resultado indica que há melhor adaptação das ninfas sobre *P. elliottii*, apesar de não haver diferença significativa quanto ao número de colônias de *P. boernerii* entre as duas espécies de *Pinus* (Tabela 1). Também observa-se, na Tabela 4, que houve uma mortalidade elevada entre os dias 39 e 42, que corresponde, como ocorreu em *P. taeda*, ao final do 4° instar e início da idade adulta. A taxa de mortalidade para o período foi de 4 indivíduos, com uma probabilidade de morte de 13,3%. Em *P. elliottii*, 28% da mortalidade ocorreu no período ninfal, sendo 23% no 1°, 31% no 2°, 15% no 3° e 31% no 4° instar, índices bastantes semelhantes aos encontrados para a espécie em *P. taeda*.

Mailu *et al.* (1980) determinaram uma taxa de mortalidade aparente para as ninfas de *P. boernerii* de 67%, número relativamente superior ao encontrado neste trabalho, porém, eles trabalharam em condições de campo e tiveram a ação de predadores e de precipitação agindo sobre as populações, fatores que podem ter elevado o índice de mortalidade encontrado.

Tabela 3: Tabela de esperança de vida para *Pinus boernerii* em *Pinus taeda*, sob condições de laboratório em Curitiba, PR (n = 52). com temperatura média de 20°C e UR média de 55%.

Intervalo de dias	x (3 dias)	L _x	d _x	E _x	T _x	e _x	100q _x
0 - 3	0,5	52	0	52,0	857,0	16,48	0,00
3 - 6	1,5	52	0	52,0	805,0	15,48	0,00
6 - 9	2,5	52	0	52,0	753,0	14,48	0,00
9 - 12	3,5	52	1	51,5	701,0	13,48	1,92
12 - 15	4,5	51	1	50,5	649,5	12,74	1,96
15 - 18	5,5	50	2	49,0	599,0	11,98	4,00
18 - 21	6,5	48	3	46,5	550,0	11,46	6,25
21 - 24	7,5	45	6	42,0	503,5	11,19	13,33
24 - 27	8,5	39	2	38,0	461,5	11,83	5,13
27 - 30	9,5	37	2	36,0	423,5	11,45	5,41
30 - 33	10,5	35	0	35,0	387,5	11,07	0,00
33 - 36	11,5	35	3	33,5	352,5	10,07	8,57
36 - 39	12,5	32	5	29,5	319,0	9,97	15,63
39 - 42	13,5	27	1	26,5	289,5	10,72	3,70
42 - 45	14,5	26	1	25,5	263,0	10,12	3,85
45 - 48	15,5	25	3	23,5	237,5	9,50	12,00
48 - 51	16,5	22	2	21,0	214,0	9,73	9,09
51 - 54	17,5	20	2	19,0	193,0	9,65	10,00
54 - 57	18,5	18	0	18,0	174,0	9,67	0,00
57 - 60	19,5	18	2	17,0	156,0	8,67	11,11
60 - 63	20,5	16	0	16,0	139,0	8,69	0,00
63 - 66	21,5	16	0	16,0	123,0	7,69	0,00
66 - 69	22,5	16	2	15,0	107,0	6,69	12,50
69 - 72	23,5	14	1	13,5	92,0	6,57	7,14
72 - 75	24,5	13	1	12,5	78,5	6,04	7,69
75 - 78	25,5	12	1	11,5	66,0	5,50	8,33
78 - 81	26,5	11	2	10,0	54,5	4,95	18,18
81 - 84	27,5	9	2	8,0	44,5	4,94	22,22
84 - 87	28,5	7	1	6,5	36,5	5,21	14,29
87 - 90	29,5	6	1	5,5	30,0	5,00	16,67
90 - 93	30,5	5	0	5,0	24,5	4,90	0,00
93 - 96	31,5	5	1	4,5	19,5	3,90	20,00
96 - 99	32,5	4	0	4,0	15,0	3,75	0,00
99 - 102	33,5	4	0	4,0	11,0	2,75	0,00
102 - 105	34,5	4	2	3,0	7,0	1,75	50,00
105 - 108	35,5	2	0	2,0	4,0	2,00	0,00
108 - 111	36,5	2	1	1,5	2,0	1,00	50,00
111 - 113	37,5	1	1	0,5	0,5	0,50	100,00

x = intervalo de idade; L_x = número de sobreviventes; d_x = número de indivíduos mortos; E_x = estrutura etária; T_x = taxa de sobrevivência; e_x = esperança de vida; 100q_x = probabilidade de morte na idade x

Tabela 4: Tabela de esperança de vida para *Pineus boernerii* em *Pinus elliottii*, sob condições de laboratório em Curitiba, PR (n = 46). com temperatura média de 22°C e UR média de 55%.

Intervalo de dias	x (3 dias)	L _x	d _x	E _x	T _x	e _x	100q _x
0 - 3	0,5	46	0	46,0	823,0	17,89	0,00
3 - 6	1,5	46	0	46,0	777,0	16,89	0,00
6 - 9	2,5	46	0	46,0	731,0	15,89	0,00
9 - 12	3,5	46	0	46,0	685,0	14,89	0,00
12 - 15	4,5	46	1	45,5	639,0	13,89	2,17
15 - 18	5,5	45	1	44,5	593,5	13,19	2,22
18 - 21	6,5	44	3	42,5	549,0	12,48	6,82
21 - 24	7,5	41	3	39,5	506,5	12,35	7,32
24 - 27	8,5	38	1	37,5	467,0	12,29	2,63
27 - 30	9,5	37	1	36,5	429,5	11,61	2,70
30 - 33	10,5	36	1	35,5	393,0	10,92	2,78
33 - 36	11,5	35	3	33,5	357,5	10,21	8,57
36 - 39	12,5	32	2	31,0	324,0	10,13	6,25
39 - 42	13,5	30	4	28,0	293,0	9,77	13,33
42 - 45	14,5	26	1	25,5	265,0	10,19	3,85
45 - 48	15,5	25	1	24,5	239,5	9,58	4,00
48 - 51	16,5	24	3	22,5	215,0	8,96	12,50
51 - 54	17,5	21	2	20,0	192,5	9,17	9,52
54 - 57	18,5	19	0	19,0	172,5	9,08	0,00
57 - 60	19,5	19	0	19,0	153,5	8,08	0,00
60 - 63	20,5	19	1	18,5	134,5	7,08	5,26
63 - 66	21,5	18	0	18,0	116,0	6,44	0,00
66 - 69	22,5	18	1	17,5	98,0	5,44	5,56
69 - 72	23,5	17	0	17,0	80,5	4,74	0,00
72 - 75	24,5	17	5	14,5	63,5	3,74	29,41
75 - 78	25,5	12	0	12,0	49,0	4,08	0,00
78 - 81	26,5	12	3	10,5	37,0	3,08	25,00
81 - 84	27,5	9	1	8,5	26,5	2,94	11,11
84 - 87	28,5	8	2	7,0	18,0	2,25	25,00
87 - 90	29,5	6	2	5,0	11,0	1,83	33,33
90 - 93	30,5	4	1	3,5	6,0	1,50	25,00
93 - 96	31,5	3	2	2,0	2,5	0,83	66,67
96 - 99	32,5	1	1	0,5	0,5	0,50	100,00

x = intervalo de idade; L_x = número de sobreviventes; d_x = número de indivíduos mortos; E_x = estrutura etária; T_x = taxa de sobrevivência; e_x = esperança de vida; 100q_x = probabilidade de morte na idade x

A taxa de esperança de vida (e_x) foi superior em *P. elliottii*, 17,89 (Tabela 4), enquanto que em *P. taeda* o índice foi de 16,48 (Tabela 4). Contudo, o índice apresentou o mesmo padrão para as duas espécies de *Pinus*, sendo relativamente alto no início e decrescendo até o final do período de avaliação (Figs. 1, 2). O teste G, aplicado a fim de se comparar as duas tabelas de vida, não mostrou diferença significativa nos parâmetros de sobrevivência de *P. boernerii* nas duas espécies de plantas.

3.4. Tabela de fertilidade

Os períodos pré-reprodutivo e pós-reprodutivo médios de *P. boernerii* em *P. taeda* foram de 1,2 dias e 3,5 dias, respectivamente; enquanto que em *P. elliottii*, o período pré-reprodutivo foi de 1,5 dias e o pós-reprodutivo de 2,6 dias. Em relação ao período reprodutivo e a fecundidade média total, não se observa diferença estatística significativa entre as duas espécies de hospedeiros, porém, a fecundidade média diária foi maior em *P. elliottii* (Tabela 2). O período pré-reprodutivo de *P. boernerii* em *P. roxburghii*, no Paquistão, variou de dias a semanas para diferentes gerações (Yassen & Ghani 1971).

As fêmeas adultas criadas em *P. taeda* começaram sua vida reprodutiva entre o 24° e o 27° dia e encerraram entre o 105° e o 108° dia (Tabela 5). A maior taxa de fecundidade (m_x) ocorreu entre o 39° e o 41° dia de vida e foi de 3,6 ovos/fêmea. Assim como para a fecundidade média diária, a taxa de fecundidade sobre *P. elliottii* foi maior em todo o período avaliado (Fig. 3) e teve seu pico de produtividade entre o 54° e o 57° dia de vida, com 6,58 ovos/fêmea (Tabela 6). O período reprodutivo do Adelgidae nesta espécie de planta começou entre o 27° e o 30° dia e se encerrou entre o 90° e o 93° dia de vida, não diferindo de *P. taeda*.

As fêmeas permanecem próximas aos ovos, envolvendo-os com uma grande quantidade de fios de cera, formando uma lanugem sobre os mesmos. O número médio total de ovos produzidos foi de 39,8 em *P. taeda* e 52,9 em *P. elliottii*, não observando-se diferença significativa entre os dois hospedeiros (Tabela 2). McClure (1984) registrou um total de 45 ovos por fêmea para a espécie sobre *P. resinosa* nos Estados Unidos.

A taxa de sobrevivência de *P. boernerii* foi semelhante sobre as duas espécies de plantas, com uma queda gradual ao longo de todo o período avaliado (Tabelas 5 e 6, Fig. 1).

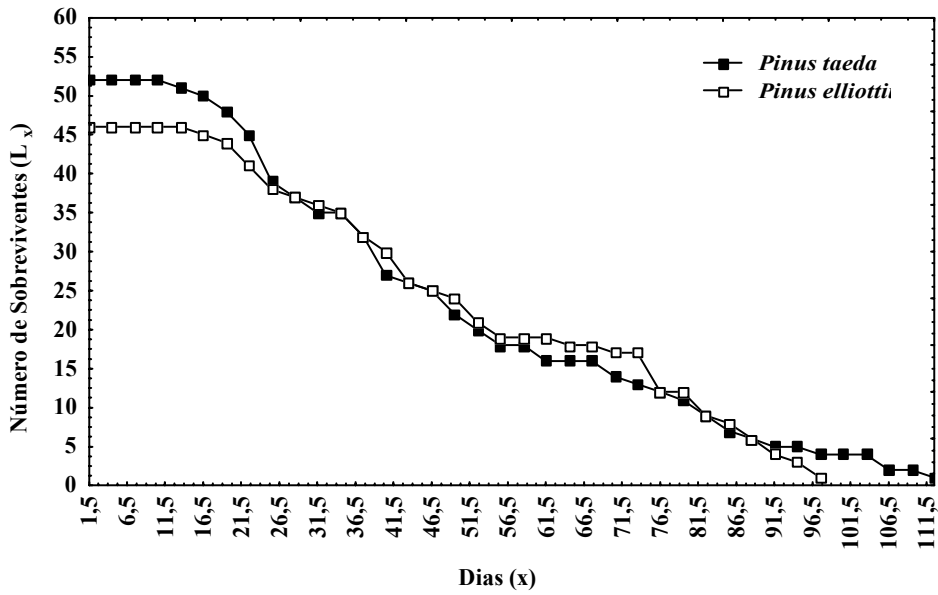


Fig. 1. Número de sobreviventes (L_x) de *Pineus boernerii* em duas espécies de plantas hospedeiras sob condições de laboratório, Curitiba, PR, com temperatura média de 20°C para *P. taeda* e 22°C para *P. elliottii*, e UR média de 55%.

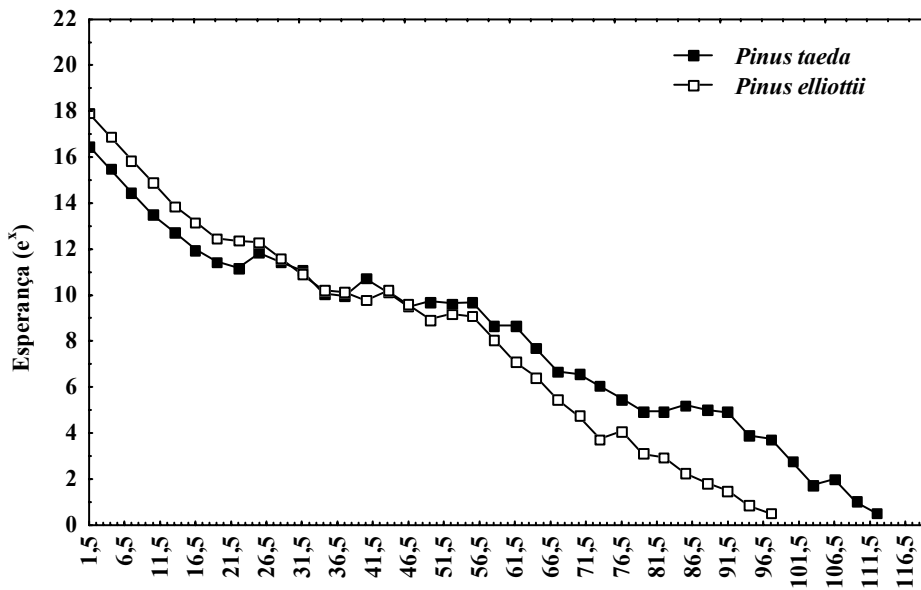


Fig. 2. Esperança de vida (e_x) de *Pineus boernerii* em duas espécies de plantas hospedeiras sob condições de laboratório, Curitiba, PR, com temperatura média de 20°C para *P. taeda* e 22°C para *P. elliottii*, e UR média de 55%.

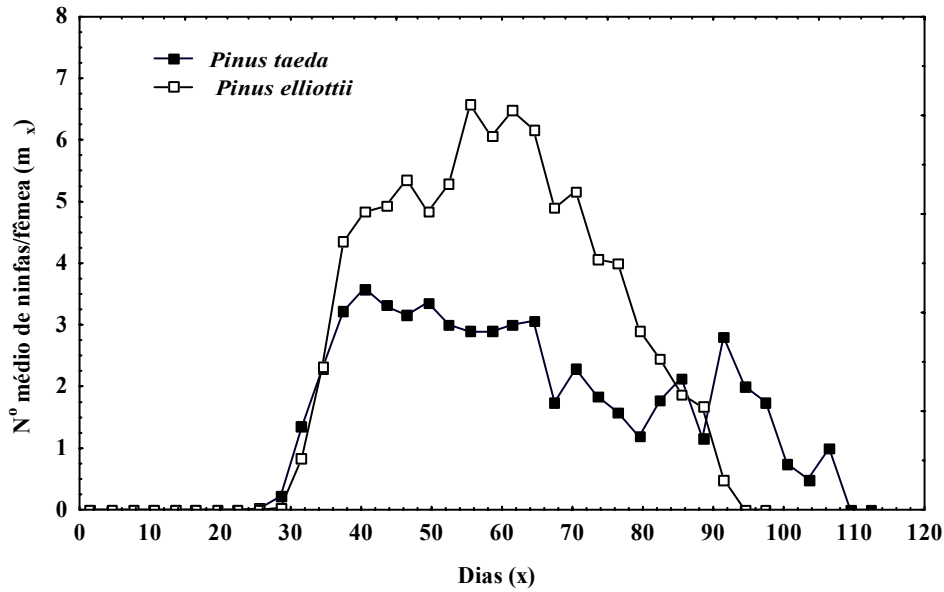


Fig. 3. Número médio de ninfas de *Pineus boernerii* produzidas por fêmea em todo o período reprodutivo, criadas em duas espécies de plantas hospedeiras sob condições de laboratório, Curitiba, PR, com temperatura média de 20°C para *P. taeda* e 22°C para *P. elliottii*, e UR média de 55%.

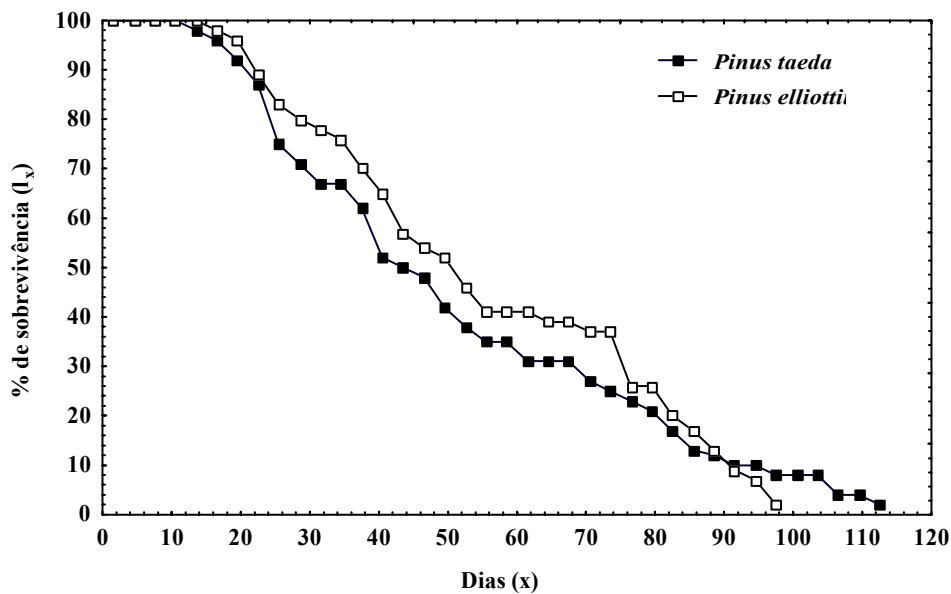


Fig. 4. Porcentagem de sobrevivência (l_x) de *Pineus boernerii* criada em duas plantas hospedeiras sob condições de laboratório, Curitiba, PR, com temperatura média de 20°C para *P. taeda* e 22°C para *P. elliottii*, e UR média de 55%.

Tabela 5: Tabela de fertilidade de vida para *Pineus boernerii* em *Pinus taeda*, sob condições de laboratório em Curitiba, PR, com temperatura média de 20°C e UR média de 55% (n = 52).

Intervalo de dias	x (3 dias)	m_x	l_x	$m_x l_x$	$m_x l_x x$
24 - 27	8,5	0,04	0,50	0,02	0,16
27 - 30	9,5	0,31	0,50	0,15	1,46
30 - 33	10,5	1,81	0,50	0,90	9,49
33 - 36	11,5	3,08	0,50	1,54	17,69
36 - 39	12,5	3,96	0,50	1,98	24,76
39 - 42	13,5	3,73	0,44	1,65	22,28
42 - 45	14,5	3,31	0,42	1,40	20,29
45 - 48	15,5	3,04	0,42	1,29	19,93
48 - 51	16,5	2,85	0,37	1,04	17,16
51 - 54	17,5	2,31	0,37	0,84	14,76
54 - 57	18,5	2,00	0,33	0,65	12,10
57 - 60	19,5	2,00	0,33	0,65	12,75
60 - 63	20,5	1,85	0,29	0,53	10,92
63 - 66	21,5	1,88	0,29	0,54	11,69
66 - 69	22,5	1,08	0,29	0,31	6,99
69 - 72	23,5	1,23	0,25	0,31	7,23
72 - 75	24,5	0,92	0,23	0,21	5,22
75 - 78	25,5	0,73	0,21	0,15	3,94
78 - 81	26,5	0,50	0,19	0,10	2,55
81 - 84	27,5	0,62	0,17	0,11	2,93
84 - 87	28,5	0,58	0,13	0,08	2,21
87 - 90	29,5	0,27	0,12	0,03	0,92
90 - 93	30,5	0,54	0,10	0,05	1,58
93 - 96	31,5	0,38	0,10	0,04	1,16
96 - 99	32,5	0,27	0,08	0,02	0,67
99 - 102	33,5	0,12	0,08	0,01	0,30
102 - 105	34,5	0,08	0,08	0,01	0,20
105 - 108	35,5	0,08	0,04	0,00	0,11
108 - 111	36,5	0,00	0,04	0,00	0,00
111 - 113	37,5	0,00	0,02	0,00	0,00

x = intervalo de idade; m_x = número de descendentes produzidos por cada fêmea no intervalo x; l_x = taxa de sobrevivência durante o intervalo de idade x.

Tabela 6: Tabela de fertilidade de vida para *Pineus boernerii* em *Pinus elliottii*, sob condições de laboratório em Curitiba, PR, com temperatura média de 22°C e UR média de 55% (n = 46).

Intervalo de dias	x (3 dias)	m_x	l_x	$m_x l_x$	$m_x l_{xx}$
27 - 30	9,5	0,03	0,72	0,02	0,21
30 - 33	10,5	0,91	0,72	0,65	6,85
33 - 36	11,5	2,45	0,72	1,76	20,25
36 - 39	12,5	4,21	0,70	2,93	36,63
39 - 42	13,5	4,39	0,65	2,87	38,69
42 - 45	14,5	3,88	0,57	2,19	31,79
45 - 48	15,5	4,06	0,54	2,21	34,21
48 - 51	16,5	3,52	0,52	1,83	30,26
51 - 54	17,5	3,36	0,46	1,54	26,87
54 - 57	18,5	3,79	0,41	1,56	28,94
57 - 60	19,5	3,48	0,41	1,44	28,07
60 - 63	20,5	3,73	0,41	1,54	31,56
63 - 66	21,5	3,36	0,39	1,32	28,30
66 - 69	22,5	2,67	0,39	1,04	23,48
69 - 72	23,5	2,67	0,37	0,99	23,16
72 - 75	24,5	2,09	0,37	0,77	18,93
75 - 78	25,5	1,45	0,26	0,38	9,68
78 - 81	26,5	1,06	0,26	0,28	7,33
81 - 84	27,5	0,67	0,20	0,13	3,59
84 - 87	28,5	0,45	0,17	0,08	2,25
87 - 90	29,5	0,30	0,13	0,04	1,17
90 - 93	30,5	0,06	0,09	0,01	0,16
93 - 96	31,5	0,00	0,07	0,00	0,00
96 - 99	32,5	0,00	0,02	0,00	0,00

x = intervalo de idade; m_x = número de descendentes produzidos por cada fêmea no intervalo x; l_x = taxa de sobrevivência durante o intervalo de idade x.

A taxa de multiplicação (r_m), ou a capacidade inata da população aumentar em número, foi igual para as populações de *P. boernerii* nas duas plantas hospedeiras, assim como a taxa finita de crescimento (λ) (Tabela 7), essa indica que, cada fêmea é capaz de colocar 1,06 ovos/dia em *P. taeda* e 1,07 ovos/dia em *P. elliottii*, mostrando que as populações apresentam a mesma capacidade genética de reprodução em ambos os hospedeiros.

A taxa de multiplicação é grandemente influenciada pelo intervalo de tempo entre cada geração (T) e, em menor escala, pelo valor da taxa líquida de reprodução (Birch 1948 *apud* Cividanes 2002). Isto pode explicar o fato de *P. boernerii* apresentar os mesmos valores de r_m e λ , já que o valor T também foi bastante semelhante nas duas espécies de plantas, apesar de significativamente maior em *P. taeda*. Por outro lado, a taxa líquida de reprodução (R_0), isto é, o número médio de descendentes produzidos por fêmea em uma geração, leva em consideração a sobrevivência dos indivíduos e o número médio de descendentes produzidos, e foi bastante diferente entre as populações criadas nas duas plantas hospedeiras: 23,8 ovos/fêmea em *P. elliottii* e 15,41 ovos/fêmea em *P. taeda*. Esta diferença pode ser reflexo da alta mortalidade ninfal em *P. taeda*, sendo que apenas 50% das ninfas atingiram a idade adulta (Tab. 5), enquanto que em *P. elliottii*, essa taxa foi de 72% (Tab. 6).

Tabela 7. Parâmetros da tabela de fertilidade de vida para *Pineus boernerii* (estimativa \pm erro padrão) em dois hospedeiros, sob condições de laboratório em Curitiba, PR, com temperatura média de 20°C para *P. taeda* e 22°C para *P. elliottii*, e UR média de 55% (x = 1 dia).

	R_0	T	r_m	λ	TD
<i>Pinus taeda</i>	15,41 a (\pm 0,09)	45,09 a (\pm 0,04)	0,06 a (\pm 0,0001)	1,06 a (\pm 0,0001)	11,43 a (\pm 0,0001)
<i>Pinus elliottii</i>	23,8 b (\pm 0,09)	49,2 b (\pm 0,04)	0,06 a (\pm 0,0001)	1,07 a (\pm 0,0001)	10,76 b (\pm 0,01)

* R_0 = taxa líquida de reprodução; T = intervalo de tempo entre cada geração; r_m = capacidade inata de aumentar em número; λ = razão finita de aumento; TD = tempo necessário para a população duplicar em número de indivíduos.

** Letras minúsculas indicam diferenças significativas nas colunas, pelo Teste de T ($p < 0,05\%$).

Apesar da capacidade inata de *P. boernerii* se reproduzir igualmente em *P. elliottii* e *P. taeda*, esta última espécie deve possuir algum mecanismo de resistência que afeta a taxa reprodutiva do inseto. Este fato também é suportado pela taxa de colonização (Tab. 1) que,

mesmo sem diferença significativa, o número de colônias de *P. boernerii* em *P.elliottii* foi sempre superior em relação a *P. taeda*.

Mesmo que esta pesquisa não vise determinar os mecanismos de defesa das plantas, os resultados evidenciaram que um ou mais mecanismos estão envolvidos nas respostas diferenciadas das duas espécies de plantas sobre a biologia e colonização pelo inseto. Sabe-se que as taxas de oviposição, crescimento e fecundidade dos insetos podem ser diretamente afetadas por características químicas e físicas e por compostos defensivos produzidos pelas plantas (Awmack & Leather 2002). Também, os afídeos são grandemente influenciados pela condição nutricional de sua planta hospedeira. Os níveis de nitrogênio, minerais, lipídios e carboidratos podem afetar grandemente a capacidade reprodutiva e o desenvolvimento dos insetos fitófagos (Pollard 1973; Awmack & Leather 2002; Goundoudaki *et al.* 2003; Chown & Nicolson 2004). Day *et al.* (2004) determinaram que, mesmo a mudança sazonal que ocorre no conteúdo nutricional da seiva do *Picea sitchensis* Carr. pode afetar a dinâmica populacional de *Elatobium abietinum* (Walker, 1849) ao longo do ano, alterando principalmente suas taxas de crescimento e fertilidade. Por outro lado, a capacidade do inseto em tolerar as toxinas e aleloquímicos produzidos como forma de defesa pela planta hospedeira vão refletir em seu desempenho. Essa capacidade do inseto herbívoro vai desde mecanismos comportamentais, até defesas fisiológicas e enzimáticas, as quais permitem que os insetos possam metabolizar esses compostos e excretá-los (Brattsten 1998; Chown & Nicolson 2004).

Sendo assim, a informação detalhada sobre a biologia de *P. boernerii* gerada neste estudo é de fundamental importância para a seleção de cultivares ou clones de *P. elliottii* e *P. taeda* mais resistentes ao pulgão-lanífero-do-pinus. Testes para determinar as categorias de resistência envolvidas na interação *Pineus-Pinus*, se antixenose, antibiose ou tolerância também se fazem necessários. O monitoramento eletrônico do comportamento alimentar de *P. boernerii* nas quatro espécies de *Pinus* também poderá gerar informações importantes para estes estudos e para a seleção de linhagens resistentes a esta espécie de afídeo.

4. CONCLUSÕES

A taxa de colonização de *Pineus boernerii* é maior em *Pinus elliottii* e *Pinus taeda* do que em espécies tropicais de *Pinus*

O desempenho reprodutivo e a sobrevivência de ninfas e adultos de *P. boernerii* é significativamente melhor em *P. elliottii*, indicando que esta espécie de *Pinus* é menos resistente à infestação pelo pulgão-lanífero-do-pinus.

As tabelas de vida e de sobrevivência confirmam a melhor adaptação e desempenho de *P. boernerii* em *P. elliottii* do que em *P. taeda*.

5. BIBLIOGRAFIA

- Awmack, C. S. & S. R. Leather. 2002. Host plant quality and fecundity in herbivorous insects. **Annual Review of Entomology 47: 817 – 844.**
- Barnes, R. D.; R. F. Jarvis; M. A. Schweppenhauser & L. J. Mullin. 1976. Introduction, spread and control of the pine woolly aphid, *Pineus pini* (L), in Rhodesia. **South African Forestry Journal 96: 1 – 11.**
- Blackman, R. L. & V. F. Eastop 1994. **Aphids on the world's trees: an identification and information guide.** Wallingford, CAB International, 987 p.
- Brattstein, L. B. 1988. Enzymic adaptations in leaf-feeding insects to host-plant allelochemicals. **Journal of Chemical Ecology 14: 1919 – 1939.**
- Chown, S. L. & S. W. Nicolson. 2004. **Insect physiological ecology: mechanisms and patters.** New York, Oxford Academic Press, 243 p.
- Cividanes, F. J. 2002. Tabelas de vida de fertilidade de *Brevicoryne brassicae* (L.) (Hemiptera: Aphididae) em condições de campo. **Neotropical Entomology 31: 359-363.**
- Collins, C. M.; M. D. E. Fellowes; R. G. Sage & S. R. Leather. 2001. Host selection and performance of the giant willow aphid *Tuberolachnus salignus* Gmelin – implications for pest management. **Agricultural and Forest Entomology 3: 183 – 189.**
- Day, K. R.; H. Armour & M. Docherty. 2004. Population responses of a conifer-dwelling aphid to seasonal changes in its host. **Ecological Entomology 29: 555 – 565.**
- EMBRAPA. Centro Nacional de Pesquisa de Florestas. 1986. **Zoneamento ecológico para plantios florestais no estado do Paraná.** Brasília, EMBRAPA-DDT, 89 p. (EMBRAPA-CNPF. Documentos, 17).
- EMBRAPA. Centro Nacional de Pesquisa de Florestas. 1988. **Zoneamento ecológico para plantios florestais no estado do Santa Catarina.** Curitiba, 113 p. (EMBRAPA-CNPF. Documentos, 21).
- Godoy, K. B. & F. J. Cividanes 2002. Tabelas de esperança de vida e fertilidade para *Lipaphis erysimi* (Kalt.) (Hemiptera: Aphididae) em condições de laboratório e campo. **Neotropical Entomology 31: 41 – 48.**
- Golfari, L.; R. L. Caser & V. P. Moura. 1978. **Zoneamento ecológico esquemático para reflorestamento no Brasil (2ª aproximação).** Brasília, PNUD/FAO/IBDF/BRA – 45, 66 p. (Série Técnica N° 11).

- Goundoudaki, S.; J. A. T. Atsitsipis; J. T. Margaritoupoulos; K. D. Zarpas & S. Divanidis. 2003. Performance of the tobacco aphid *Myzus persicae* (Hemiptera: Aphididae) on Oriental and Virginia tobacco varieties. **Agricultural and Forest Entomology** **5**: 285 – 291.
- Hanover, J. W. 1975. Physiology of tree resistance to insects. **Annual Review of Entomology** **20**: 75-95.
- Klingauf, F. A. 1988. Host plant finding and acceptance, p. 209–224. In Minks, A. K. & P. Harrewijn (eds.). **World crop pests: Aphids, their biology, natural enemies and control**. Amsterdam: Elsevier, V. 2A, 450 p.
- Mailu, A. M.; C. P. M. Khamal & D. J.W. Rose. 1980. Population dynamics of pine wooly aphid, *Pineus pini* (Gmelin) (Hemiptera: Adelgidae) in Quênia. **Bulletin of Entomological Research** **70**: 483 – 490.
- McClure, M. S. 1984. Influence of cohabitation and resinosis on site selection and survival of *Pineus boernerii* Annand and *P. coloradensis* (Gilette) (Homoptera: Adelgidae) on red pine. **Environmental Entomology** **13**: 657 – 663.
- McClure, M. S. 1989a. Importance of weather to the distribution and abundance of introduced Adelgidae and scale insects. **Agricultural and Forest Meteorology** **47**: 291 – 302.
- McClure, M. S. 1989b. Biology, population trends and damage of *Pineus boernerii* and *P. coloradensis* (Homoptera: Adelgidae) on red pine. **Environmental Entomology** **18**: 1066 – 1073.
- McClure, M. S. 1990. Cohabitation and host species effects on the population growth of *Matsucoccus resinosa* (Homoptera: Margarodidae) and *Pineus boernerii* (Homoptera: Adelgidae) on red pine. **Environmental Entomology** **19**: 672 – 676.
- Meyer, J. S., C. G. Ingersoll, L. L. McDonald & M. S. Boyce. 1986. Estimating uncertainty in population growth rates: Jackknife vs. Bootstrap techniques. **Ecology** **67**: 1156-1166.
- Pollard, D. G. 1973. Plant penetration by feeding aphids (Hemiptera: Aphidoidea): a review. **Bulletin of Entomological Research** **62**: 631-714.
- Silveira Neto, S., O. Nakano, D. N. Barbin & N. Villa Nova. 1976. **Manual de ecologia dos insetos**. São Paulo: Agronômica Ceres. 419 p.
- Simpson, J. A. & P. K. Ades. 1990. Variation in susceptibility of *Pinus muricata* and *Pinus radiata* to two species of Aphidoidea. **Silvae Genetica** **39**:5 – 6.
- Smith, M. C., Z. R. Khan & M. D. Pathak. 1994. **Techniques for evaluating insect resistance in crop plants**. New York: Lewis Publishers. 320 p.

- Smith, C. M. 2005. **Plant resistance to arthropods - Molecular and conventional approaches**. Springer, Netherlands. 423 p.
- Tanton, M. T. & D. Alder. 1977. The distribution and possible effects of the woolly aphid *Pineus* (Homoptera: Adelgidae) on *Pinus radiata* D. Don growing in the Australian capital territory. **Australian Forest Research 7**: 253 – 263.
- Thorsteinson, A. J. 1960. Host selection in phytophagous insects. **Annual Review of Entomology 5**: 193 – 218.
- Yaseen, M. & M. A. Ghani. 1971. Descriptions and notes on the biology of four new species of Adelgidae from west Pakistan. **Bulletin of Entomological Research 61**: 191 – 205.
- Zwolinski, J. B. 1990. Preliminary evaluation of the impact of the pine woolly aphid on condition and growth of pines in the Southern Cape. **South African Forestry Journal 153**: 22 – 26.

Capítulo III

Ocorrência, flutuação populacional e distribuição de *Pineus boernerii* Annand, 1928 (Hemiptera: Adelgidae) em plantas de *Pinus* spp. (Pinaceae)

**Ocorrência, flutuação populacional e distribuição de *Pineus boernerii* Annand, 1928
(Hemiptera: Adelgidae) em plantas de *Pinus* spp. (Pinaceae)**

RESUMO

A distribuição de *Pineus boernerii* Annand, 1928 na planta hospedeira é um evento complexo, e depende da condição da planta e de fatores bióticos e abióticos. Os objetivos desta pesquisa foram determinar a flutuação populacional de *P. boernerii* em áreas de *Pinus* com idades diferentes e o padrão de distribuição das colônias na planta. Foram avaliadas 15 árvores adultas, isoladas, de *Pinus taeda* L. e de *Pinus elliottii* Engelman em Curitiba, PR, coletando-se 30 galhos a cada quinzena, por um período de dois anos. O segundo local de coleta foi em uma área de plantio comercial de *P. taeda*, com árvores de quatro anos de idade, em Campo do Tenente, PR. A cada quinzena, 45 galhos foram coletados de 15 árvores, por um período de um ano. Nos dois experimentos foi feita a contagem absoluta dos ovos, ninfas e adultos e verificada a distribuição de *P. boernerii* nos quadrantes, estratos da planta e em porções do galho. A dispersão do inseto na área comercial, foi feita em 100 árvores, verificando-se a presença/ausência da espécie, a cada três meses. *P. boernerii* esteve presente nas duas áreas de coleta durante todo o período avaliado. Não houve uma correlação clara com os dados de pluviosidade e temperatura, mas houve uma tendência de aumento populacional nas épocas de temperatura amena e baixa pluviosidade. Houve um aumento de mais de 50% no número de afídeos em Curitiba, de um ano para outro. A distribuição sazonal de *P. boernerii* mostra que a infestação iniciou na borda para o centro da área estudada, com a infestação média variando de 20% a 38% ao longo do ano. A distribuição vertical de *P. boernerii* na árvore, mostrou a tendência da espécie de se concentrar no estrato inferior da planta, bem como na porção basal dos galhos. Não houve correlação positiva com os quadrantes. Os experimentos demonstraram que *P. boernerii* encontra-se adaptada aos locais onde foram feitas as avaliações, especialmente na área com árvores mais velhas. Esta preferência foi corroborada pelos dados da distribuição das colônias no estrato inferior e nas partes mais velhas da planta.

**Occurrence, fluctuation and distribution of populations of *Pineus boernerii* Annand, 1928
(Hemiptera: Adelgidae) on *Pinus* spp. (Pinaceae)**

ABSTRACT

The distribution of *Pineus boernerii* Annand, 1928 on its host plant is very complex, and depends upon different conditions, such as plant species, and biotic and abiotic factors. The objectives of this research were to determine the population fluctuation of *P. boernerii* in areas of *Pinus* at different ages and the distribution of the colonies on the plant. Fifteen isolated adult trees of *Pinus taeda* L. and *Pinus elliottii* Engelmann were evaluated in Curitiba, PR, from which 30 branches were collected every other week, for two years. The other group was in a commercial area of *P. taeda* in Campo do Tenente, PR, where the trees were four years old. Every 15 days, a total of 45 branches were collected from 15 trees, for one year. It was counted the absolute number of eggs, nymphs, and adults; also, it was determined the distribution of *P. boernerii* on the quarters, at the height level, and part of the branch where the colonies were established. In order to verify the dispersion pattern of the insect in the commercial area, 100 trees were evaluated for the presence/absence of infestation, every three months. The presence of *P. boernerii* was recorded in both areas during the total period of the study. The correlation between infestation and precipitation and temperature was not confirmed, but the populations showed a tendency of increase during periods of mild temperature and low precipitation. It was observed an increase of 50% in the number of insects from one year to the next on the trees in Curitiba. The sazonal distribution of *P. boernerii* showed that the infestation started in the borders and dispersed towards the center of the area. The infestation was between 20% and 38% along the year. The distribution of the colonies was concentrated on the lower third of the tree, as well as on the basal part of the branch. There was no significant correlation between infestation and the quarters of the tree. The results showed that *P. boernerii* is adapted in the places where the experiments were carried out, especially in the area where the trees were older and isolated. This data is corroborated by the preferred distribution of the colonies on the lower parts of the tree and basal part of the branches.

1. INTRODUÇÃO

O pulgão-lanífero-do-pinus, *Pineus boernerii* Annand, 1928 (Hemiptera: Adelgidae), caracteriza-se pelo tamanho pequeno (aproximadamente 0,76 mm de comprimento), de cor marrom avermelhada, apresentando glândulas de cera no tórax e na cabeça (Yassen & Ghani 1971; Zondag 1977). Estes afídeos são partenogéticos ovíparos; as fêmeas depositam os ovos nos ramos de diversas espécies de *Pinus* (Pinaceae), envolvidos por uma grande quantidade de fios de cera, semelhantes a fios de lã; as ninfas de primeiro instar são o único estágio móvel da espécie, a partir do qual fixam-se nos ramos da planta e permanecem sésseis ao longo de toda a vida (Blackman & Eastop 1994; McClure 1989b). A espécie completa três gerações a cada ano em *Pinus resinosa* Soland., na Nova Inglaterra, com uma geração de verão, uma de inverno e uma de primavera (McClure 1989a, 1989b). Yaseen & Ghani (1971), por sua vez, determinaram quatro gerações anuais de *P. boernerii* no Paquistão, com uma geração de inverno e três gerações de verão.

Os fatores que afetam a distribuição e a dinâmica populacional de *P. boernerii* e das demais espécies de Adelgidae são: o local de postura que determina o ambiente no qual as ninfas irão se desenvolver; idade da planta hospedeira, diâmetro do tronco, nível de nitrogênio, número de brotos, espécie e capacidade de resistência do clone da árvore atacada; fatores climáticos como temperatura e precipitação; competição intraespecífica e interespecífica; ação de inimigos naturais, capacidade de dispersão, além de fatores genéticos associados às populações (Tanton & Alder 1977; Mailu *et al.* 1980; McClure 1982, 1984a, 1989a, 1989b, 1990a, 1999; Culliney *et al.* 1988; Fay & Whitham 1990; Zowlinski 1990; Binazzi & Francardi 2001; Chilima & Leather 2001; Salom *et al.* 2001; Parker *et al.* 2002).

A dispersão das espécies de Adelgidae é feita pelas formas aladas, ninfas móveis ou pelos ovos, os quais são carregados pelo vento, por pássaros, mamíferos, ou ainda pelo homem (Cumming 1962; Zondag 1977; McClure 1989a, 1989b, 1990b, 1999). No caso de *P. boernerii* que não apresenta formas aladas, a dispersão ocorre exclusivamente através das ninfas e dos ovos, os quais podem facilmente ser carregados a distâncias consideráveis através de correntes de vento (McClure 1989a). Segundo McClure (1989b), a espécie pode sincronizar períodos de produção de ninfas móveis com períodos anuais de ventos fortes, nos Estados Unidos, os quais garantiriam o sucesso do processo de dispersão para novas áreas.

A temperatura, a umidade e a precipitação são os principais fatores capazes de influenciar o estabelecimento das espécies de Adelgidae em novas áreas. Condições como

altas precipitações e níveis extremos de temperatura afetam a dispersão, sobrevivência e desenvolvimento das formas dentro das colônias (McClure 1989a, Chilima & Leather 2001).

O número de gerações do Adelgidae *Dreyfusia piceae* (Ratzeburg, 1844) depende, diretamente, das condições ambientais na Itália, a qual pode variar de quatro a cinco gerações/ano (Binazzi & Francardi 2001). Parker *et al.* (2002) demonstraram que populações de *Adelges tsugae* Annand, 1924 de diferentes localidades dos Estados Unidos são afetadas diferentemente por temperaturas baixas, além disso, a população de uma mesma localidade pode apresentar diferentes níveis de resistência, dependendo da época do ano. Salom *et al.* (2001) demonstraram, ainda, que a temperatura e o fotoperíodo regulam o processo de diapausa da espécie. McClure (1984b) observou, durante o inverno, uma alta taxa de mortalidade de *P. boernerii* na China, quando a temperatura mínima chegava a -23°C .

A competição inter e intraespecífica é responsável por grandes variações na dinâmica populacional das espécies de afídeos. Condições de altas populações pode levar ao declínio do número de indivíduos, à produção de formas aladas ou, ainda, à dispersão das espécies para estabelecer novos sítios de alimentação na própria planta. Nos Estados Unidos, *A. tsuga* apresenta uma diminuição na sua taxa reprodutiva e no seu desempenho sempre que ocorrem picos populacionais, além de uma elevada mortalidade ninfal (McClure 1991, 2002). Trabalhando com as espécies *P. boernerii* e *Pineus coloradensis* Gillette, 1907 infestando simultaneamente *P. resinosa* nos Estados Unidos, McClure (1982, 1984a, 1989b) determinou a habilidade competitiva superior de *P. boernerii* sobre *P. coloradensis* que teve sua população reduzida em função da presença da outra espécie. Por outro lado, *P. boernerii* teve uma redução em sua performance diante da cochonilha *Matsucoccus matsumurae* (Kuwana, 1905), também em *P. resinosa* (McClure, 1990a).

Não há registro de nenhum parasitóide ou patógeno de *P. boernerii* na Europa, porém, há um grande número de predadores: três Chamaemyiidae (*Leucospis tapinae* Blanchard, *Leucospis argenticollis* Zetterstedt e *Leucospis obscura* Haliday); um Cecidomyiidae (*Lestodiplosis pini* Barnes); várias espécies de Coccinellidae (*Scymnus nigrinus* Kugelann e *Scymnus suturalis* Thunberg, entre outras); além de Hemerobiidae, Chrysopidae e Syrphidae (Mills 1990). No Quênia, foram detectadas nove espécies de predadores sendo oito nativas e uma espécie importada: seis coccinelídeos (*Exochomus flavipes* (Thunberg), *Exochomus* sp. ?*haafi* Fürsch, *Cheilome lunata* (F.), *Hippodamia variegata* (Goeze); *Cheilomenes aurora* (Gerstaecker) e *Scymnus* spp.); um crisopídeo (*Chrysopa* sp.); um sirfídeo (*Allograta* sp.) e um antocorídeo (*Tetrphleps raoi* Ghauri) (Mailu *et al.* 1980).

O controle biológico da espécie tem sido feito em vários locais: no Chile e na Nova Zelândia o controle foi efetivo pela liberação dos Chamaemyidae *L. obscura* e *L. tapinae*, respectivamente. Porém, na Austrália, o controle não foi efetivo porque quatro espécies liberadas não se estabeleceram (Mills 1990). No Quênia, o antocorídeo *T. raoi* Ghauri foi liberado, porém não controlou de forma satisfatória a espécie *P. boernerii* (Mailu *et al.* 1980).

Hospedeiros de espécies diferentes, ou alterações dentro de uma mesma espécie de hospedeiro, podem influenciar de maneira diversa o desempenho e a distribuição dos insetos nas plantas (Chilima & Leather 2001). Essas alterações podem ocorrer devido a mudanças na fenologia, exposição ao sol, idade de cada estrutura ou ainda processos de senescência e defesa da planta (McClure 1989b; Zwolinski 1990; Dixon 1998 *apud* Chilima & Leather 2001; Havill & Foottit 2007). Da mesma forma, a história evolutiva da espécie com um hospedeiro pode fazer com que ela selecione sítios exclusivos de alimentação em determinadas partes ou estruturas da planta (McClure 1982, 1984a). O adelgide *P. coloradensis*, nativo da América do Norte, coloniza exclusivamente as acículas de *P. resinosa* nos Estados Unidos, apresentando uma baixa taxa de sobrevivência na casca das árvores. Já, *P. boernerii* pode colonizar de maneira eficiente qualquer um dos dois sítios de alimentação de *P. resinosa*, sendo capaz de manter a mesma densidade populacional durante todo o ano (McClure 1984a).

Jackson & Dixon (1996) determinaram a preferência do *Elatobium abietinum* (Walker, 1849) por acículas mais velhas de *Picea sitchensis* (Bong.(Carr.)) e associaram essa preferência a substâncias presentes na cera da epicutícula das folhas. *Pineus boernerii* apresenta uma preferência por partes inferiores de *Pinus radiata* D. Don nos Estados Unidos (McClure 1984a), porém, não apresenta um padrão definido de colonização, em relação à altura da planta, em *Pinus kesiya* Royle na África (Chilima & Leather 2001).

A presente pesquisa teve por objetivos determinar a flutuação populacional de *Pineus boernerii* em duas áreas de plantio de *Pinus* no Paraná e a distribuição da espécie nos diversos estratos e partes da planta.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Monitoramento de *P. boernerii* em árvores adultas isoladas de *Pinus taeda* e *Pinus elliottii*

O experimento, visando a avaliação da ocorrência e da flutuação de *P. boernerii* e de seus inimigos naturais em *Pinus*, foi estabelecido no Centro Politécnico da Universidade Federal do Paraná, Curitiba, PR (Fig. 1A) (Latitude 25° 25' 40''S, Longitude 49° 16' 23''W, e altitude de 945 m s.n.m.), por um período de dois anos (março/2004 a março/2006). Foram demarcadas 50 árvores adultas sem poda de *Pinus taeda* L. e *Pinus elliottii* Engelm., as quais apresentavam mais de 25 anos de idade, e encontravam-se alinhadas na beira de uma estrada, estabelecidas na área, das quais 15 eram sorteadas, quinzenalmente, e tinham dois galhos, com cerca de 30 a 40 cm de comprimento, coletados, acondicionados em sacos plásticos e levados para o laboratório para a contagem absoluta dos insetos.

2.2. Monitoramento de *P. boernerii* em área de cultivo comercial de *P. taeda*

A fim de determinar a ocorrência e flutuação de *P. boernerii* e de seus inimigos naturais em plantios comerciais, foi estabelecida uma área experimental de 1 ha de árvores não podadas de *P. taeda*, na Empresa Placas do Paraná/Arauco do Brasil, no município de Campo do Tenente, PR (Fig. 1B) (latitude 25° 58' 41''S, longitude 49° 40' 58''W e altitude 802 s.n.m.). No início do experimento, as árvores tinham quatro anos de idade, e foram avaliadas pelo período de um ano, de março/2004 a março/2005. A área foi subdividida em cinco subáreas, onde foram demarcadas vinte árvores, totalizando 100 plantas. A amostragem foi feita a partir da quinta fileira de árvores, tanto a sul quanto a leste a fim de evitar o efeito de borda (Fig. 2).

Quinzenalmente, sorteava-se três árvores por subárea e coletava-se três galhos de cada uma, totalizando 15 árvores e 45 galhos coletados por data de amostragem. Os galhos eram acondicionados em sacos plásticos e levados para o laboratório para contagem absoluta do número de *P. boernerii*.

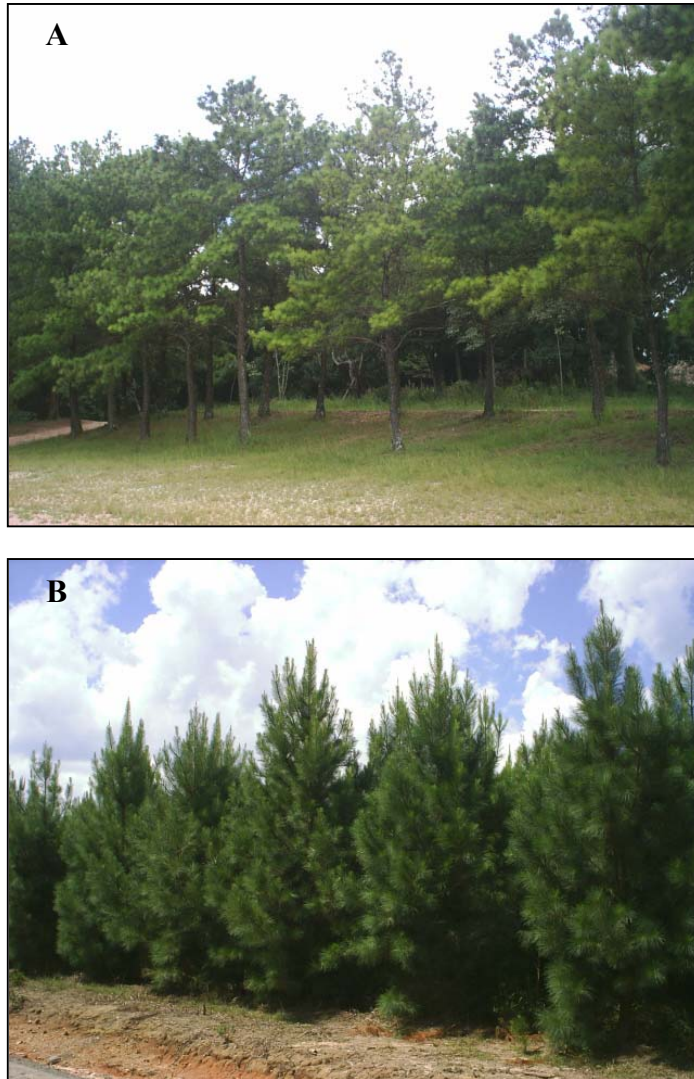


Fig.1. Áreas de coleta de *Pinus boernerii*. A: Árvores adultas isoladas de *Pinus taeda* e *Pinus elliottii* no Centro Politécnico da Universidade Federal do Paraná, Curitiba PR. B: Área de cultivo comercial de árvores de *Pinus taeda* com 4 anos de idade, em Campo do Tenente, PR.

2.3. Distribuição de *P. boernerii* na área de plantio comercial de *P. taeda*

Para determinar o padrão de distribuição da espécie foi feita uma avaliação da presença/ausência de colônias do pulgão-lanífero-do-pinus nas 100 árvores demarcadas, a cada três meses, na mesma área de plantio de *P. taeda*, em Campo do Tenente, PR. No total foram feitas quatro avaliações: maio/04 (outono), setembro/04 (inverno), novembro/2004 (primavera) e fevereiro/05 (verão). Massas isoladas de cerosidade branca foram consideradas colônias, mesmo que tivessem apenas uma única fêmea.

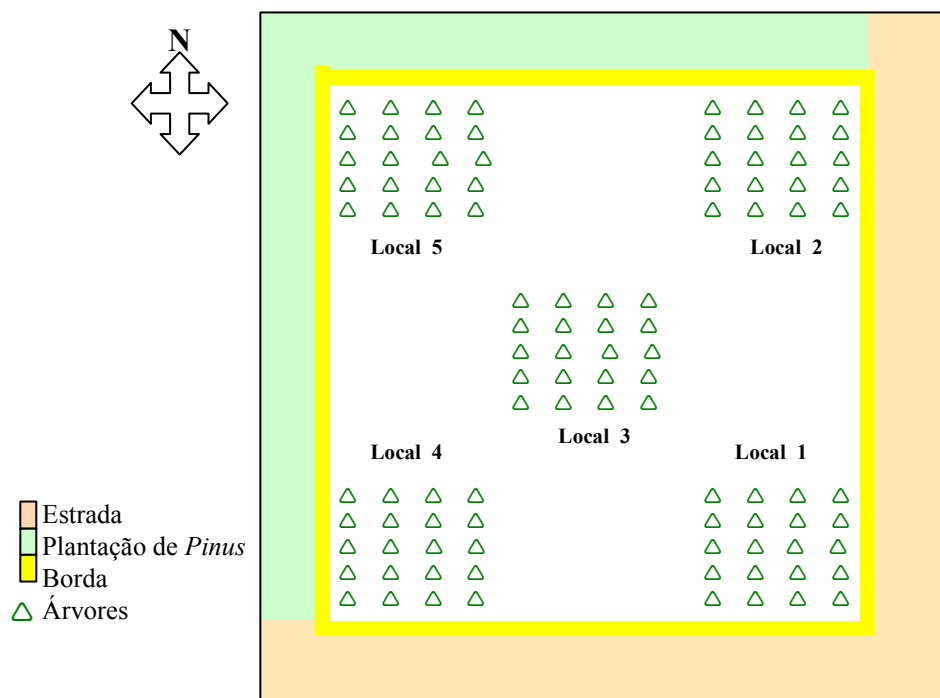


Fig. 2. Croqui da área de cultivo comercial de árvores de *Pinus taeda* com quatro anos de idade em Campo do Tenente, PR, mostrando a divisão do local em cinco subáreas.

2.4. Distribuição de *P. boernerii* nos estratos da planta

Para avaliar a distribuição de *P. boernerii* nos estratos da planta de *Pinus*, foram selecionadas 10 árvores infestadas na área de Campo do Tenente, PR, em novembro de 2004. A árvore foi dividida, visualmente, em três estratos: o inferior até 1,20 m da base da planta; o médio entre 1,20 m e 2,5 m e o superior, acima de 2,5 m de altura. Foram considerados também os quadrantes norte, sul, leste e oeste. Foi coletado um ramo de aproximadamente 50 cm de cada um dos estratos e quadrantes, totalizando 12 ramos/planta. Esses ramos foram levados ao laboratório, medidos e seccionados em três porções de tamanhos iguais: basal, mediana e apical. Foi contado o número total de ovos, ninfas e fêmeas partenogenéticas adultas ao longo de cada parte do ramo.

2.5. Análise estatística

Os dados referentes ao número de afideos coletados nas duas áreas estudadas foram apresentados graficamente, sendo correlacionados com dados de temperatura e precipitação pluviométrica. Os gráficos foram confeccionados no aplicativo Computacional Statistica versão 5.5.

Os dados referentes à distribuição da espécie na área comercial foram transformados em porcentagens e tabulados.

Os dados referentes à distribuição da espécie na árvore foram tabulados, transformados em $\sqrt{n+0,5}$ para análise de variância, e tiveram as médias comparadas através do teste de Tukey a 5% de probabilidade, através do aplicativo Computacional Statistica versão 5.5

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Flutuação sazonal de *P. boernerii* em árvores adultas de *Pinus* spp.

Nas plantas adultas de *Pinus* do Centro Politécnico, coletou-se 13.756 exemplares de *P. boernerii* (ninfas e adultos), sendo 4.221 (30%) no primeiro ano de coleta e 9.535 (69%) no segundo ano. O tamanho da população elevou-se em aproximadamente 125% do primeiro para o segundo ano, indicando a tendência de *P. boernerii* estabelecer-se gradativamente em algumas árvores da área estudada. A densidade de *P. boernerii* não foi homogênea em todas as árvores, havendo uma forte concentração das populações em algumas plantas, porém não foi possível identificar se esses espécimes eram *P. taeda* ou *P. elliottii*.

No primeiro ano, o número de fêmeas adultas foi levemente superior ao de ninfas, respectivamente, 2.258 indivíduos (53,5%) e 1.963 (46,5%). Já, no segundo ano, a quantidade de ninfas foi maior, 5.996 indivíduos (63%) para 3.539 fêmeas adultas (37%). Foram coletados, ainda, 19.241 ovos durante os dois anos de avaliação, sendo 6.036 (58% do total) no primeiro ano e 13.205 no segundo (58% do total), mostrando o crescimento populacional acentuado de um ano para outro.

Colônias de *Pinus boernerii* foram detectadas nas árvores durante todo o período de avaliação, com sobreposição das gerações (Fig. 3). O mesmo padrão foi encontrado para o inseto no Quênia por Mailu *et al.* (1980) e nos Estados Unidos por McClure (1989b). A presença de formas móveis durante todo o ano permite que as correntes de vento sejam melhor aproveitadas e pode ser um dos fatores relacionados à rápida dispersão da espécie conforme descreveu McClure (1984a, 1989a, b).

Em 2004, observou-se apenas um pico populacional pronunciado em novembro, quando a temperatura começou a elevar-se em meados da primavera, seguida de uma queda da população até meados de abril/2005 (Fig. 3). O número de fêmeas adultas foi superior ao de ninfas durante todo o período avaliação. Oliveira *et al.* (2006) registraram, por sua vez, picos populacionais de *P. boernerii* em dois pontos de coleta no sul de São Paulo, ocorrendo ao final do inverno e começo da primavera/2004, nos meses de agosto e setembro. O pico mais tardio em Curitiba, em relação aos pontos de coleta em São Paulo, pode estar relacionado a um período mais prolongado de frio, comum na região de Curitiba durante a primavera, porém, não foram analisados dados de temperatura, os quais poderiam ser utilizados para comparação com este trabalho.

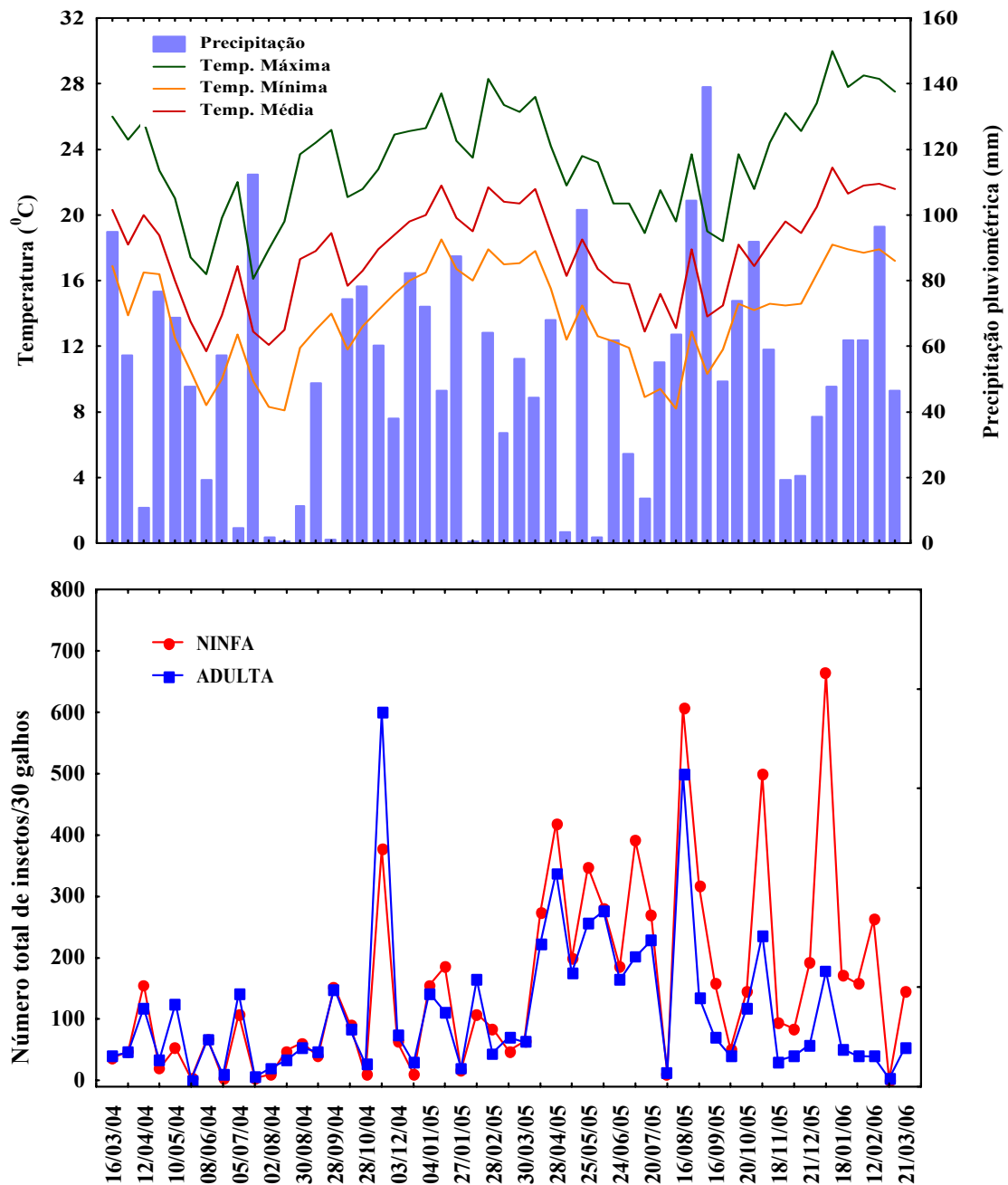


Fig. 3. Número total de ninfas e de fêmeas adultas de *Pineus boernerii* relacionado à temperatura e precipitação pluviométrica, em árvores estabelecidas de *Pinus* spp., no Centro Politécnico da UFPR, Curitiba, PR, de março/2004 a março/2006

No ano de 2005 *P. boernerii* apresentou um aumento da população em abril, o qual manteve-se até o começo de agosto. Em seguida, pode-se observar três picos pronunciados, os quais ocorreram em meados de agosto, início de novembro e de janeiro do ano seguinte, respectivamente (Fig. 3). Ao contrário do que ocorreu no ano de 2004 o número médio de ninfas foi superior ao número de fêmeas adultas.

Ao relacionar-se os picos populacionais de *P. boernerii* aos dados de precipitação pode-se observar que os principais picos ocorreram em períodos em que o volume de chuvas variou entre 30 e 100 mm, porém, ao se analisar o gráfico, pode-se determinar uma tendência da população diminuir em número em períodos de chuva superiores a 80 mm e de aumento do número de indivíduos em períodos de chuva inferiores a 20 mm. Em relação à temperatura, os principais picos populacionais ocorreram em temperaturas médias variando de 19,5°C a 26,5°C, mostrando que o inseto apresenta uma tendência a preferir temperaturas médias amenas a quentes. Da mesma forma que encontrado neste trabalho, *P. boernerii* apresentou picos populacionais em períodos mais secos e quentes no Quênia, no Malawi e nos Estados Unidos (Mailu *et al.* 1980; McClure 1989a; Chilima & Leather 2001).

Durante o período de dois anos foram coletados predadores associados às colônias de *P. boernerii* e de outras espécies de afídeos nas árvores de *Pinus*. No total, foram registrados 268 predadores entre larvas e adultos, pertencentes à família Coccinellidae (183 indivíduos) e as ordens Neuroptera (6 indivíduos) e Diptera (79 indivíduos). Ao associar-se o gráfico de flutuação dos coccinélidos com a flutuação de *P. boernerii* pode-se observar que os principais picos do inseto, nos dois anos avaliados, corresponderam a períodos de queda das populações de Coccinellidae (Fig. 4), podendo indicar uma interação predador - presa entre as espécies de coccinélidos e *P. boernerii*. O maior pico dos coccinélidos ocorreu em abril de 2005, período esse em que a população de *P. boernerii* encontrava-se baixa, porém, observou-se, durante esta época, uma alta população do pulgão-das-acículas *Eulachnus rileyi* (Williams, 1911), o qual pode ter servido de alimento para os predadores. Pode-se observar, também, que o primeiro pico de *P. boernerii* ocorreu logo após a queda da população de coccinélidos.

Os picos populacionais dos Diptera predadores apresentaram picos populacionais sobrepondo-se aos principais picos de *P. boernerii*, com um maior número de larvas ocorrendo em novembro/2004 (Fig. 5). Não foi possível realizar a criação destas larvas para a identificação da família e espécies associadas a *P. boernerii*. Houve uma baixa incidência de Neuroptera na área estudada, sendo detectados indivíduos pertencentes às famílias Hemerobiidae e Chrysopidae, as quais, segundo Mills (1990) e Mailu *et al.* (1980), já foram registradas na Europa associadas às colônias de *P. boernerii*.

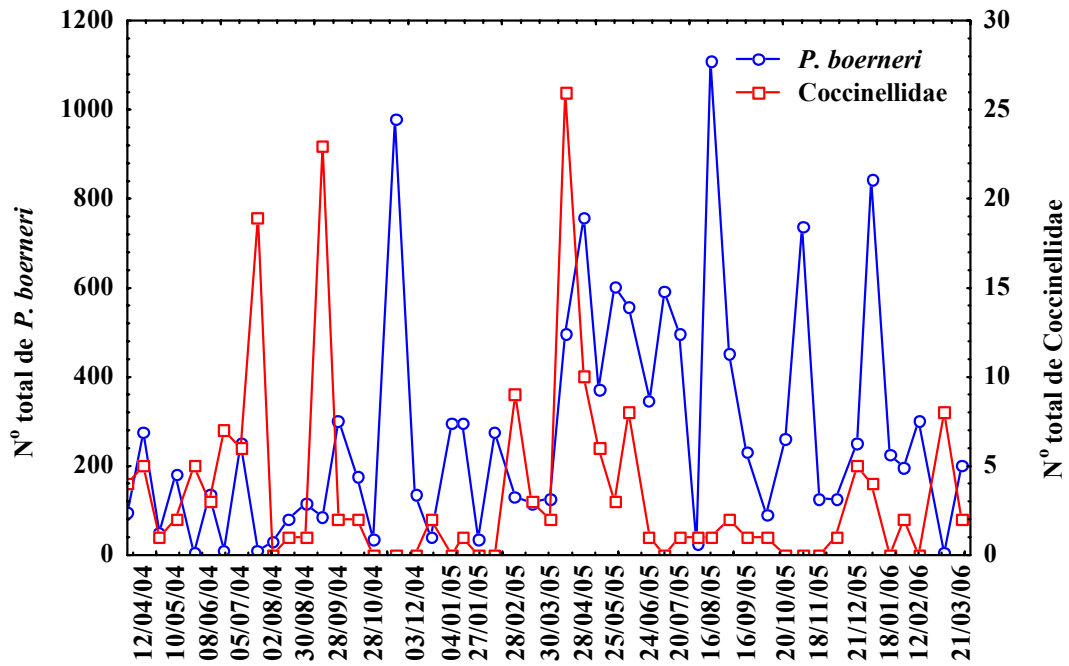


Fig. 4. Número total de *Pineus boernerii* e de Coccinellidae coletados em árvores estabelecidas de *Pinus* spp., no Centro Politécnico da UFPR, Curitiba, PR, de março/2004 a março/2006.

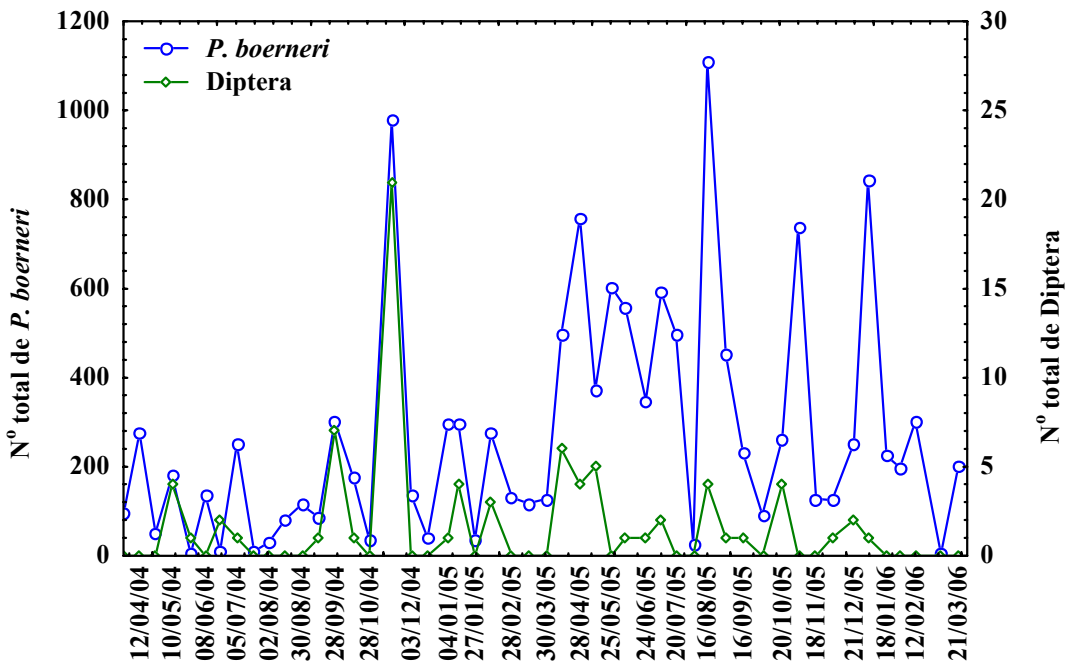


Fig. 5. Número total de *Pineus boernerii* e de Diptera coletados em árvores estabelecidas de *Pinus* spp., no Centro Politécnico da UFPR, Curitiba, PR, de março/2004 a março/2006.

3.2. Flutuação sazonal de *P. boernerii* em área de cultivo comercial de *P. taeda*

Na área de plantio comercial com árvores de quatro anos de *P. taeda*, no município de Campo do Tenente, o número de insetos foi inferior ao coletado no mesmo período em Curitiba nas árvores mais velhas. Na área, foi registrado um total de 1.801 indivíduos, sendo 943 fêmeas adultas e 858 ninfas, correspondendo, respectivamente a 52,4% a 47,6% do total de insetos coletados. O número de ovos coletados no período foi de 1.937 exemplares, correspondendo à 52% do total. Tanton & Alder (1977) mencionam que o complexo *boernerii/pini*, em *P. radiata* na Austrália, infestam preferencialmente árvores de cinco anos de idade.

Assim como ocorreu no ano de 2004 em Curitiba, o número de fêmeas adultas foi superior ao número de ninfas, padrão igual ao encontrado por Mailu *et al.* (1980) para *P. boernerii* infestando várias espécies de *Pinus* no Quênia. Segundo os autores um número elevado de formas adultas pode estar relacionado a períodos de alta precipitação, que levariam a uma maior mortalidade de ninfas móveis.

As populações estiveram presentes nas árvores durante todo o período avaliado (Fig. 6), com um pico ocorrendo em novembro, com temperatura média de 18°C e precipitação de 55 mm e outro, maior, do começo de dezembro até o começo de janeiro, correspondendo ao final da primavera e começo do verão, com uma temperatura média de 21°C e precipitação de cerca de 50 mm. Assim como ocorreu nos dois anos amostrados em Curitiba, a população sofreu uma queda no período de verão intenso que durou até o final da avaliação, confirmando a preferência da espécie por temperaturas amenas a quentes.

Foram coletados 33 exemplares de predadores (larvas, pupas e adultos) associados às árvores avaliadas em Campo do Tenente: 15 Coccinellidae, 5 Neuroptera e 13 Diptera. Os coccinélídeos apresentaram o maior pico populacional no período de julho a agosto (Fig. 7), correspondendo ao pico observado em Curitiba, no mesmo ano, e que podem estar relacionados a um aumento na quantidade de espécimes de *Cinara atlantica* (Wilson, 1919) associados às populações de *P. boernerii*. As espécies de Diptera tiveram seus picos populacionais no final do inverno e no período de verão intenso (Fig. 8). Assim como em Curitiba, os picos populacionais dos dois grupos de predadores mostraram-se relacionados à uma diminuição na população do Adelgidae.

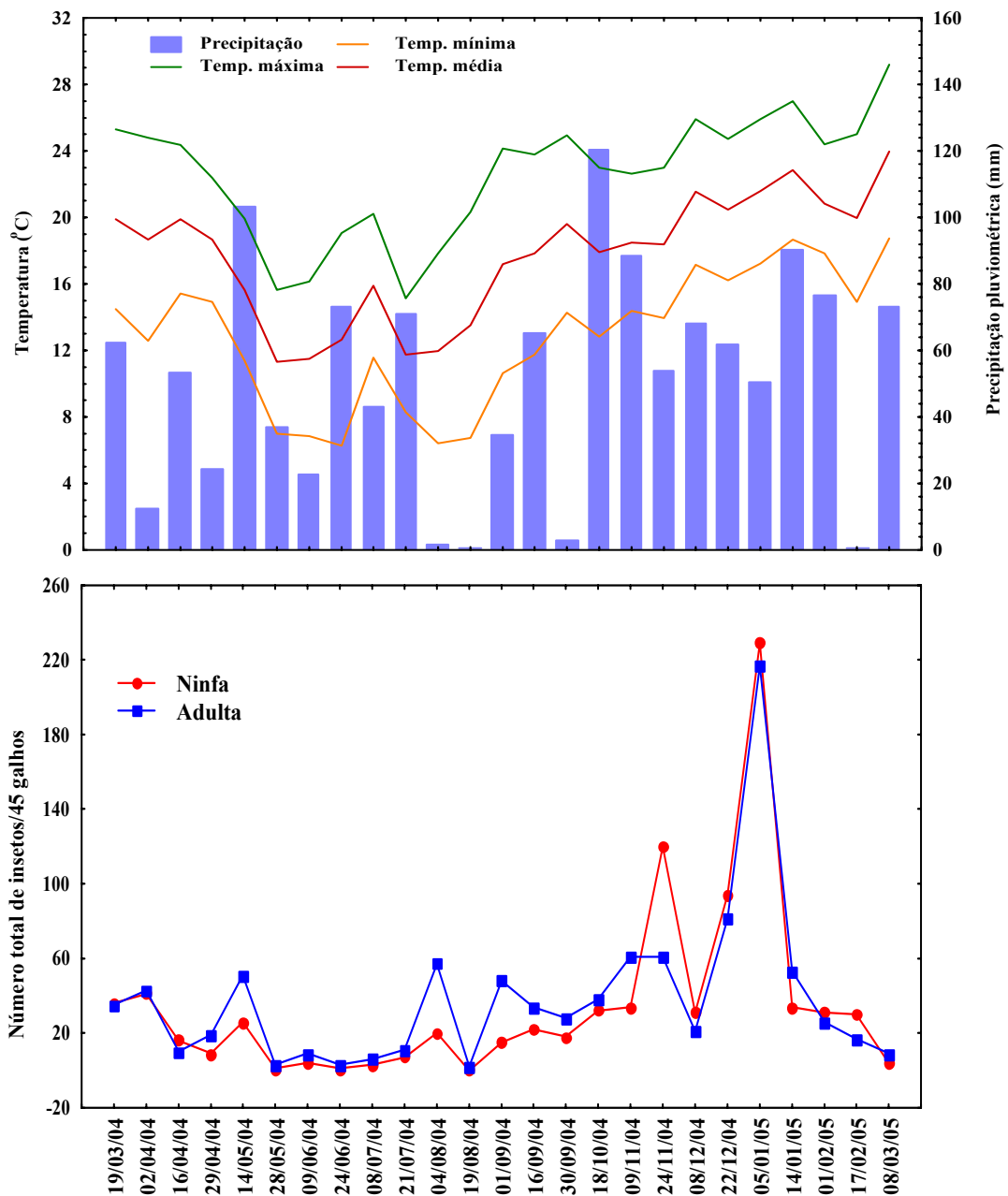


Fig. 6. Número total de ninfas e fêmeas adultas de *Pineus boernerii* em área de plantio comercial de *Pinus taeda*, relacionado à temperatura e precipitação pluviométrica, em Campo do Tenente, PR, no período de março/2004 a março/2005.

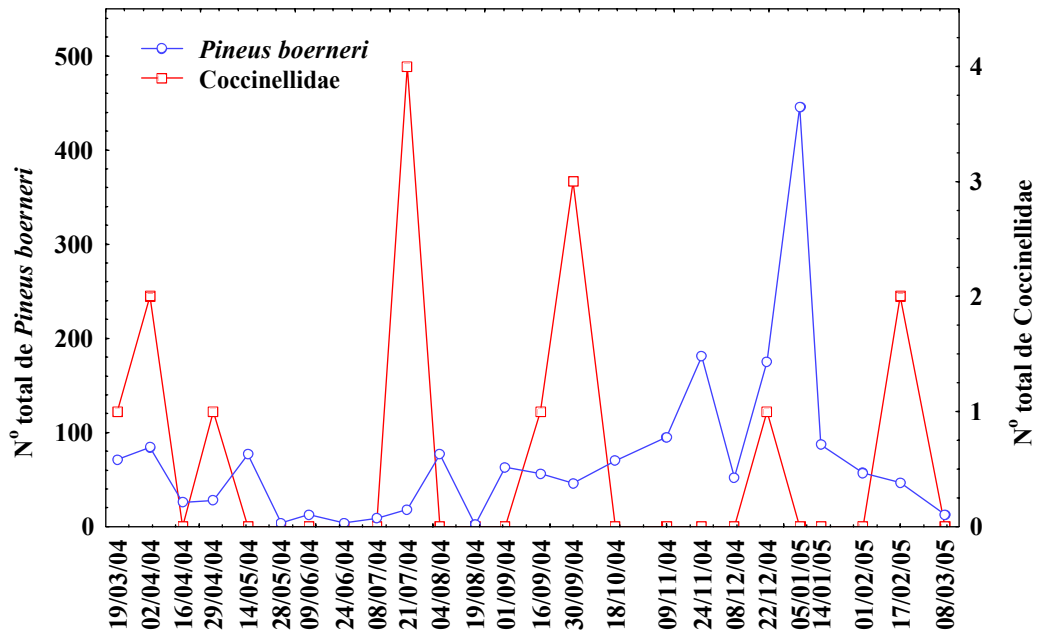


Fig. 7. Número total de *Pineus boernerii* e de Coccinellidae em área de plantio comercial de *Pinus taeda*, em Campo do Tenente, PR, no período de março/2004 a março/2005.

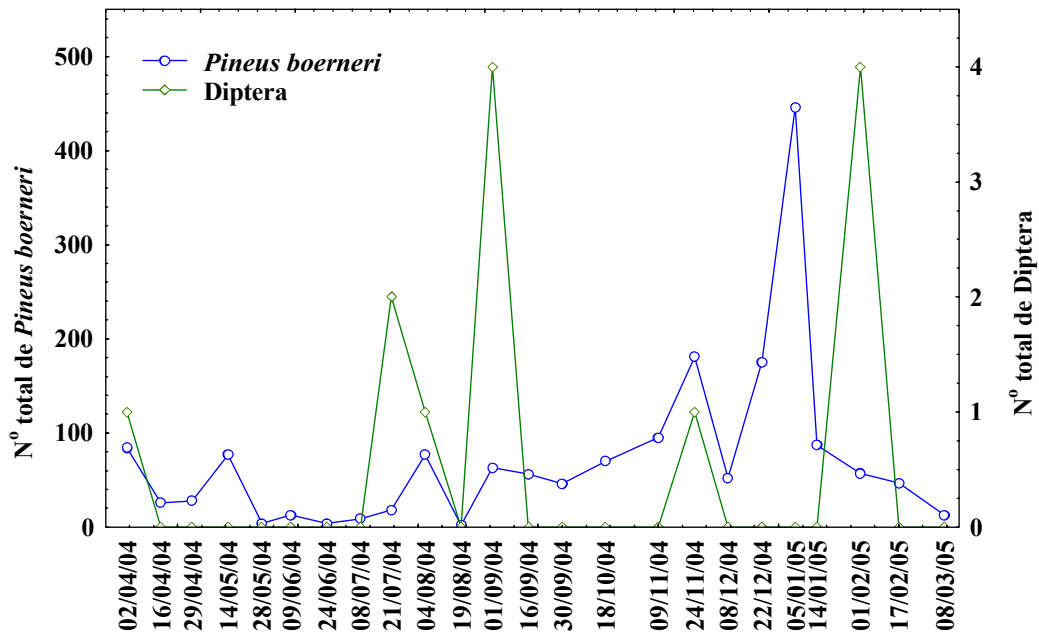


Fig. 8. Número total de *Pineus boernerii* e de Diptera em área de plantio comercial de *Pinus taeda*, em Campo do Tenente, PR, no período de março/2004 a março/2005.

3.3. Distribuição de *P. boernerii* na área de plantio comercial de *P. taeda*

Na primeira avaliação, durante o outono/2004, *P. boernerii* esteve presente em 20% das árvores. Essas porcentagens aumentaram nas amostragens realizadas durante o inverno e primavera, respectivamente, 38% e 34%, havendo uma leve queda no verão (28%) (Fig. 9), correspondendo aproximadamente ao padrão de flutuação populacional de insetos nas plantas deste local. Em um estudo feito em Nova Campina e Buri, SP, em plantações de *P. taeda* com dois e três anos de idade, Oliveira *et al.* (2006) registraram taxas de infestação bastante próximas ao encontrado neste trabalho, durante o período de maio/2004 a setembro/2005, com 9 a 33% das plantas infestadas na primeira área e 0 a 25% na segunda.

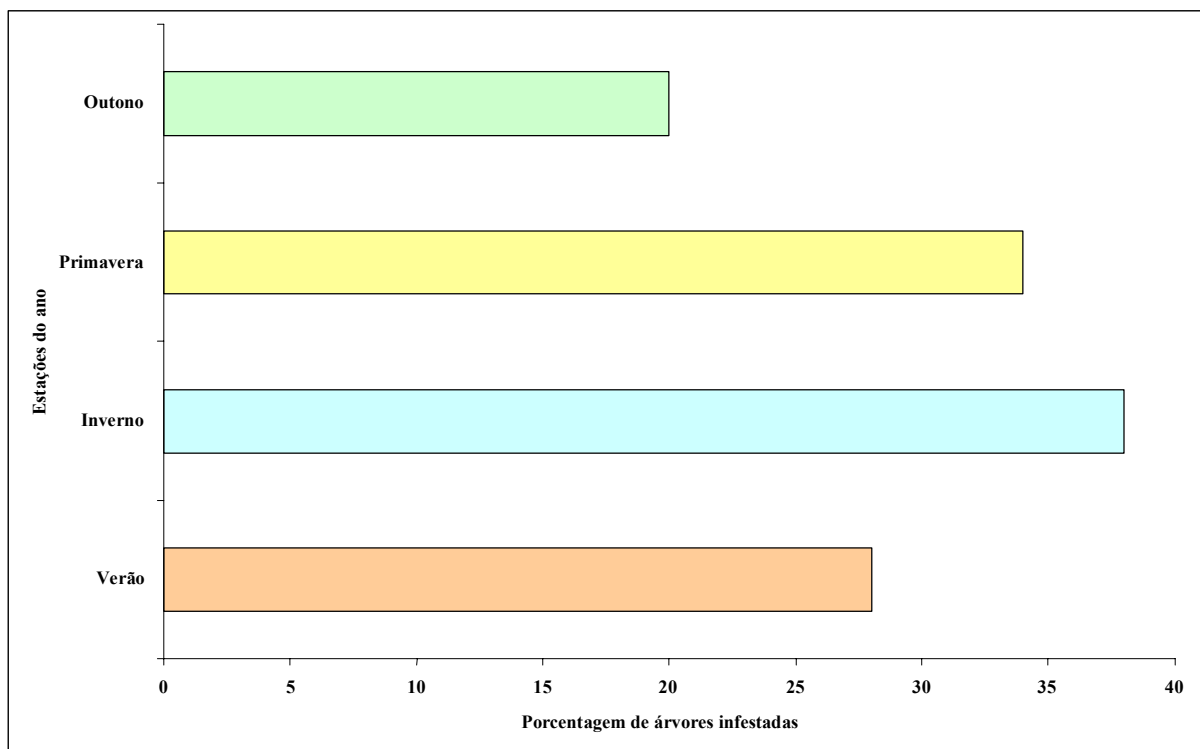


Fig. 9. Porcentagem de infestação de *Pineus boernerii* em 100 árvores de *Pinus taeda* de quatro anos de idade, durante as quatro estações do ano, em Campo do Tenente, PR, 2004/2005.

As maiores porcentagens de infestação ocorreram nos sublocais 1, 2, 3 e 4, situados próximos às estradas e ao bosque de árvores adultas presentes a oeste (Figs. 2, 10). O local 5, mais no interior do bosque, apresentou apenas 1% das árvores infestadas durante todo o período, evidenciando que a dispersão de *P. boernerii* ocorre das bordas para o centro, na área estudada.

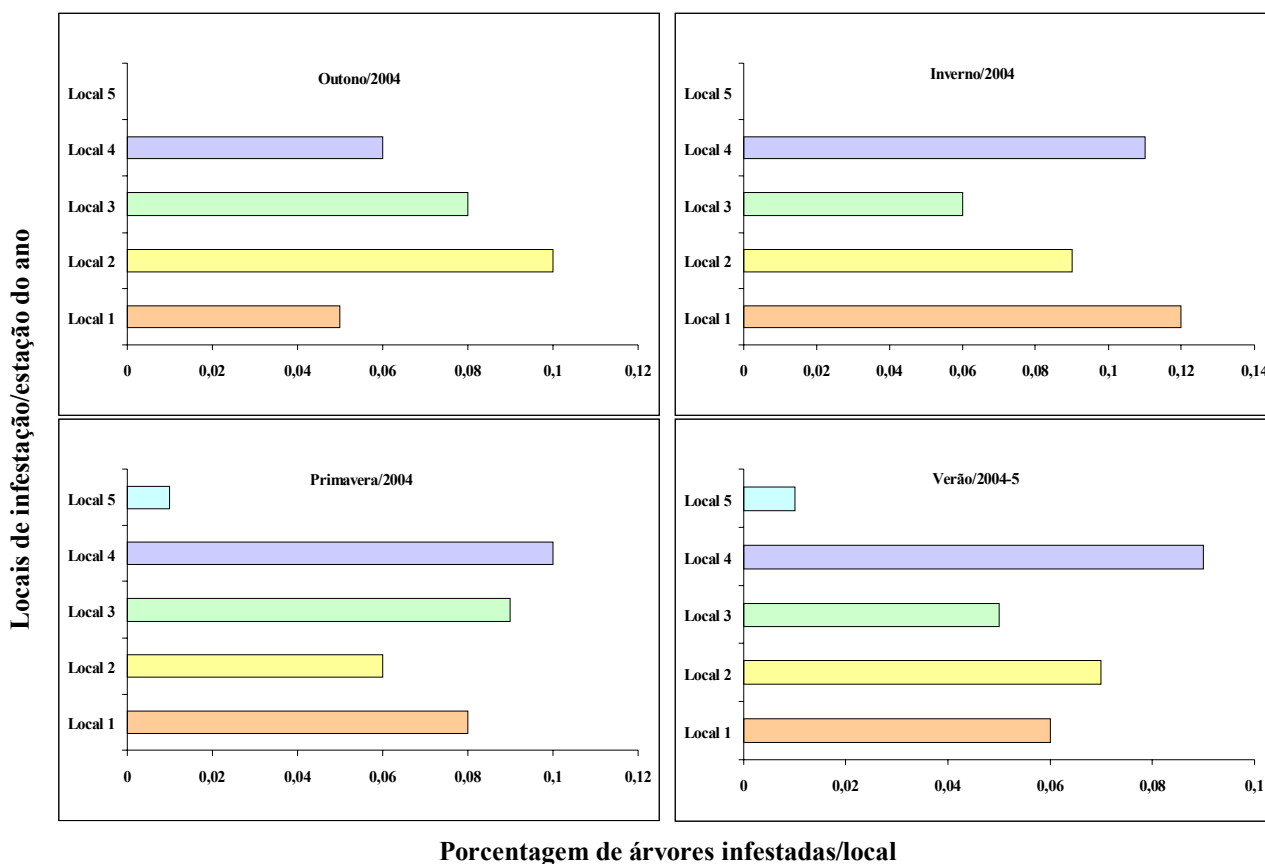


Fig. 10. Porcentagem sazonal de infestação de *Pineus boernerii* em cinco subáreas da plantação comercial de *Pinus taeda* de quatro anos de idade, em Campo do Tenente, PR, 2004/2005.

3.4. Distribuição de *P. boernerii* nas árvores de *Pinus*

Foram contados, nos 120 galhos das árvores de quatro anos de idade da área de plantio comercial, um total de 5.771 espécimes de *P. boernerii*, com 3.235 ninfas e 2.536 fêmeas adultas, além de cerca de 4.400 ovos, os quais foram mantidos nas colônias até a eclosão e foram contabilizados a fim de se determinar sua distribuição nos galhos. Assim, a composição da população era de cerca de 31% de formas adultas, 25% de ninfas e os ovos representavam 44%.

A distribuição dos insetos nos quadrantes foi homogênea, como confirmado pela análise de variância e pelo teste de comparação de médias (Tabelas 2 e 5), com um total de 1.766, 3.033, 2.400 e 2.972 indivíduos (incluindo os ovos), respectivamente nos quadrantes norte, sul, leste e oeste (Fig. 12A).

Analisando a distribuição vertical dos insetos na planta, observa-se que no estrato superior da árvore estavam, aproximadamente, 29% da população (2.924 indivíduos); no mediano 26% (2.685) e no inferior 45% (4.562) (Fig. 12B). Assim como para os quadrantes, a análise de variância (Tabela 5) não mostrou diferença significativa quando considerados os três estratos, apesar da maior concentração de indivíduos no terço inferior da planta (Tab. 3).

Tabela 2. Número médio e erro padrão da média de *Pineus boernerii* distribuídos nos quatro quadrantes em 120 galhos de 10 árvores de *Pinus taeda* em Campo do Tenente, PR, Nov/2004.

	Ovo	Ninfa	Adulta	Média Total
Sul	14,64 ± 3,43 Aa	10,10 ± 2,70 Aa	8,98 ± 2,19 Aa	11,23 ± 1,63 a
Norte	9,20 ± 2,35 Aa	5,71 ± 1,47 Aa	4,69 ± 1,10 Aa	6,54 ± 0,99 a
Leste	12,45 ± 2,85 Aa	7,69 ± 2,13 Aa	6,52 ± 1,61 Aa	8,89 ± 1,31 a
Oeste	12,57 ± 4,65 Aa	12,47 ± 3,97 Aa	7,99 ± 2,35 Aa	11,00 ± 2,18 a
Média Total	12,22 ± 1,71 A	8,99 ± 1,37 AB	7,04 ± 0,94 B	

Letras maiúsculas nas linhas indicam diferenças estatísticas significativas entre os estágios de *P. boernerii*, letras minúsculas nas colunas indicam diferenças entre os quadrantes pelo Teste de Tukey ($p < 0,05\%$).

McClure (1982, 1984a, 1990) também encontrou diferença significativa na distribuição vertical de *P. boernerii* em *P. resinosa*, com uma alta concentração populacional na porção inferior da planta, evidenciando a tendência do inseto em se concentrar em porções mais velhas da planta, como determinado nesta pesquisa.

Tabela 3. Número médio e erro padrão da média de espécimes de *Pineus boernerii* distribuídos em 120 galhos de 10 árvores de *Pinus taeda* em Campo do Tenente, PR, em três estratos da planta, Nov/2004.

	Ovo	Ninfa	Adulta	Média Total
Superior	41,80 ± 12,18 Aa	32,40 ± 11,31 Aa	23,23 ± 7,52 Aa	32,49 ± 6,07 a
Médio	35,73 ± 13,24 Aa	32,37 ± 12,86 Aa	21,40 ± 7,22 Aa	29,83 ± 6,56 a
Inferior	69,13 ± 24,94 Aa	43,03 ± 18,38 Aa	39,90 ± 13,65 Aa	50,68 ± 11,24 a
Média Total	48,89 ± 10,25 A	35,94 ± 8,30 A	28,17 ± 5,73 A	

Letras maiúsculas nas linhas indicam diferenças estatísticas significativas entre os estágios de *P. boernerii*, letras minúsculas nas colunas indicam diferenças entre os estratos pelo Teste de Tukey ($p < 0,05\%$).

A distribuição da espécie ao longo dos galhos apresentou um padrão de distribuição definido (Fig. 12C), com as colônias concentrando-se na parte basal, aproximadamente 63% (6.384 dos espécimes); 28% (2.826) estavam na porção mediana e o restante 9% (961), no ápice do galho.

Este padrão de distribuição, observado para todas as formas, mostra uma preferência da espécie pelas porções mais velhas do galho (Tabelas 4 e 5), como observado também para a localização no estrato inferior. Como a espécie é diminuta e possui longos estiletes, há uma preferência por sítios mais protegidos com ranhuras e com a casca mais espessa onde as ninfas podem se fixar e estabelecer as colônias (Fig. 11A). À medida que os sítios vão ficando indisponíveis e o galho vai envelhecendo, as ninfas dispersam-se mais para o topo, onde se fixam (Fig. 11B). Era comum observar porções velhas dos galhos com fêmeas adultas mortas e resquícios de colônias.

Uma vez que as colônias tendem a se concentrar nas porções mais velhas da árvore, no processo de poda, teriam que ser cortados os galhos inferiores desde a base para auxiliar na diminuição das populações de *P. boernerii* ou mesmo para a sua eliminação das árvores infestadas. Deve-se considerar, também, que a investigação foi realizada em apenas uma estação do ano, a primavera, quando havia uma alta população de *P. boernerii*, e que deve ser repetida nas demais estações, de modo a verificar se o mesmo padrão se repete ao longo de todo o ano.

Tabela 4. Número médio \pm erro padrão da média de indivíduos de *Pineus boernerii* distribuídos ao longo dos galhos de *Pinus taeda* em Campo do Tenente, PR, Nov/2004.

	Ovo	Ninfa	Adulta	Média Total
Basal	73,83 \pm 17,67 Aa	66,33 \pm 22,67 Aa	52,57 \pm 15,33 Aa	64,24 \pm 10,78 a
Mediano	31,67 \pm 7,02 Aa	28,0 \pm 7,37 Aab	24,13 \pm 5,19 Aab	27,93 \pm 3,78 b
Apical	7,3 \pm 2,39 Ab	13,5 \pm 3,9 Ab	7,83 \pm 2,23 Ab	9,54 \pm 1,7 c
Média Total	37,6 \pm 6,95 A	35,94 \pm 8,3 A	28,18 \pm 5,73 A	

Letras maiúsculas nas linhas indicam diferenças estatísticas significativas entre os estágios de *P. boernerii*, letras minúsculas nas colunas indicam diferenças na distribuição nos galhos, pelo Teste de Tukey ($p < 0,05\%$).

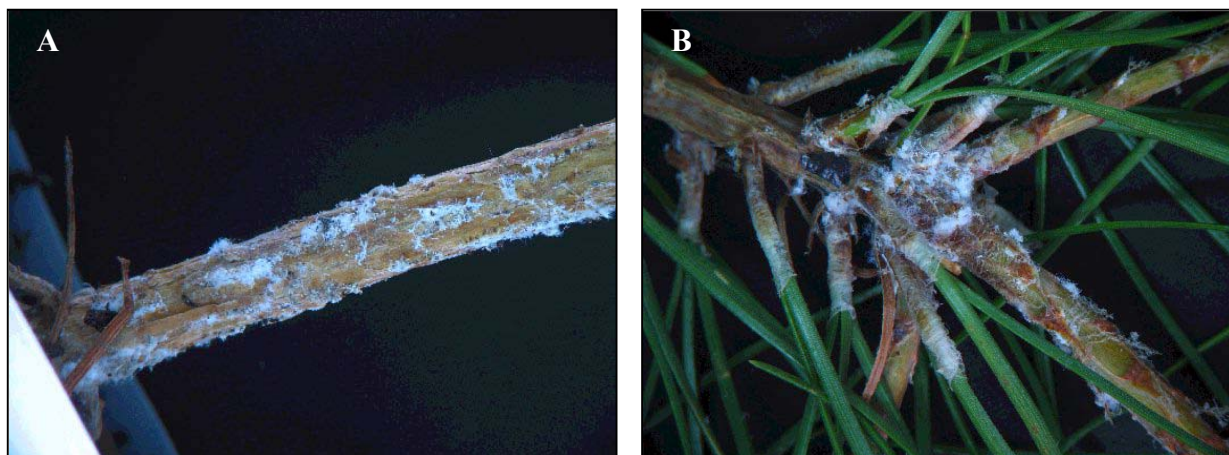


Fig 11. Colônias de *Pineus boernerii* infestando o tronco (A), a base das acículas e de galhos mais jovens (B) de *Pinus taeda* de um ano de idade.

Chilima & Leather (2001) determinaram a preferência de *P. boernerii* por porções mais jovens dos galhos de *P. kesyia* na África, ao contrário do encontrado neste trabalho. Contudo, os mesmos autores discutem que hospedeiros diferentes podem influenciar, de maneira diversa, a distribuição de insetos herbívoros nas plantas. A mudança na concentração de defesas químicas e nutrientes entre várias partes de uma planta também pode determinar a distribuição da espécie dentro de um hospedeiro (Awmack & Leather 2002). Além disso, fatores como o tamanho da população a deterioração do hospedeiro, e a coabitação com outras espécies, afetam grandemente a escolha de sítios de colonização e a dinâmica populacional dos Adelgidae (McClure 1984a).

Segundo McClure (1984a), *P. boernerii* é capaz de alternar dois sítios de alimentação em *P. resinosa*, nos Estados Unidos: durante o verão e na primavera as ninfas se estabelecem principalmente nas acículas, mas, durante o inverno, ficam nas cascas dos galhos, o que possibilita aos insetos fugirem de pontos deteriorados na planta e manterem estáveis a sua densidade populacional. Zwolinski (1990) encontrou altas infestações de *P. pini* em porções do caule recobertas por folhas verdes em três espécies de *Pinus*. Segundo o autor, partes apicais dos brotos apresentam um alto grau de infestação no início do estabelecimento das colônias.

Tabela 5: Análise de variância para o efeito da posição do quadrante, do estrato da árvore e da porção do galho de *Pinus taeda* na distribuição de ovos, ninfas e adultas de *Pineus boernerii*, em Nov/2004, Campo do Tenente, PR.

Fontes de variação	GL	Quadrados médios (MS)	Valores de F ($\sqrt{n+0,5}$)
Nº ovos x quadrante	3	5,37	0,74
Nº ninfas x quadrante	3	6,57	1,36
Nº adultas x quadrante	3	3,14	0,85
Nº total x quadrante	3	11,87	2,26
Nº ovos x estrato	2	40,21	1,67
Nº ninfas x estrato	2	2,91	0,17
Nº adultas x estrato	2	21,43	1,67
Nº total x estrato	2	11,59	1,87
Nº ovos x porção do galho	2	157,2	9,69*
Nº ninfas x porção do galho	2	65,49	4,21*
Nº adultas x porção do galho	2	83,27	7,34*
Nº total x porção do galho	2	294,62	20,77*

* Significativo a 5% de probabilidade

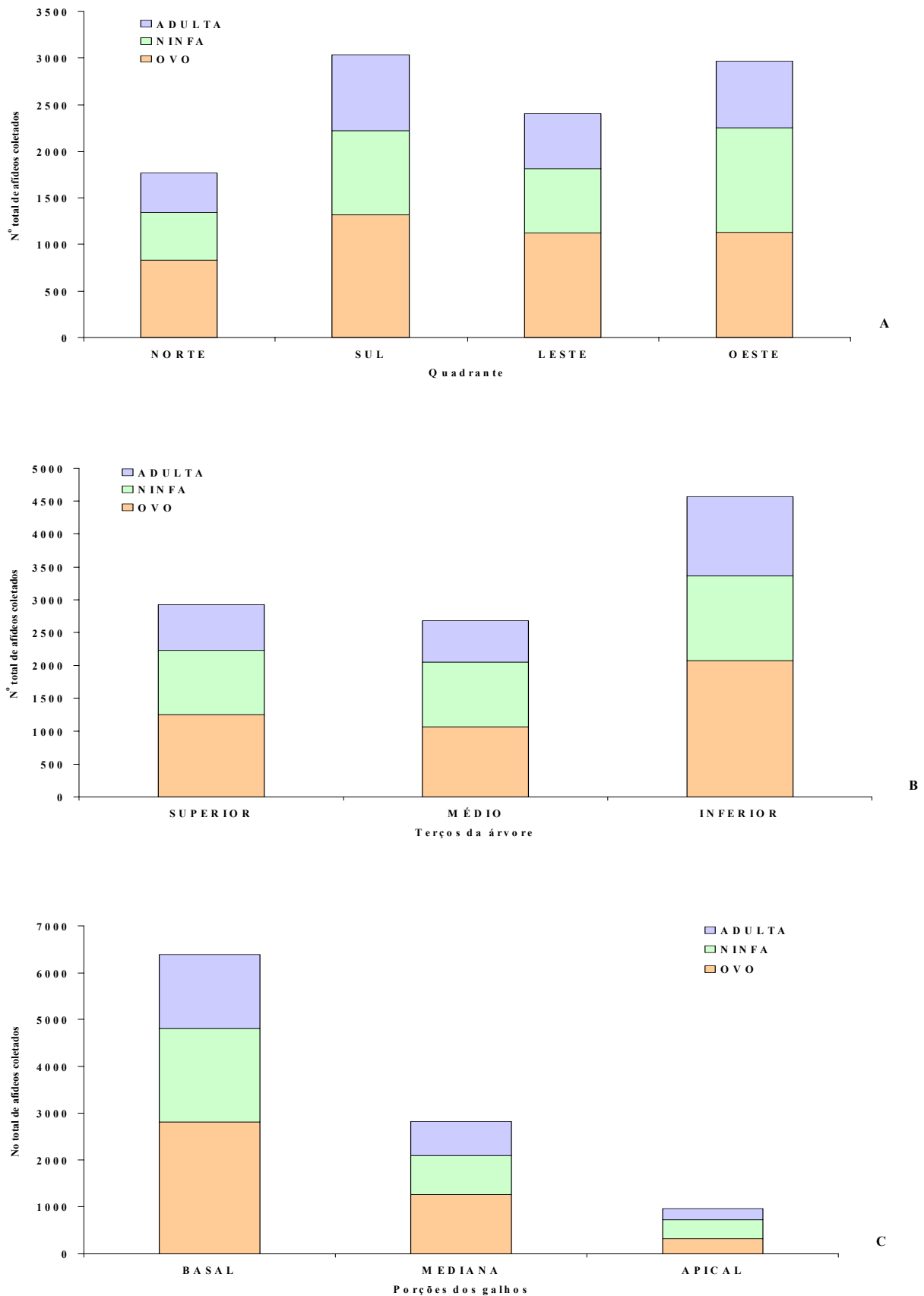


Fig. 12. Proporção das formas de *Pineus boernerii* coletadas em 120 galhos de 10 árvores de quatro anos de *Pinus taeda* em Campo do Tenente, PR, Novembro/2004. A. Distribuição nos quadrantes; B. Distribuição nos estratos; C. Distribuição nas porções dos galhos.

4. CONCLUSÕES

O pulgão-lanífero-do-pinus, *Pineus boernerii*, ocorre em Curitiba, PR e Campo do Tenente, PR, durante todo o ano, com sobreposição de gerações.

O padrão de flutuação sazonal de *P. boernerii* não é bem definido, mas, aparentemente, o aumento populacional é influenciado por temperaturas amenas a altas e baixa pluviosidade.

Ocorrem predadores associados às populações de *P. boernerii*, que exercem algum impacto sobre as populações do Adelgidae. Não são registrados parasitóides e patógenos nas áreas estudadas.

Há uma preferência notável de *P. boernerii* por árvores adultas bem estabelecidas, como aquelas avaliadas na região de Curitiba. As populações também mostram uma preferência pelas partes mais velhas, instalando-se preferencialmente no estrato inferior da planta e na porção basal dos galhos.

O efeito de borda é evidenciado pela infestação mais elevada de *P. boernerii* nas árvores desta área, em Campo do Tenente.

5. BIBLIOGRAFIA

- Awmack, C. S. & S. R. Leather. 2002. Host plant quality and fecundity in herbivorous insects. **Annual Review of Entomology 47**: 817 – 844.
- Binazzi, A. & V. Francardi. 2001. Notes on morphology, biology and ecology of *Dreyfusia piceae* (Ratz.) in Italy (Aphidoidea: Adelgidae). **Redia 84**: 33 – 44.
- Blackman, R. L. & V. F. Eastop 1994. **Aphids on the world's trees: an identification and information guide**. Wallingford, CAB International, 987 p.
- Chilima, C. Z. & S. R. Leather. 2001. Within-tree and seasonal distribution of the pine woolly aphid *Pineus boernerii* on *Pinus kesiya* trees. **Agricultural and Forest Entomology 3**: 138 – 145.
- Culliney, T. W.; J. W. Beardsley Jr. & J. J. Drea. 1988. Population regulation of the eurasian pine adelgid (Homoptera: Adelgidae) in Hawaii. **Journal of Economic Entomology 81**: 142 – 147.
- Cumming, M. E. P. 1962. The biology of *Pineus similis* (Gill.) (Homoptera: Phylloxeridae) on spruce. **The Canadian Entomologist 94**: 395 – 408.
- Fay, P. A. & T. G. Whitam. 1990. Within-plant distribution of a galling adelgid (Homoptera: Adelgidae): the consequences of conflicting survivorship, growth and reproduction. **Ecological Entomology 15**: 245 – 254.
- Havill, N. P. & R. G. Foottit. 2007. Biology and Evolution of Adelgidae. **Annual Review of Entomology 52**: 325 – 349.
- Jackson, D. L. & A. F. G. Dixon. 1996. Factors determining the distribution of the green spruce aphid, *Elatobium abietinum*, on young and mature needles of spruce. **Ecological Entomology 21**: 358 – 364.
- Mailu, A.M.; C.P.M. Khamal & D.J.W. Rose. 1980. Population dynamics of pine woolly aphid, *Pineus pini* (Gmelin) (Homoptera: Adelgidae) in Kenya. **Bulletin of Entomological Research 70**: 483 – 490.
- McClure, M. S. 1982. Distribution and damage of two *Pineus* species (Homoptera: Adelgidae) on red pine in New England. **Annals of Entomological Society of America 75**: 150 – 157.
- McClure, M. S. 1984a. Influence of cohabitation and resinosis on site selection and survival of *Pineus boernerii* Annand and *P. coloradensis* (Gillette) (Homoptera: Adelgidae) on red pine. **Environmental Entomology 13**: 657 – 663.

- McClure, M. S. 1984b. *Pineus boernerii* Annand (Homoptera: Adelgidae): a new or another record from the People's Republic of China? **Proceedings of Entomological Society of Washington** **86**: 460 – 461.
- McClure, M. S. 1989a. Importance of weather to the distribution and abundance of introduced Adelgidae and scale insects. **Agricultural and Forest Meteorology** **47**: 291 – 302.
- McClure, M. S. 1989b. Biology, population trends and damage of *Pineus boernerii* and *P. coloradensis* (Homoptera: Adelgidae) on red pine. **Environmental Entomology** **18**: 1066 – 1073.
- McClure, M. S. 1990a. Cohabitation and host species effects on the population growth of *Matsucoccus resinosa* (Homoptera: Margarodidae) and *Pineus boernerii* (Homoptera: Adelgidae) on red pine. **Environmental Entomology** **19**: 672 – 676.
- McClure, M. S. 1990b. Role of wind, birds, deer and humans in the dispersal of hemlock woolly adelgid (Homoptera: Adelgidae). **Environmental Entomology** **19**: 36 – 43.
- McClure, M. S. 1991. Density-dependent feedback and population cycles *Adelges tsugae* (Homoptera: Adelgidae) on *Tsuga canadensis*. **Environmental Entomology** **20**: 258 – 264.
- McClure, M. S. & C. A. S.-J. Chea. 1999. Reshaping the ecology of invading populations of hemlock woolly adelgid, *Adelges tsugae* (Homoptera: Adelgidae), in eastern North America. **Biological Invasions** **1**: 247 – 254.
- McClure M. S. & C. A.S.-J. Chea. 2002. **Important mortality in the life cycle of hemlock woolly adelgid, *Adelges tsugae* (Homoptera: Adelgidae), in Northeastern United States**. Proceedings of the Hemlock Woolly Adelgidae in the Eastern United States Symposium. February 13 – 22, p 269 – 273. East Brunswick, New Jersey.
- Mills, N. J. 1990. Biological control of forest aphid pests in Africa. **Bulletin of Entomological Research** **80**: 31 – 36.
- Oliveira, N.C.; C.F. Wilcken; P. J. Ferreira-Filho; E. B. do Couto; A. V. Lima & D. T. do Prado. Flutuação populacional do pulgão-lanífero-do-pinus *Pineus boernerii* (Homoptera: Adelgidae) em plantios de *Pinus taeda* na região sul do estado de São Paulo. **Anais do XXI Congresso Brasileiro de Entomologia**, Recife, PE.
- Parker, B. L.; M. Skinner; S. Gouli & H. B. Teillon. 2002. **Cold temperatures. Will they limit range expansion?** Proceedings of the Hemlock Woolly Adelgidae in the Eastern United States Symposium. February 5 – 7, p 269 – 273. East Brunswick, New Jersey.

- Salom, S. M.; A. A. Sharov; W. T. Mays & J. W. Neal. 2001. Evaluation of aestival diapause in hemlock woolly adelgid (Homoptera: Adelgidae). **Environmental Entomology** **30**: 877 – 882.
- Tanton, M. T. & D. Alder. 1977. The distribution and possible effects of the woolly aphid *Pineus* (Homoptera: Adelgidae) on *Pinus radiata* D. Don growing in the Australian capital territory. **Australian Forest Research** **7**: 253 – 263.
- Yaseen, M. & M. A. Ghani. 1971. Descriptions and notes on the biology of four new species of Adelgidae from west Pakistan. **Bulletin of Entomological Research** **61**: 191 – 205.
- Zondag, R. 1977. *Pineus laevis* (Maskell) (Homoptera: Aphidoidea: Adelgidae), pine twig chermes or pine woolly aphid. **New Zealand Forest Service, Forest and Timber Insects in New Zealand** **25**. Compiled: 1977, limited revision 2001.
- Zwolinski, J. B. 1990. Preliminary evaluation of the impact of the pine woolly aphid on condition and growth of pines in the Southern Cape. **South African Forestry Journal** **153**: 22 – 26.

Capítulo IV

Uso da técnica de monitoramento eletrônico (EPG) para avaliar o comportamento alimentar de *Pineus boernerii* Annand, 1928 (Hemiptera: Adelgidae).

Uso da técnica de monitoramento eletrônico (EPG) para avaliar o comportamento alimentar de *Pineus boernerii* Annand, 1928 (Hemiptera: Adelgidae).

RESUMO

O conhecimento das interações que ocorrem entre *Pineus boernerii* Annand, 1928 (Hemiptera: Adelgidae) e suas plantas hospedeiras é de grande relevância para o conhecimento científico. O monitoramento eletrônico ou EPG (*Electrical Penetration Graph*) é uma tecnologia que possibilita a visualização gráfica dos eventos relacionados à movimentação dos estiletos dos insetos dentro dos tecidos da planta, possibilitando o estudo de mecanismos físicos e químicos de resistência da planta. O objetivo deste capítulo foi caracterizar o padrão de alimentação de *P. boernerii* em *Pinus taeda* L através do monitoramento eletrônico, como informação fundamental para a pesquisa envolvendo as interações inseto-planta. Fêmeas ovíparas ápteras de *P. boernerii* foram isoladas em mudas de *P. taeda*, e fixadas a um aparelho de monitoramento eletrônico GIGA-4, DC, em um total de 22 repetições, com um tempo de registro de 24 horas para cada indivíduo. Dois padrões distintos de ondas foram identificados através do monitoramento eletrônico. O primeiro, chamado onda M, apresentou nível extracelular, e não esteve presente em todos os registros. O seu padrão é irregular, com subidas e descidas de níveis e uma baixa frequência, em torno de 1,0 Hz. As fêmeas permaneceram no nível M por 1,7 h em média, porém, não foi possível correlacionar esta onda a nenhum comportamento dos estiletos. O segundo padrão o de onda P, representando atividade intracelular, com dois subpadrões característicos: um com uma alta amplitude, presente em todos os registros, e outro com baixa amplitude, que pode estar presente, ou não, e que ocorre sempre intercalado com o padrão de alta amplitude. Ambos apresentam frequência em torno de 4,0 Hz, e a origem da onda está na resistência. Os insetos permaneceram, em média, 22,3 h no padrão P e foi observada a excreção de “*honeydew*”, evidenciando que a onda está relacionada a alimentação. Os padrões encontrados para *P. boernerii* mostram pouca semelhança com aqueles descritos para os afídeos da família Aphididae, sendo necessário que se façam estudos histológicos dos tecidos da planta com a posição dos estiletos para se determinar o significado preciso de cada onda.

Use of electrical penetration graphs (EPG) to evaluate the feeding behavior of *Pineus boernerii* Annand, 1928 (Hemiptera: Adelgidae)

ABSTRACT

The information about the interactions between the *Pineus boernerii* Annand, 1928 (Hemiptera: Adelgidae) and its host plant is important for science. The electrical penetration graph (EPG) is a novel technology that shows graphically the events related to the movement of the insect stylets inside the plant tissues. In this way, it is possible to study the factors that affect the feeding behavior in response to the physical and chemical defense mechanisms of the plant. The objective of this chapter was to characterize the feeding patterns of *P. boernerii* on *Pinus taeda* L using EPG to generate information for research involving the aphid-host plant interactions. Apterous oviparous females of *P. boernerii* were isolated on seedlings of *P. taeda* and hooked to the EPG equipment GIGA-4, DC. A total of 22 replicates were analyzed, during 24 h for each insect. Two distinct wave patterns were recorded. The first was called M waveform, corresponding to the extracellular activity of the stylets, and it was not recorded for all trials. This waveform was irregular with up and down peaks and a low frequency of about 1.0 Hz. The females stayed at this level M for an average of 1.7 h, however, it was not possible to correlate this waveform to the stylets activities. The second pattern was called P, corresponding to the intracellular phase, showing two characteristic subpatterns: the first had high amplitude and was present on every replicate, whereas the other had low amplitude and may or may not occur and is always intercalated with the other one. Both had a frequency around 4.0 Hz, which origin is on the resistance. The insect stayed for 22.3 h, on average, on the pattern P, and excretion of honeydew was observed during this period, indicating a possible phloem feeding. These waveforms observed for *P. boernerii* are not similar to those recorded for aphids on the Aphididae family. Histological analysis of the plant tissues during each phase of the stylet position should be done to determine the meaning of each waveform with more accuracy.

1. INTRODUÇÃO

O pulgão-lanífero-do-pinus, *Pineus boernerii* Annand, 1928 (Hemiptera: Adelgidae), recentemente detectado no Brasil (Penteado *et al.* 2004), apesar de infestar mais de 40 espécies de *Pinus*, é capaz de atacar, de forma mais agressiva, determinadas espécies ou populações de plantas (Tantom & Alder 1977; McClure 1990; Simpson & Ades 1990; Zwolinski 1990). Assim, torna-se fundamental, para a ciência e para as decisões de manejo silvicultural, um conhecimento aprofundado das interações entre estes insetos com suas plantas hospedeiras.

O monitoramento eletrônico ou EPG (*Electrical Penetration Graph*) é uma tecnologia que possibilita a visualização dos eventos relacionados à movimentação dos estiletos dos insetos dentro dos hospedeiros, através de gráficos elétricos (Feres & Collar 2001). Dessa forma, a técnica pode esclarecer de que maneira plantas com diferentes mecanismos bioquímicos ou físicos de defesa afetam o comportamento alimentar dos insetos sugadores, e por fim, a sua capacidade biológica. Com base nesses modelos pode-se desenvolver variedades de plantas, portadoras de tais mecanismos de defesa, resistentes a espécies de pragas potencialmente prejudiciais para a silvicultura e agricultura e estudar a transmissão de vírus nas plantas.

O sistema de monitoramento eletrônico, também chamado de gráfico elétrico de penetração ou EPG, foi inicialmente desenvolvido por Mclean & Kinsey (1964), os quais construíram um aparelho capaz de medir as mudanças na resistência elétrica na planta e no inseto sugador de modo a estudar o comportamento alimentar dos afídeos durante o processo de penetração dos estiletos nas plantas. Este primeiro aparelho utilizava corrente alternada, sendo chamado de Sistema AC (Tjallingii 1978, 1988; Walker 2000). Posteriormente surgiu um monitor capaz de utilizar corrente direta, chamado Sistema DC, mais eficiente do que o anterior porque detalha as ondas de sinais, possibilitando uma medida mais precisa dos níveis de frequência e amplitude das ondas (Tjallingii 1985a, 1988; Annan *et al.* 1997).

O funcionamento do Sistema DC é relativamente simples: o aparelho de medida é composto por uma fonte de voltagem, ligada a um pino de saída e um resistor fixo, o qual não apresenta variação na resistência, e que fica ligado a um pino de entrada. Quando se liga um fio condutor aos dois pinos tem-se um circuito simples, com corrente elétrica passando pelo resistor (Walker 2000). Ao se ligar o fio de saída do aparelho a uma planta e o fio de entrada a um inseto sugador que esteja sobre ela, tem-se um circuito capaz de monitorar a atividade dos

estiletos do inseto nos tecidos da planta. O fio de aço de saída é ligado à planta através de um eletrodo e pode ser associado diretamente ao tecido vegetal ou então ser ligado ao solo em que ela se encontra. O fio de entrada, também associado a um eletrodo, é ligado ao inseto através de uma porção fina de ouro ou platina que é grudado no seu dorso através de uma cola adesiva condutiva. Quando o inseto insere os estiletos na planta o circuito primário ou circuito de medida é fechado e o conjunto planta-inseto atua no sistema como um resistor variável (McClean 1977; Walker 2000). O valor da resistência varia com as diferentes atividades de alimentação do inseto como, por exemplo, ingestão da seiva bruta, da seiva elaborada ou do conteúdo celular, ou ainda com os mecanismos de egestão de saliva geleificante e aquosa, com o batimento da bomba salivar, os quais geram padrões de ondas característicos para cada comportamento (Tjallingii 1988; Walker 2000).

Foram caracterizados padrões de ondas relacionados ao processo de alimentação dos Aphididae, os quais apresentam, basicamente, três fases diferentes: a penetração e o encaminhamento intercelular dos estiletos, caracterizado por ondas chamadas de A, B e C; a fase de floema, dividida em duas subfases, a E1, que corresponde à salivagem dentro dos tubos crivados e a E2 que consiste na ingestão da seiva e, finalmente, a fase de xilema chamada de fase G (Prado & Tjallingii 1994; Martín *et al.* 1997). Associadas à onda C podem ocorrer quedas de potencial chamadas de ondas pd (*potential drops*) e que consistem em penetrações breves dos estiletos em células parenquimáticas (Tjallingii 1985b; Prado & Tjallingii 1994; Martín *et al.* 1997).

Assim como os Aphididae, vários grupos de insetos sugadores tiveram seus padrões de alimentação definidos a partir do monitoramento eletrônico, como cochonilhas (Catalayud *et al.* 1994; Santa-Cecília 2003), trips (Harrewijn *et al.* 1996; Kindt *et al.* 2003), cicadélídeos (Lett *et al.* 2001, Almeida & Backus 2004; Joost *et al.* 2005) e mosca branca (Janssen *et al.* 1989; Lei *et al.* 1998, 1999; Jiang *et al.* 2001; Jiang & Walker 2001, 2003).

Entretanto, não há, na literatura, nenhuma informação sobre a aplicação da técnica de monitoramento eletrônico para Adelgidae. Estes insetos são diminutos e na maior parte de sua vida são sésseis, permanecendo com seus longos estiletos no interior do tecido da planta hospedeira, o que pode dificultar a sua manipulação para o monitoramento. Segundo Pollard (1973) a inserção dos estiletos, nos Adelgidae, pode ser para ancoragem, e não apenas para alimentação, sendo que as ninfas de 1^o ínstar de *Adelges piceae* (Ratzeburg, 1843) inserem seus estiletos na planta, ingerem saliva antes de entrar em diapausa (Balch 1952 *apud* Pollard 1973).

Estudos histológicos mostram que os Adelgidae podem se alimentar tanto em células parenquimáticas quanto em células do floema (Raske & Hodson 1964; Allen & Dimond 1968; Young *et al.* 1995) e apresentam predominantemente uma rota intercelular de seus estiletes até os sítios de alimentação (Allen & Dimond 1968; Pollard 1973; Young *et al.* 1995).

Allen & Dimond (1968) realizaram um estudo histológico de *Pinus strobus* L. atacado por *Pineus pinifoliae* Fitch 1858 e determinaram uma rota intercelular dos estiletes através do córtex da planta até células jovens do floema. Os autores encontraram uma deterioração gradual das células floemáticas causadas pelo processo de alimentação do pulgão.

A inserção dos estiletes de ninfas de *Adelges tsugae* Annand, 1924 em *Tsuga canadensis* (L.) Carr. foi predominantemente intracelular, com os estiletes perfurando células epidermais da planta (Young *et al.* 1995). O encaminhamento dos estiletes, até o ponto de alimentação foi intra e intercelular, com uma predominância pela rota intercelular. A maioria dos indivíduos se alimentou ou ingeriu água de células parenquimáticas do xilema. Raske & Hodson (1964) também encontraram inserção predominantemente intracelular dos estiletes de *Pineus strobi* Hartig 1837 em *P. strobus*, determinando que a alimentação da espécie se dá em células do floema.

A presente pesquisa teve por objetivo caracterizar o padrão de alimentação de *Pineus boernerii* em *Pinus taeda* L. usando o monitoramento eletrônico, gerando, assim informações para outros estudos envolvendo a relação inseto-planta.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Coleta e criação dos afídeos

Os insetos foram coletados em árvores infestadas de *Pinus* spp. (Pinaceae) no Centro Politécnico da Universidade Federal do Paraná, e em Campo do Tenente, PR, durante os anos de 2004 e 2005. Mudanças de 4 a 12 meses de *Pinus taeda* L e *Pinus elliottii* Engelmann, plantadas em tubetes e/ou garrafas de 1 L, foram infestadas com os ovos e ninfas de primeiro ínstar de modo a estabelecer a criação, que foi mantida em laboratório e em casa de vegetação para a obtenção dos insetos para os testes.

2.2. Avaliação do comportamento alimentar de *P. boernerii* em *P. taeda* pelo EPG

Para o experimento de comportamento alimentar de *P. boernerii*, foram utilizadas colônias de aproximadamente quatro meses de idade estabelecidas em mudas de *P. taeda* de 7 a 12 meses, plantadas em tubetes e garrafas de 1 L. Os insetos utilizados para o estabelecimento das colônias foram provenientes da criação-estoque estabelecida no Departamento de Zoologia da UFPR.

Os testes foram conduzidos no laboratório de Entomologia da EMBRAPA – Florestas, em Colombo, PR. O aparelho utilizado é o modelo GIGA – 4, com quatro canais de registro, de corrente direta, DC (Fig. 1A). O equipamento fica dentro de uma Gaiola de Faraday, que tem por objetivo isolar o ruído elétrico presente no ambiente; sua estrutura é construída com madeira recoberta com tela metálica por todos os lados (Fig. 1B).

Para o experimento, uma fêmea adulta era selecionada da colônia, sob estereomicroscópio, era limpa da sua lanugem, com um estilete fino, e as ninfas e adultas ao seu redor eram retiradas. Em seguida, uma gotícula de tintura de prata era depositada com um estilete sobre o dorso do inseto e um pedaço de fio de ouro, de aproximadamente 3 cm de comprimento, era colado ao dorso. A muda era levada para dentro da Gaiola de Faraday, e a outra ponta do fio de ouro era conectada a um fio de cobre ligado ao aparelho, utilizando-se tintura de prata.

Como as formas de *P. boernerii* são sésseis, os testes foram iniciados com os estiletos da fêmea adulta já inseridos na planta hospedeira, pois a sua retirada resultaria na morte do inseto.

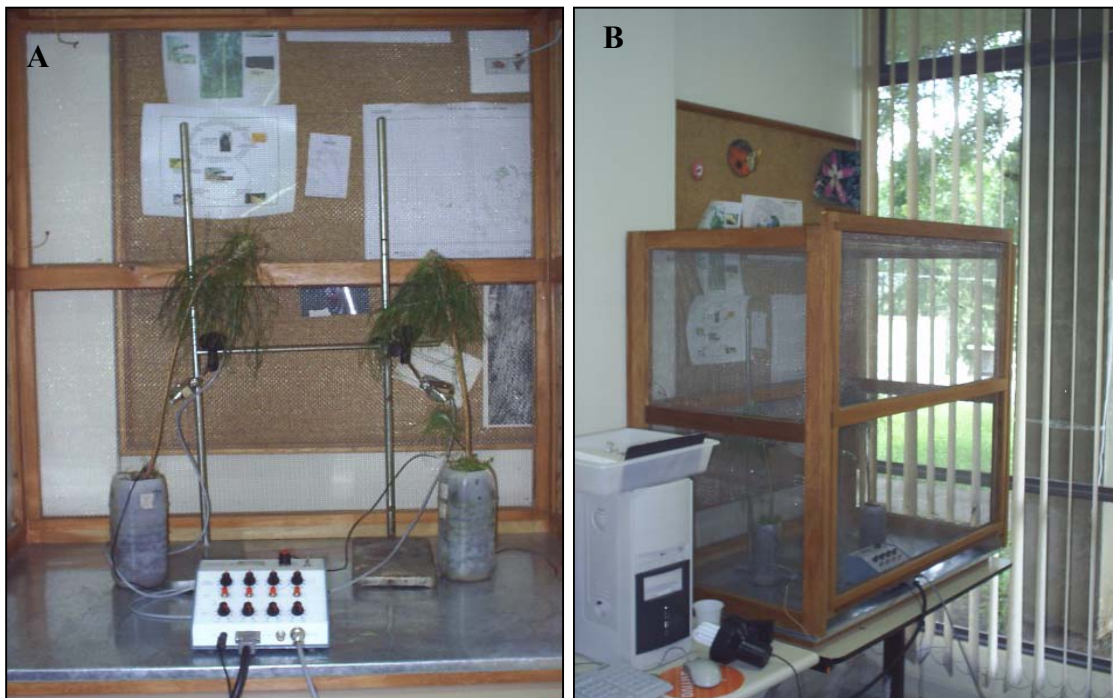


Fig. 1. A: Aparelho de monitoramento eletrônico (EPG), sistema DC, modelo GIGA – 4, mostrando dois canais de registro conectados em fêmeas adultas de *Pineus boernerii* sobre mudas de *Pinus taeda*; B: Gaiola de Faraday sobre o equipamento. EMBRAPA Florestas, Colombo, PR.

Os registros foram feitos por um período de 24 horas, para cada um dos 22 insetos testados, usando-se o programa de computador Probe 3.0 Acq 3.2. A análise dos gráficos produzidos foi feita através do programa Probe 3.0 Ana 3.2. As características das ondas utilizadas foram: amplitude, frequência, nível de voltagem e origem elétrica. A frequência foi determinada através da função “Auto Power Spectrum” (APS) que determina a contribuição das ondas em um determinado padrão.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram determinadas, nos 22 registros, duas formas diferentes de ondas relacionadas à atividade dos estiletes de *P. boernerii* nos tecidos de *P. taeda*: uma extracelular, a qual foi denominada de onda M e uma intracelular chamada onda P (Fig 2). Não foi possível determinar os processos de inserção e penetração dos estiletes, uma vez que, quando os registros se iniciaram os estiletes da fêmea já estavam inseridos nos tecidos da planta.

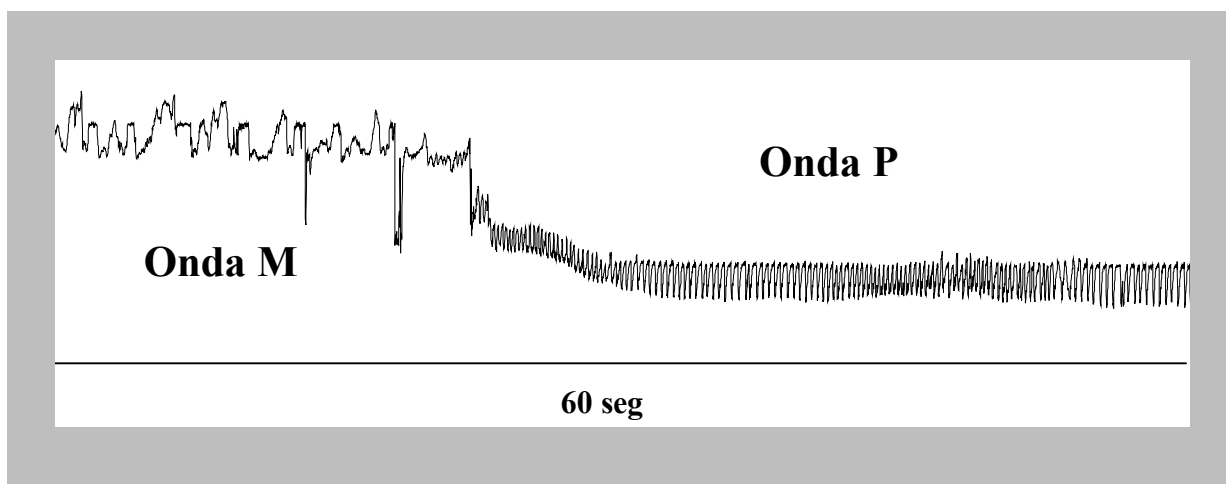


Fig. 2: Padrão geral da passagem da onda M (extracelular) para a onda P (intracelular) durante a alimentação de uma fêmea adulta de *Pineus boernerii* sobre *Pinus taeda*, analisado pelo sistema de monitoramento eletrônico (EPG), DC, modelo GIGA – 4.

O primeiro padrão de onda, denominado onda M, foi detectado em 45% dos registros, representando uma média de 1,7 h no registro total. Um único espécime apresentou um tempo total de permanência na onda M de 13,18 h. A onda M se caracteriza por apresentar nível extracelular, com formas variadas de subidas e descidas de nível (Figs. 3 e 4).

Houve uma grande variabilidade de formas ocorrendo em um mesmo registro. As frequências dos picos foram bastante baixas, com a de maior intensidade apresentando aproximadamente 1 Hz (Fig. 5, 6). Um estudo realizado com a mosca-branca *Bemisia argentifolii* Bellows e Perring, 1994 (Hemiptera: Aleyrodidae) mostra que, aparentemente, *P. boernerii* mostra certas semelhanças com os registros realizados para a espécie, como uma grande variedade de formas ocorrendo dentro de um mesmo padrão de ondas (Jiang & Walker 2003).

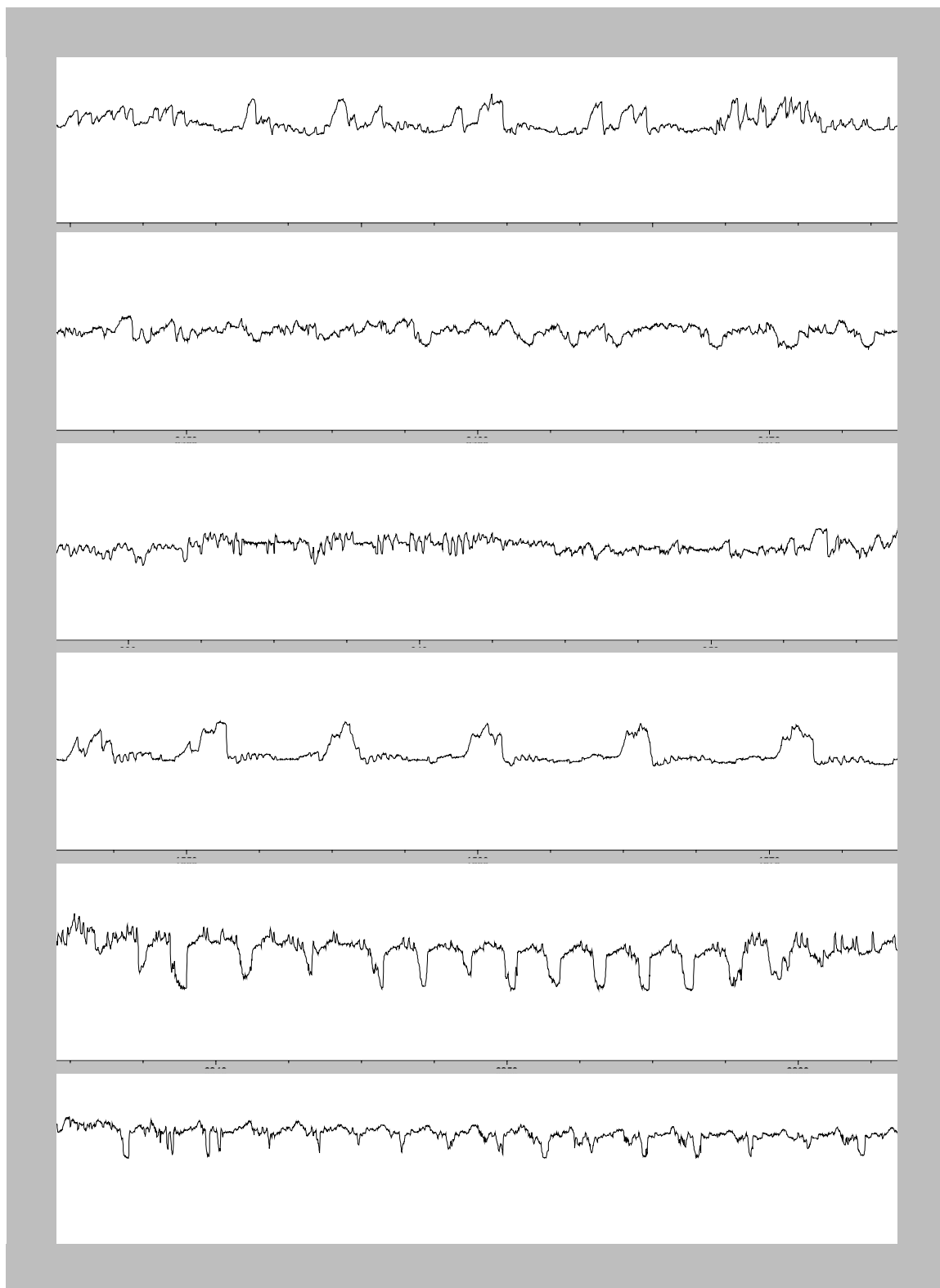


Fig. 3: Formas variadas de ondas para o padrão M apresentado por fêmeas adultas de *Pineus boernerii* sobre *Pinus taeda*, analisadas pelo sistema de monitoramento eletrônico (EPG), DC, modelo GIGA – 4, durante o período de 30 segundos.

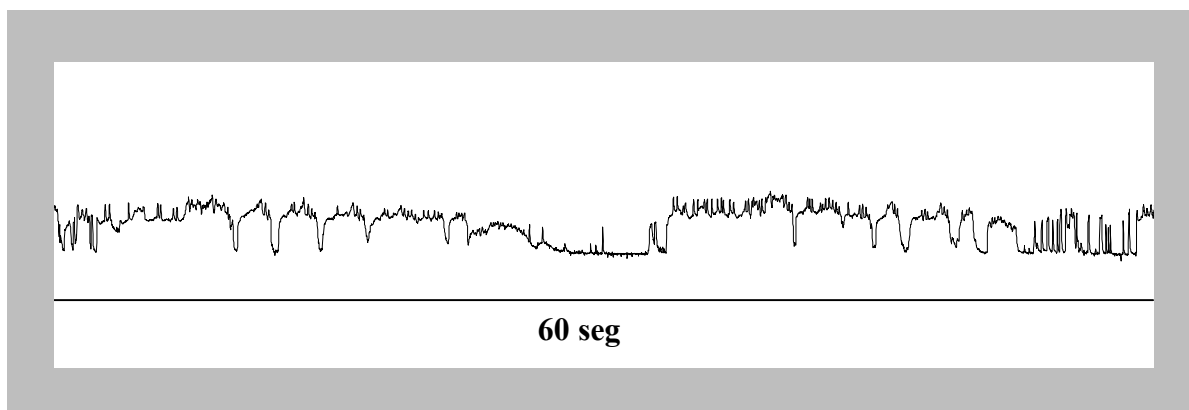


Fig. 4: Alternância de níveis durante o padrão M apresentado por fêmeas adultas de *Pineus boernerii* sobre *Pinus taeda*, analisada pelo sistema de monitoramento eletrônico (EPG), DC, modelo GIGA – 4.

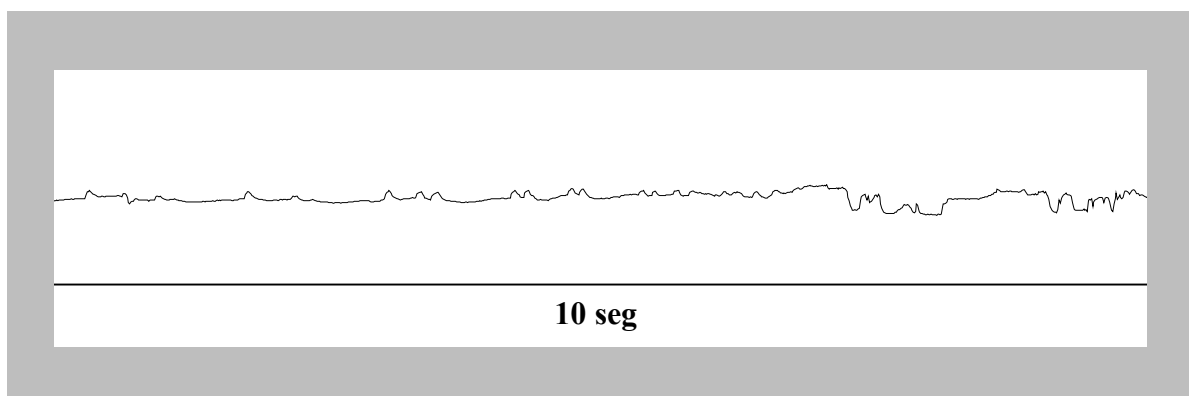


Fig. 5: Padrão da onda M apresentado por fêmeas adultas de *Pineus boernerii* sobre *Pinus taeda*, analisado pelo sistema de monitoramento eletrônico (EPG), DC, modelo GIGA – 4.

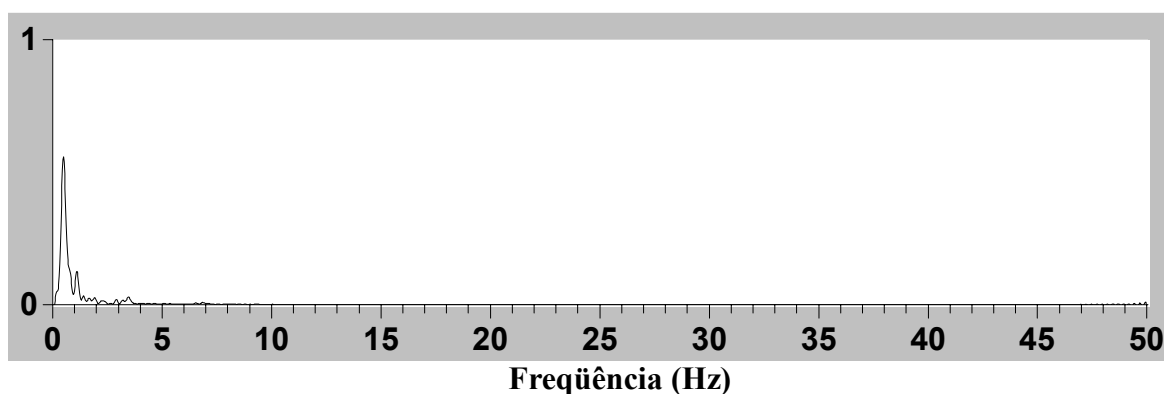


Fig. 6: Frequência principal observada para o padrão M em fêmeas adultas de *Pineus boernerii* sobre *Pinus taeda*, analisada pelo sistema de monitoramento eletrônico (EPG), DC, modelo GIGA – 4.

Não foi detectada a excreção de *honeydew* durante o período, o que evidencia que a onda M pode estar relacionada à movimentação dos estiletes fora de seu sítio de alimentação. Não foram registradas quedas de potencial (pd), características da onda C de outros afídeos, que representam penetrações curtas nas células. Assim como neste trabalho, Jiang & Walker (2003), trabalhando em condições semelhantes com ninfas de *B. argentifolii*, também não conseguiram relacionar quedas de nível ocorrendo na onda C com quedas de potencial características, evidenciando mais uma semelhança entre os padrões dos dois grupos de insetos. As formas adultas da mosca-branca *Trialeurodes vaporariorum* (Westwood 1856) (Hemiptera: Aleyrodidae) raramente apresentaram quedas de potencial (pd), mas mesmo quando registradas, não apresentaram padrões característicos como os afídeos (Janssen *et al.* 1989).

O encaminhamento dos estiletes dos Adelgidae dentro da planta é predominantemente intercelular (Pollard 1973), o que pode estar relacionado à onda M encontrada. Os Adelgidae adultos mantêm os estiletes permanentemente dentro da planta, provavelmente devido ao seu tamanho e à dificuldade para manipular a sua entrada e saída. Além disso, esses insetos podem utilizar os estiletes para ancoragem, e não apenas para a alimentação, conforme mencionado por Pollard (1973). A onda M poderia estar relacionada, ainda, a períodos de oviposição, conforme observado por Lei *et al.* (1999) para fêmeas de mosca-branca, cujo processo de oviposição resulta em um padrão característico de onda.

A onda P (Fig. 2) esteve presente em todos os registros feitos, variando de 20,15 h a 24 h de registro, com uma média de 22,25 h (n=22), porém um dos espécimes permaneceu na onda P por apenas 10,82 h. A onda ocorre em um nível intracelular, sendo que foi observada a excreção de *honeydew* durante o período, o que evidencia a presença dos estiletes em seu sítio de alimentação. Os Adelgidae se alimentam em células do floema e células parenquimáticas (Allen & Dimond 1968; Young *et al.* 1995), porém, a alimentação em células do xilema não pode ser descartada, uma vez que alguns afídeos (Pollard 1977) e cochonilhas (Santa – Cecília 2003), mesmo sendo insetos que se alimentam predominantemente em células floemáticas, podem passar longas horas no xilema, provavelmente ingerindo água.

A frequência média da onda P foi de aproximadamente 4 Hz (Fig. 7), e alguns registros apresentaram alternância entre dois níveis (Fig. 8), os quais não mostraram nenhum padrão definido de ocorrência.

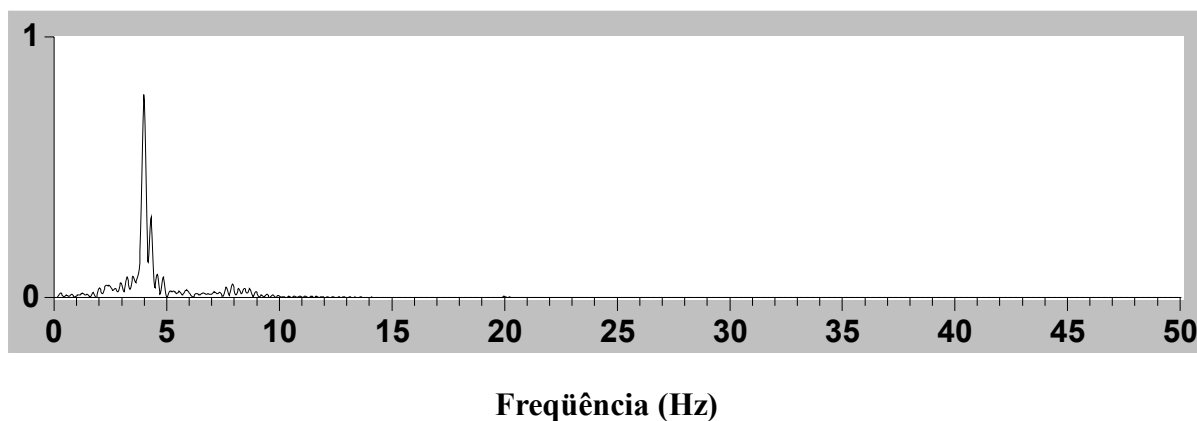


Fig. 7: Frequência principal observada para o padrão P em fêmeas adultas de *Pineus boernerii* sobre *Pinus taeda*, analisada pelo sistema de monitoramento eletrônico (EPG), DC, modelo GIGA – 4.

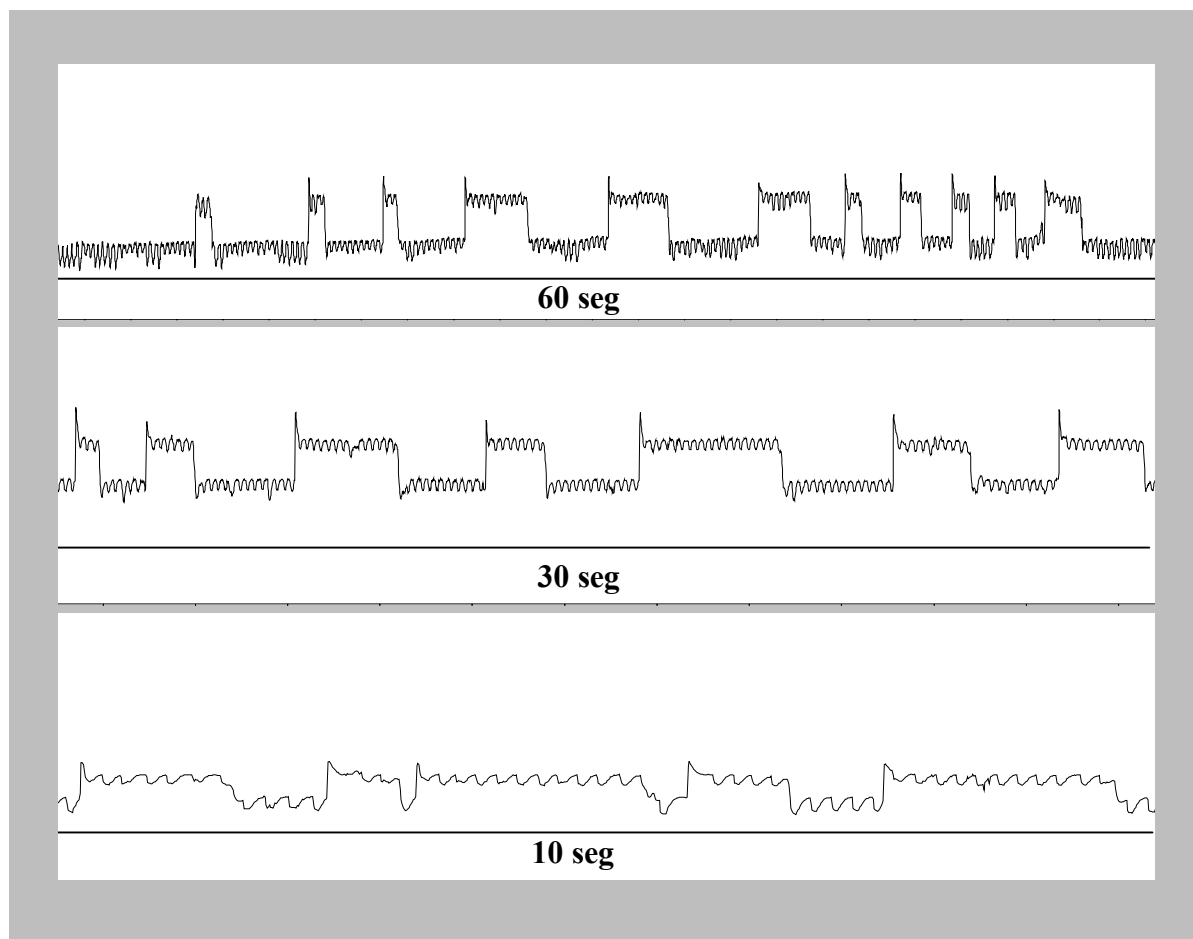


Fig. 8: Alternância de níveis durante o padrão P apresentado por fêmeas adultas de *Pineus boernerii* sobre *Pinus taeda*, analisada pelo sistema de monitoramento eletrônico (EPG), DC, modelo GIGA – 4.

Pode-se observar uma grande variedade de padrões ocorrendo na onda P (Fig. 11), porém, ao contrário do que ocorreu com a onda M, esses padrões variaram mais entre os registros do que para um mesmo espécime. Muitos registros apresentaram alternância variável entre dois subpadrões (Fig. 10), sendo o primeiro com uma alta amplitude (Fig. 9) e o segundo com uma baixa amplitude (Fig. 10). O primeiro subpadrão foi o predominante em todos os registros, e o subpadrão curto, quando esteve presente, foi sempre intercalado com o de alta amplitude. A direção dos picos foi predominantemente negativa, porém, pode-se observar também picos positivos e registros onde não se pode verificar a direção dos picos. Um dos registros apresentou picos negativos bastante semelhantes à onda E2 característica dos afideos (Fig. 11E).

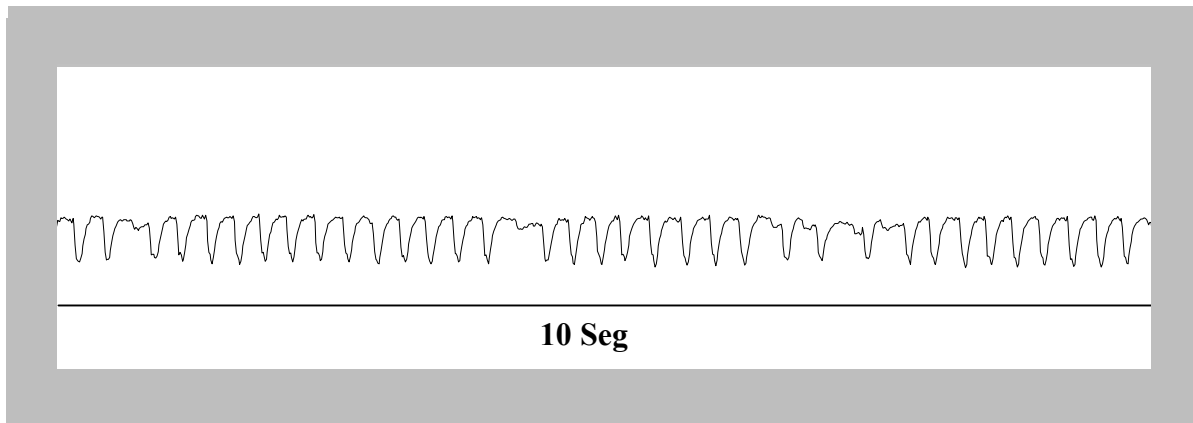


Fig. 9: Ondas de longa amplitude presente no padrão P de fêmeas adultas de *Pineus boernerii* sobre *Pinus taeda*, analisadas pelo sistema de monitoramento eletrônico (EPG), DC, modelo GIGA – 4.

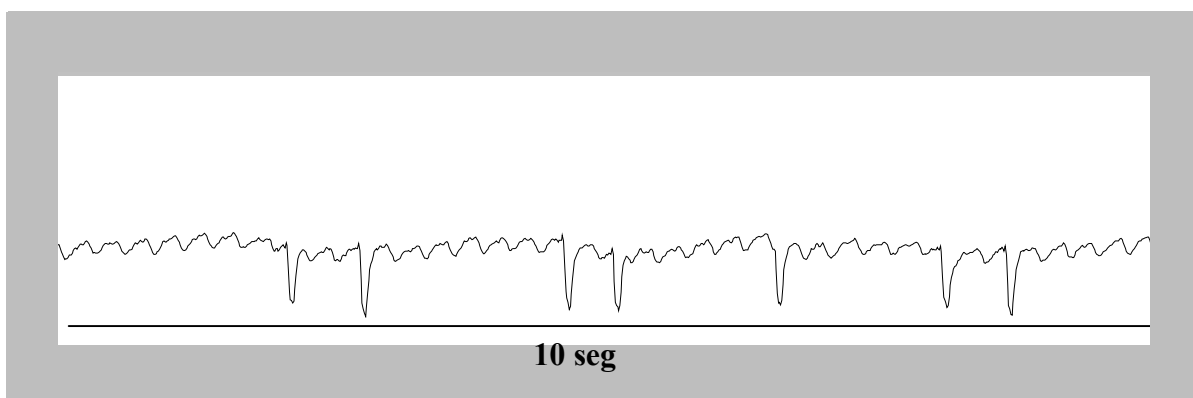


Fig. 10: Alternância de ondas de curta e longa amplitude presentes no padrão P de fêmeas adultas de *Pineus boernerii* sobre *Pinus taeda*, analisada pelo sistema de monitoramento eletrônico (EPG), DC, modelo GIGA – 4.

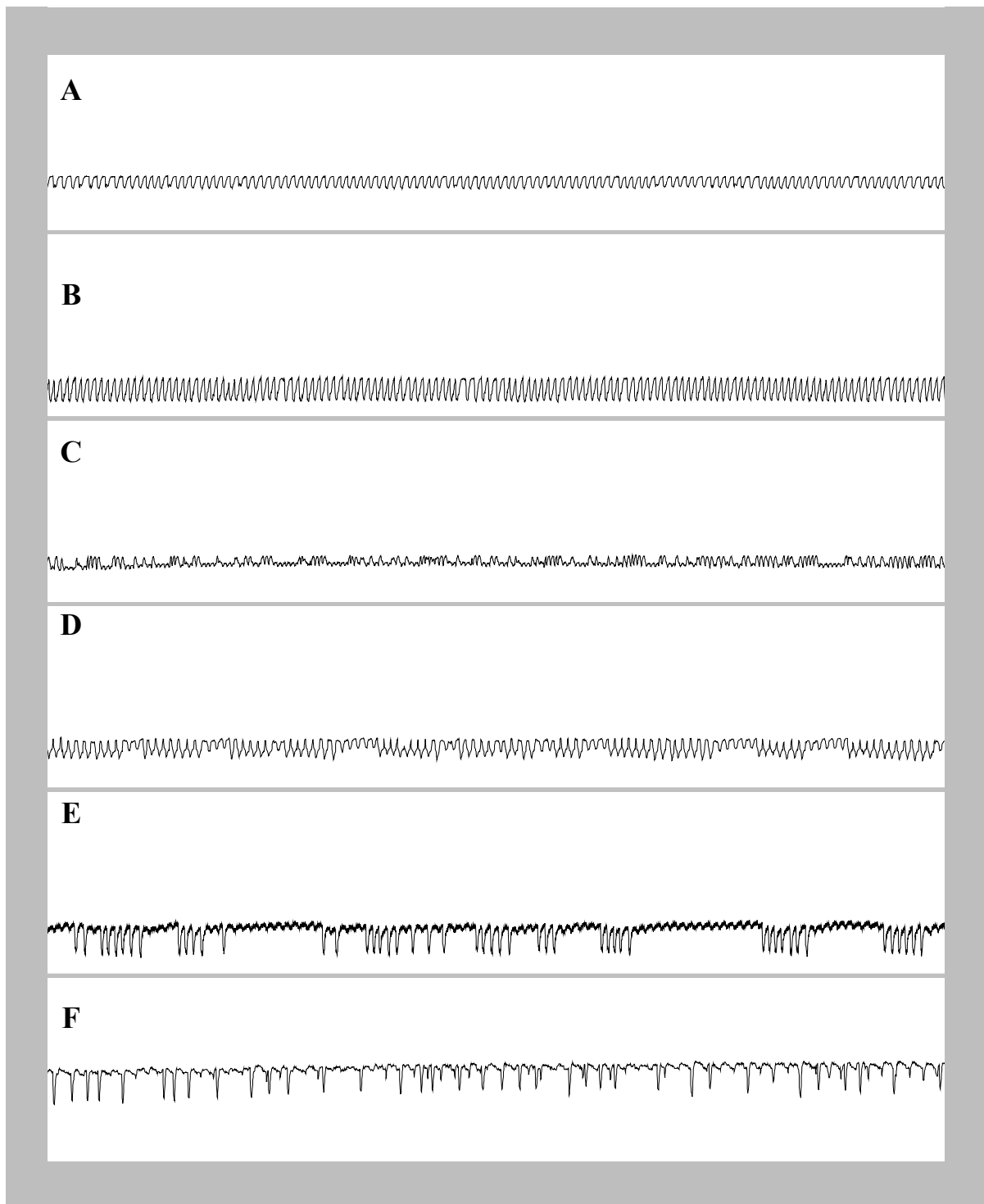


Fig. 11: Formas variadas de ondas para o padrão P, durante o período de 30 seg, apresentadas por fêmeas adultas de *Pineus boernerii* sobre *Pinus taeda*, analisadas pelo sistema de monitoramento eletrônico (EPG), DC, modelo GIGA – 4.

A onda P tem sua origem elétrica explicada pela flutuação da resistência (R) (Fig. 12), a qual pode estar relacionada a eventos como o abrir e fechar de válvulas presentes no canal alimentar ou salivar, ou a alterações dos eletrólitos no alimento ou na saliva, ou ainda, em função de algum outro evento que atue como um fator de mudança na condutibilidade elétrica (Tjallingii 1985a).

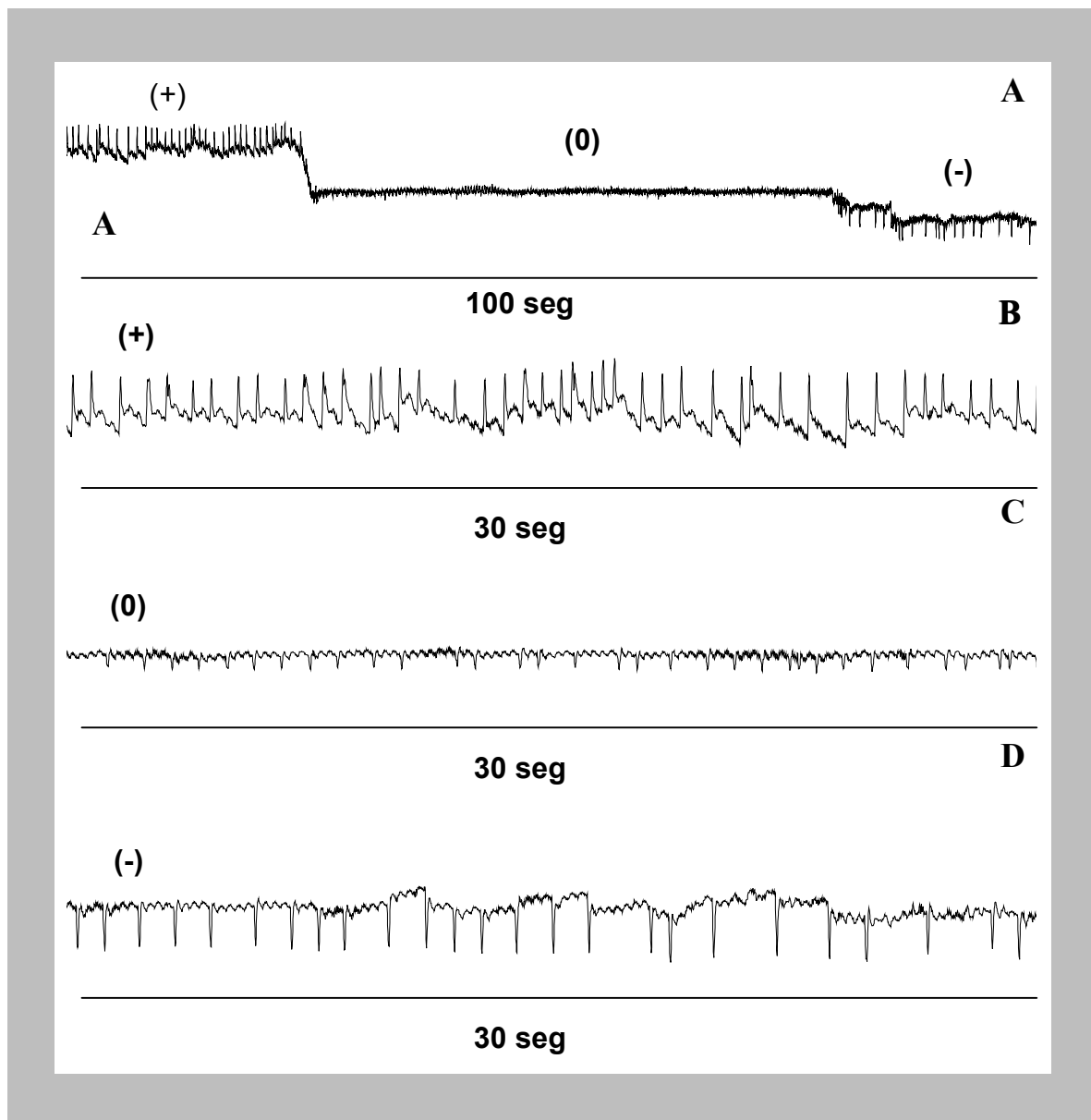


Fig. 12: Alteração dos picos do padrão P de fêmeas adultas de *Pineus boernerii* sobre *Pinus taeda*, analisadas pelo sistema de monitoramento eletrônico (EPG), DC, modelo GIGA – 4, de acordo com a alteração do ajuste de sinal, evidenciando a presença de resistência. A. Aspecto geral da mudança de sinais; B. Ajuste positivo; C. Ajuste em zero; D. Ajuste negativo.

Para uma interpretação mais precisa dos resultados, faz-se necessário complementar o estudo com a análise de cortes histológicos do tecido da planta durante a atividade, a fim de se correlacionar os padrões encontrados com a posição dos estiletes dentro dos tecidos. Não há registros na literatura de EPG para Adelgidae, e os padrões para *P. boernerii* mostram pouca semelhança com aqueles descritos para as espécies estudadas da família Aphididae. Apesar de haver semelhanças com padrões de ondas obtidos para mosca-branca, a análise e comparação com outras espécies são complicadas, pois os registros para *P. boernerii* foram feitos com os estiletes já inseridos na planta, devido ao seu comprimento e dificuldade na manipulação deste inseto.

Além dos cortes histológicos, uma avaliação química do *honeydew* excretado deve também ser realizada, uma vez que pode ajudar a estabelecer se a alimentação da espécie ocorre em células do floema ou não.

4. CONCLUSÕES

Os gráficos do monitoramento eletrônico mostram dois padrões de ondas bem definidos, um correspondendo ao trajeto extracelular (M) dos estiletes e o outro intracelular (P).

Há indícios de que o padrão P de ondas de *P. boernerii* esteja correlacionado com o processo de alimentação do afídeo no floema.

A função da onda M não está bem clara, podendo estar associada a uma série de processos fisiológicos e comportamentais.

Os resultados obtidos representam uma contribuição para fundamentar pesquisas futuras sobre o hábito alimentar dos Adelgidae e sua interação com suas plantas hospedeiras.

5. BIBLIOGRAFIA

- Allen, D. C. & J. B. Dimond. 1968. A histological study of white pine shoots attacked by the exsule stage of *Pineus pinifoliae*. **Annals of Entomological Society of America** **61**: 962 – 965.
- Almeida, R. & E. A. Backus. 2004. Stylet penetration behaviours of *Graphocephala atropunctata* (Say): EPG waveforms characterization and quantification. **Annals of the Entomological Society of America**, **97**: 838 – 851.
- Annan, I. B.; G. A. Schaefers; W. M. Tingey. & W. F. Tjallingii. 1997. Effects of treatments for electrical penetration graph recordings on behavior and biology of *Aphis craccivora* (Aphididae). **Physiological Entomology** **22**: 95-101.
- Catalayud, P. A.; Y. Rahbé; W. F. Tjallingii, M. Tertuliano & B. Le Ru. 1994. Electrically recorded feeding behaviour of cassava mealybug on host and non-host plants. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, **72**: 219 – 232.
- Fereres, A. & J.L. Collar. 2001. Analysis of noncirculative transmission by Electrical Penetration Graphs. *In*: **Virus – Insect – Plant Interactions**. Harris, K.F.; Smith, O.P. & Duffus, J.E., eds. London: Academic Press, p. 87-109.
- Harrewijn, P.; W. F. Tjallingii & C. Mollema. 1996. Electrical recording of plant penetration by western flower thrips. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, **79**: 345 – 353.
- Janssen, J. A.M.; W. F. Tjallingii & J. C. van Lenteren. 1989. Electrical recording and ultrastructure of stylet penetration by the greenhouse whitefly. **Entomologia Experimentalis et Applicata** **52**: 69 – 81.
- Jiang, Y. X. & G. P. Walker. 2001. Pathway phase waveform characteristics correlated with length and rate of stylet advancement and partial stylet withdrawal in AC electrical penetration graphs of adult whiteflies. **Entomologia Experimentalis et Applicata** **101**: 233 – 246.
- Jiang, Y. X. & G. P. Walker. 2003. Electrical penetration graphs of the nymphal stage of *Bemisia argentifolii*. **Entomologia Experimentalis et Applicata** **109**: 101 – 111.
- Jiang, Y. X.; G. Nombela & M. Muñiz. 2001. Analysis by DC-EPG of the resistance to *Bemisia tabaci* on *Mi*-tomato line. **Entomologia Experimentalis et Applicata** **99**: 295 – 302.

- Joost, P. H.; E. A. Backus; D. Morgan & F. Yan. 2006. Correlation of stylet activities by the glassy-winged sharpshooter, *Homalodisca coagulata* (Say), with the electrical penetration graph (EPG) waveforms. **Journal of Insect Physiology** **52**: 327 – 337.
- Kindt, F.; N. N. Joosten; D. Peters & W. F. Tjallingii. 2003. Characterisation of the feeding behaviour of western flower thrips in terms of electrical penetration graph (EPG) waveforms. **Journal of Insect Physiology** **49**: 183 – 191.
- Lei, H.; W. F. Tjallingii & J. C. van Lenteren. 1998. Probing and feeding characteristics of the greenhouse whitefly in association with host-plant acceptance and whitefly strains. **Entomologia Experimentalis et Applicata** **88**: 73 – 80.
- Lei, H.; J. C. van Lenteren & W. F. Tjallingii. 1999. Analysis of resistance in tomato and sweet pepper against the greenhouse whitefly using electrically monitored and visually observed probing and feeding behaviour. **Entomologia Experimentalis et Applicata** **92**: 299 – 309.
- Lett, J. M.; M. Granier; M. Grondin; P. Turpin; F. Molinaro; F. Chiroleu; M. Peterschmitt & B. Reynaud. 2001. Electrical penetration graph from *Cicadulina mbila* on maize, the fine structure of its stylet pathway and consequences for virus transmission efficiency. **Entomologia Experimentalis et Applicata** **101**: 93 – 109.
- Martin, B.; J. L. Collar; W. F. Tjallingii & A. Fereres. 1997. Intracellular ingestion and salivation by aphids may cause the acquisition and inoculation of non-persistently transmitted plant viruses. **Journal of General Virology** **78**: 2701-2705.
- Mclean, D. L. 1977. An electrical measurement system for studying aphid probing behavior. p. 277-290. In: Harris, K. F. & K. Maramorosch (eds.). **Aphids as virus vectors**. New York, Academic Press, 559 p.
- Mclean, D. L. & M. G. Kinsey. 1964. A technique for electronically recording aphid feeding and salivation. **Nature** **202**: 1358-1359.
- McClure, M. S. 1990. Cohabitation and host species effects on the population growth of *Matsucoccus resinosa* (Homoptera: Margarodidae) and *Pineus boernerii* (Homoptera: Adelgidae) on red pine. **Environmental Entomology** **19**: 672 – 676.
- Penteado, S. R. C., M. S. P. Leite, S. M. N. Lazzari, R. C. Zonta-de-Carvalho, W. Reis-Filho & E. T. Iede. 2004. Primeiro registro de *Pineus boernerii* Annand (Homoptera: Adelgidae) em *Pinus* spp. (Pinaceae) no Brasil. **Anais do XX Congresso Brasileiro de Entomologia**, Gramado, RS.
- Pollard, D. G. 1973. Plant penetration by feeding aphids (Homoptera: Aphidoidea): a review. **Bulletin of Entomological Research** **62**: 631-714.

- Prado, E. & W. F. Tjallingii 1994. Aphid activities during sieve element punctures. **Entomologia Experimentalis et Applicata** 72: 157-165.
- Raske, A. G. & A. C. Hodson. 1964. The development of *Pineus strobi* (Hartig) (Adelginae, Phylloxeridae) on white pine and black spruce. **The Canadian Entomologist** 96: 599 – 616.
- Santa-Cecília, L. V. C. 2003. **Interação cochonilha (Pseudococcidae) – planta avaliada mediante estudos biológicos e da técnica de “Electrical Penetration Graphs” (EPG)**. Tese de Doutorado, Lavras: UFLA. 84 p.
- Simpson, J. A. & P. K. Ades. 1990. Variation in susceptibility of *Pinus muricata* and *Pinus radiata* to two species of Aphidoidea. **Silvae Genetica** 39:5 – 6.
- Tanton, M. T. & D. Alder. 1977. The distribution and possible effects of the woolly aphid *Pineus* (Homoptera: Adelgidae) on *Pinus radiata* D. Don growing in the Australian capital territory. **Australian Forest Research** 7: 253 – 263.
- Tjallingii, W. F. 1978. Electrical nature of recorded signals during stylet penetration by aphids. **Entomologia Experimentalis et Applicata** 24: 521–530.
- Tjallingii, W. F. 1985a. Electronic recording of penetration behaviour by aphids. **Entomologia xperimentalis et Applicata**: 38, 187-193,
- Tjallingii, W. F. 1985b. Membrane potentials as an indication for plant cell penetration by stylet aphids. **Entomologia Experimentalis et Applicata**: 38, 187-193.
- Tjallingii, W. F. 1988. Electrical recording of stylet penetration activities, p. 95-108. *In* Minks, A K. & P. Harrewijn (eds.). **World crop pests: Aphids, their biology, natural enemies and control**. Amsterdam, Elsevier, V. 2B, 382 p.
- Walker, G. P. 2000. A beginner's guide to electronic monitoring of homopteran probing behavior. p. 14-40. *In* Walker G. P., E. A. Backus (ed). **Principles and applications of electronic monitoring and other techniques in the study of homopteran feeding behavior**. Lanham: Thomas Say Publications in Entomology, Entomological Society of America, 340 p.
- Young, R. F.; K. S. Shields & G. P. Berlyn. 1995. Hemlock woolly adelgid (Homoptera: Adelgidae): stylet bundle insertion and feeding insertion and feeding sites. **Annals of Entomological Society of America** 88: 827 – 835.
- Zwolinski, J. B. 1990. Preliminary evaluation of the impact of the pine woolly aphid on condition and growth of pines in the Southern Cape. **South African Forestry Journal** 153: 22 – 26.

Capítulo V

**Distribuição geográfica de *Pineus boernerii* Annand, 1928
(Hemiptera: Adelgidae) e análise da variabilidade genética de
populações**

Distribuição geográfica de *Pineus boernerii* Annand, 1928 (Hemiptera: Adelgidae) e análise da variabilidade genética de populações

RESUMO

O pulgão-lanífero-do-pinus, *Pineus boernerii* Annand, 1928 (Hemiptera: Adelgidae), espécie recentemente detectada nos estados do sul e sudeste do Brasil, foi introduzido em várias partes do mundo, dispersando-se rapidamente em áreas de plantio de *Pinus*. Esta pesquisa teve por objetivo avaliar a distribuição geográfica da espécie no Brasil bem como a variabilidade genética de populações. O levantamento foi efetuado nos estados de Santa Catarina (SC), Paraná (PR) e São Paulo (SP), sendo que 19 amostras de populações foram submetidas à análise com marcadores moleculares RAPD. Em SC, *P. boernerii* foi detectada em 18 localidades correspondentes a quatro regiões bioclimáticas, das quais 16 foram registros novos da espécie. *P. boernerii* foi detectado nas duas áreas de plantio comercial de *Pinus* de maior importância econômica no estado, o Planalto Catarinense e a região litorânea. Das sete regiões bioclimáticas do PR, cinco foram investigadas quanto à presença de *P. boernerii*, sendo que em todas o inseto foi coletado, inclusive nas duas regiões no centro-sul do estado onde estão as maiores plantações comerciais de *Pinus*. Das 18 localidades amostradas no estado do PR, 14 representam registros novos. Em SP, 14 das 15 localidades amostradas são novos registros de *P. boernerii* no estado, sendo registradas em três das cinco regiões bioclimáticas que compõem o estado, especialmente no centro-sul. Os três iniciadores RAPD (OPM-06, OPX-11 e OPY-10) testados para o estudo da variabilidade genética das populações não diagnosticaram bandas polimórficas nas amostras analisadas. Porém, o fato de a variabilidade da espécie não ter sido detectada neste trabalho, não significa que não haja variabilidade, sendo necessário um número maior de iniciadores e de amostras para se detectar polimorfismos em um inseto com reprodução partenogenética e de introdução recente. Com este estudo comprova-se que *P. boernerii* encontra-se amplamente distribuído e adaptado às diversas regiões bioclimáticas do PR, SC e SP.

Geographic distribution of *Pineus boernerii* Annand, 1928 (Hemiptera: Adelgidae) and analysis of the genetic variability of some populations

ABSTRACT

The pine woolly aphid, *Pineus boernerii* Annand, 1928 (Hemiptera: Adelgidae), recently detected in the south and southeast of Brazil, has been introduced in many areas of the world and has spreaded rapidly on forestry areas. The objective this research was to evaluate the geographic distribution of *P. boernerii* in the major production areas of *Pinus* in Brazil and to study the genetic variability of the populations. The survey was done in the states of Santa Catarina (SC), Paraná (PR) and São Paulo (SP), and 19 of these populations were analyzed using RAPD molecular markers. In SC, *P. boernerii* was recorded in 18 places corresponding to four bioclimatic regions, 16 of them representing new records of the species distribution. *P. boernerii* was detected in the two major commercial areas of *Pinus* in SC, in the Planalto Catarinense and the coastal area. From the seven bioclimatic regions in PR, five were investigated and in all of them *P. boernerii* was present, including the two major *Pinus* areas in the central-southern part of the state. From the 18 surveyed areas in PR, 14 represent new records. In SP, in 14 out of 15 areas, *P. boernerii* was collected for the first time, and it occurred in three of the five bioclimatic regions, especially in the most important commercial areas in the central-south. The three RAPD primers (OPM-06, OPX-11 e OPY-10) tested to detect genetic variability among the *P. boernerii* populations, neither one revealed polymorphic bands in the samples analyzed. However, it does not mean that there was no variability at all, but that a larger number of primers and samples should be analyzed to detect polymorphism in a parthenogenetic and newly introduced species. This study showed that *P. boernerii* is largely distributed and adapted to several different bioclimatic regions in PR, SC and SP.

1. INTRODUÇÃO

A introdução de espécies exóticas de insetos, sem seu complexo de inimigos naturais, em ambientes que ofereçam plantas potencialmente suscetíveis e baixa resistência ambiental pode fazer com que elas venham a se dispersar rapidamente e se tornarem sérias pragas agrícolas ou florestais. *Pineus boernerii* Annand, 1928 (Hemiptera: Adelgidae) é uma espécie recém-introduzida no Brasil (Penteado *et al.* 2004), sendo que, na sua região de origem, possivelmente na parte leste da Ásia, onde mantém baixas populações em *Pinus thunbergiana* Franco, não causa nenhum dano econômico (McClure 1990). Contudo, em várias partes do mundo onde a espécie foi introduzida, como os Estados Unidos, a África e a Austrália, *P. boernerii* tem causado danos a diversas espécies de *Pinus*. Os danos vão desde descoloração, distorção e morte dos galhos, queda das acículas, retardo no crescimento, perda da dominância apical até morte da planta, dependendo do grau de infestação e das condições da árvore (Tantom & Alder 1977; Mailu *et al.* 1980; McClure 1982, 1984, 1989a, 1989b; Chilima & Leather 2001).

Não são conhecidas as formas aladas de *P. boernerii*, sendo que a dispersão ocorre naturalmente através dos ovos e das ninfas de 1^o instar com correntes de vento. As formas podem ser carregadas, ainda de um local a outro com mudas e galhos de *Pinus* infestadas, ou ainda no corpo de animais. No nordeste dos Estados Unidos, desde que *P. boernerii* foi detectada como praga, em 1979, dispersou-se rapidamente e matou centenas de plantações de *Pinus resinosa* Aiton (McClure 1989b, 1990). A rápida dispersão da espécie pelo país pode ter acontecido devido à ocorrência de várias gerações em um ano, permitindo que as diversas correntes anuais de vento fossem melhor aproveitadas. *P. boernerii* foi detectado na Rodésia e no Quênia em 1968, provavelmente introduzido através de mudas de *Pinus taeda* L. proveniente da Austrália, e na África do Sul em 1978 (Barnes *et al.* 1976; Mills 1990). Estudos feitos na Malásia e no Quênia mostram que a espécie é responsável pela perda de crescimento anual de 2 a 5% por ano em árvores jovens de *Pinus*, sendo que as árvores mais suscetíveis são as que crescem em condições de estresse (Mailu *et al.* 1979). Barnes *et al.* (1976) discutem que a dispersão inicial da espécie na Rodésia pode ter ocorrido através de trabalhadores de pomares e sementeiras, os quais poderiam carregar os ovos e as ninfas de 1^o instar nas roupas, com mudas, de uma região a outra.

A capacidade de infestação e de adaptação dos afídeos ao ambiente está diretamente relacionada à sua capacidade genética. Segundo Dixon (1985), os afídeos que se reproduzem

partenogeneticamente têm mostrado uma grande habilidade para se adaptar a uma grande diversidade de condições ambientais e plantas hospedeiras, uma vez que as mudanças genéticas que ocorrem na população, são rapidamente transmitidas pela reprodução partenogenética.

Segundo McClure (1999) populações de *Adelges tsuga* Annand, 1928, que é uma espécie de Adelgidae de origem japonesa, apresentam baixa resistência a períodos frios nos Estados Unidos, quando comparadas às populações japonesas, porém, Parker *et al.* (2002) demonstraram que populações de diferentes localidades dos Estados Unidos são afetadas diferentemente por temperaturas baixas. Além disso, a população de uma mesma localidade pode apresentar diferentes níveis de resistência, dependendo da época do ano, demonstrando que pode estar havendo uma adaptação dessas populações ao clima norte-americano.

A análise da variabilidade molecular pode ser útil para resolver problemas taxonômicos, determinar ciclos de vida, diferenciar espécies ou populações relacionadas, encontrar variação dentro de diferentes biótipos, populações ou mesmo em linhagens partenogenéticas, determinar a abundância de espécies semelhantes em um hospedeiro, detectar e confirmar variações em afídeos que apresentam diferentes colorações e morfologia e determinar mudanças sazonais na ocorrência de diferentes genótipos. Tais informações podem ser extremamente úteis para se entender o estabelecimento de espécies exóticas e para o estabelecimento de programas de controle de espécies-praga (Loxdale & Brooks 1990; Black IV *et al.* 1992; Haymer 1994; Stern *et al.* 1997; Loxdale & Lushai 1998; Lushai *et al.* 1998; Figueroa *et al.* 1999; Lushai & Loxdale 2002; Timm *et al.* 2005).

Dentre os marcadores moleculares mais utilizados a fim de se detectar polimorfismo molecular tem-se o PCR/RAPD (“Polymerase Chain Reaction/Random Amplified Polimorphic DNA”), o qual, através da ampliação exponencial de fragmentos de DNA delimitados por iniciadores, (oligonucleotídeos de cerca de 10 pares de bases) permite visualizar, ao acaso, seqüências polimórficas do genoma (Haymer 1994; Ferreira & Grattapaglia 1998; Loxdale & Lushai 1998). Esta técnica tem sido amplamente utilizada para detectar variabilidade em populações de afídeos (Black IV *et al.* 1992; Sunnucks *et al.* 1997; Nicol *et al.* 1997a, 1997b, 1998; Margaritopoulos *et al.* 1998; Vanlerberghe-Masutti & Chavigny 1998; Figueroa *et al.* 1999; Bournoville *et al.* 2000; Clements *et al.* 2000, Downie 2000; Sigurdsson *et al.* 2000; Zitoudi *et al.* 2001; Carvalho 2004). Os marcadores RAPD apresentam a vantagem de amostrar muitas áreas do DNA dos insetos, sem que para isso, se conheça as seqüências desse genoma (Haymer 1994; Wilson *et al.* 2003).

Os afídeos, de maneira geral, apresentam uma baixa taxa de polimorfismo genético, quando comparados a outros grupos de insetos (Dixon 1985), principalmente quando se reproduz apenas partenogeneticamente (Martínez-Torres *et al.* 1997). Nas populações assexuadas a variabilidade genética ocorre através de mutações, erros de replicação, inserções e deleções de segmentos de DNA, levando as populações a apresentarem várias gerações geneticamente homogêneas (Dixon 1985; Lushai & Loxdale 2002). O destino de uma variante genética é influenciada por fatores como a migração, a biologia, o sucesso reprodutivo e o tamanho da população (Sunnucks 2000), e pode permanecer na população ou então ser perdida devido a eventos frequentes de colonização e extinção (Martínez-Torres *et al.* 1997; Havill *et al.* 2006).

O número de introduções em um determinado local e o fluxo gênico também podem determinar o quão variável pode ser o genótipo de uma população (Nicol *et al.* 1997b). Introduções únicas dependem exclusivamente dos eventos de mutações, erros de replicação, inserções e deleções de segmentos de DNA para que a variabilidade ocorra, o que pode necessitar de um longo período de tempo, enquanto introduções múltiplas do inseto podem garantir uma grande quantidade de genótipos sendo introduzidos nas populações (Martínez-Torres *et al.* 1997; Nicol *et al.* 1997b, ; Lushai & Loxdale 2002, Havill *et al.* 2006)

A diversidade genética de populações holocíclicas, anolocíclicas e androcíclicas de *Myzus persicae* (Sulzer,1776) na Grécia mostram um maior índice de polimorfismo para a primeira categoria, em relação às outras duas, detectado através de RAPD. Os autores discutem, no entanto, que a heterozigose pode ser mascarada, uma vez que não pode ser determinada por esta técnica (Zitoudi *et al.* 2001).

Timm *et al.* (2005) estabeleceram uma taxa de polimorfismo de 30,8% para *Eriosoma lanigerum* (Hausmann, 1802) entre quatro localidades da África do Sul utilizando AFLP. Os autores diagnosticaram uma baixa diversidade genética, o que atribuíram à reprodução partenogenética da espécie e também à sua disseminação no país, a qual pode ter ocorrido a partir de mudas de macieiras provenientes da mesma localidade.

Havill *et al.* (2006) determinaram a presença de cinco haplótipos diferentes para *A. tsuga* nos Estados Unidos, China e Japão. As populações deste inseto no leste americano, no entanto, apresentaram apenas um desses haplótipos, evidenciando a ocorrência provável de uma única introdução na região, ou ainda, de uma seleção clonal após essa introdução.

Martínez-Torres *et al.* (1997) avaliaram, através de RAPD, a diversidade genética para populações de três espécies de afídeos: *Rhopalosiphum padi* (L., 1758) proveniente da França, Espanha e Estados Unidos, *Aphis gossypii* Glover, 1887 e *M. persicae* provenientes de várias

localidades da Espanha. Os autores determinaram uma baixa diversidade genética para as três espécies de afídeos, que pode estar relacionada a eventos frequentes de colonização e extinção das populações, ou ainda à ação de inseticidas os quais causariam a perda da variabilidade presente em uma área.

Duas espécies de afídeos introduzidos na Austrália exibem diferentes tipos de comportamento, apesar de ambas se reproduzirem apenas partenogeneticamente no país: *Elatobium abietinum* (Walker, 1849) foi detectada inicialmente na década de 1920 e apresenta, atualmente, uma baixa diversidade genética. Já a espécie *Metopolophium dirhodum* (Walker, 1849), foi introduzida na década de 1980 e, apesar de mais recente apresenta uma maior taxa de variabilidade (Nicol *et al.* 1997b). A provável causa seria que *E. abietinum* tenha tido um pequeno número de introduções, ao contrário do que ocorreu com a segunda espécie. Além disso, *M. dirhodum* apresenta uma grande diversidade de plantas hospedeiras, o que permite que o fluxo gênico seja alto (Nicol *et al.* 1997b). Na Islândia, *E. abietinum* foi introduzida na década de 1950 e apresentou, pelo estudo de RAPD, duas populações distintas, as quais podem ser explicadas como tendo sido introduzidas em tempos diferentes. Uma das populações apresenta um alto índice de polimorfismo, enquanto a outra sofre uma alta pressão ambiental e apresenta um grau menor de variabilidade (Sigurdsson *et al.* 1999).

Devido ao recente estabelecimento de *P. boernerii* no Brasil, sua capacidade de se dispersar rapidamente e à ausência de conhecimento de sua diversidade genética, o objetivo deste capítulo foi avaliar a distribuição da espécie no Brasil bem como a variabilidade genética de populações de diferentes regiões geográficas.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Distribuição e amostragem de *P. boernerii*

O levantamento e coleta de *P. boernerii* foram realizados nos anos de 2005 e 2006, em várias cidades dos Estados de Santa Catarina, Paraná e São Paulo, de acordo com as regiões bioclimáticas, para avaliar a distribuição da espécie e para o estudo das populações mediante análise molecular. Galhos contendo populações de *P. boernerii* de uma ou mais árvores próximas entre si foram cortados e acondicionados em sacos plásticos e levados para laboratório. No laboratório esse material foi triado e as fêmeas adultas acondicionadas em tubos criogênicos de 1,5 ml contendo etanol absoluto Merck® e armazenadas a -18°C .

Para a análise molecular foram selecionadas 19 populações provenientes do Paraná e de Santa Catarina (Tabela 1).

2.2. Extração do DNA

Os testes moleculares foram realizados no Laboratório de Biologia Molecular do Departamento de Zoologia da Universidade Federal do Paraná, Curitiba, PR.

Para a extração do DNA utilizou-se o protocolo de Cheung *et al.* (1993), com modificações de Carvalho & Vieira (2000, 2001). As fêmeas de cada população foram individualizadas, secas à temperatura ambiente e trituradas manualmente com pistilo de polipropileno autoclavado, em tubo de microcentrífuga, de 1,5 ml contendo 200 μl do tampão de extração (200 mM de tris-HCl, pH 8,0; 2 M NaCl e 70 mM EDTA). Após a trituração adicionou-se 50 μl de sarcosyl 5% e as amostras foram incubadas a 60°C por 1 hora. As amostras foram, então, centrifugadas a 10000 rpm durante 15 minutos. Devido ao tamanho diminuto dos insetos e a pequena quantidade de DNA, não houve a transferência do sobrenadante de um tubo para outro, como proposto pelo protocolo. Para a precipitação do DNA, adicionou-se 110 μl de 10 mM de acetato de amônio e 250 μl de isopropanol gelados, em seguida, as amostras permaneceram durante a noite em geladeira a 4°C . No dia seguinte, as amostras foram novamente centrifugadas a 10000 rpm por 15 minutos, para recuperação do material precipitado, e o sobrenadante cuidadosamente descartado. O precipitado resultante foi lavado duas vezes com etanol a 70%, seco à temperatura ambiente ou em estufa e ressuspendido em 25 μl de tampão TE (10 mM Tris e 1 mM EDTA, pH 8,0) com 10 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ de

RNase. Para que a ressuspensão ocorresse de forma satisfatória, as amostras foram mantidas durante mais uma noite em geladeira, a 4°C, antes de serem armazenadas a -20°C.

Tabela 1. Localidades de coleta de populações de *Pineus boernerii* utilizadas nas análises de marcadores RAPD para detecção de variabilidade genética.

Localidade (UF)	Cód.	Latitude	Longitude	Data de coleta	Nº de indivíduos
Balsa Nova (PR)	BN	25° 28' 18''	49° 42' 53''	31/12/05	34
Ponta Grossa (PR)	PG	25° 05' 42''	50° 09' 43''	19/02/06	18
Jaguariaíva (PR)	JG	24° 15' 04''	49° 42' 21''	18/02/06	17
Arapoti (PR)	AR	24° 09' 28''	49° 49' 36''	18/02/06	18
União da Vitória (PR)	UV	26° 13' 48''	51° 05' 11''	22/01/06	15
Rebouças (PR)	RB	25° 37' 14''	50° 41' 34''	22/01/06	3
Jandaia do Sul (PR)	JS	23° 36' 11''	51° 38' 36''	16/02/06	12
Bandeirantes (PR)	BD	23° 06' 36''	50° 22' 03''	16/02/06	10
Adrianópolis (PR)	AD	24° 39' 26''	48° 59' 28''	30/07/06	18
Palmas (PR)	PL	26° 29' 03''	51° 59' 26''	22/01/06	18
Peritiba (SC)	PB	27° 22' 23''	51° 54' 14''	20/01/06	13
São Miguel do Oeste (SC)	SM	26° 43' 31''	53° 31' 05''	21/01/06	15
Três Barras (SC)	TB	26° 06' 23''	50° 19' 20''	03/06/06	18
Brusque (SC)	BR	27° 05' 53''	48° 55' 03''	17/12/05	18
Dionísio Cerqueira (SC)	DC	26° 15' 18''	53° 38' 23''	21/01/06	16
Rio do Sul (SC)	RS	27° 12' 51''	49° 38' 35''	18/09/06	18
Treze Tílias (SC)	TT	27° 00' 06''	51° 24' 23''	19/01/06	18
Caçador (SC)	CÇ	26° 46' 31''	51° 00' 54''	19/01/06	18
Santa Cecília (SC)	SC	26° 57' 39''	50° 25' 37''	18/01/06	10

2.3. Iniciadores utilizados e amplificação do DNA

Para as análises de RAPD foram testados 36 iniciadores quanto à amplificação de fragmentos de DNA de *P. boernerii* (Operon Technologies® e Sinapse Biotecnologia) selecionados ao acaso, correspondendo às séries A (OPA-1, OPA- 3, OPA-5, OPA-6, OPA-7, OPA-10, OPA-12, OPA-13, OPA-14, OPA-15, OPA-16, OPA-17, OPA-18 e OPA-20), B (OPB-1, OPB-10, OPB-12, OPB-13, OPB-17, OPB-18 e OPB-19), C (OPC-5, OPC-16, OPC19 E OPC-20), G (OPG-3), M (OPM-6), X (OPX-3, OPX-6, OPX-11 e OPX-12) e Y (OPY -1, OPY-3, OPY-7, OPY-10 e OPY-18).

As reações de amplificação foram realizadas em um volume total de 25 µL em tubos de microcentrífuga de 1,5 ml. As concentrações finais para cada reação foram: 50 mM KCl, 20 mM Tris-HCl (pH 9,0), 3 mM MgCl₂, 0,4 mM de dNTP; 0,2 µM de iniciador, 1U de Taq polimerase (Invitrogen™) e água q.s.p.. A quantidade de DNA utilizada foi de 1µl para cada reação.

O seguinte programa de amplificação foi utilizado: desnaturação inicial a 94°C por 3 minutos, 41 ciclos de desnaturação a 94°C por 1 minuto, anelamento a 35°C por 1 minuto, extensão a 72°C por 2 minutos, e extensão final a 72°C por 4 minutos. Os produtos das amplificações foram submetidos à eletroforese (100 V) por um período de 3 horas em gel de agarose em 1,5%, os quais correram junto com um marcador molecular de 100 pb (Ladder 100 pb - Invitrogen™). O tampão de corrida utilizado foi TBE 1X (Tris-Borato-EDTA). Após a corrida, os géis foram corados com brometo de etídio a 10 mg/ml, e em seguida fotografados sob luz UVP utilizando o sistema Multi Doc-IT Digital Imaging System. Os géis obtidos foram analisados e tiveram o peso molecular das bandas calculados através do programa Launch Doc IT'LS Image Analises.

3. RESULTADOS

3.1. Distribuição geográfica de *Pineus boernerii*

Nos levantamentos realizadas nos Estados de Santa Catarina, Paraná e São Paulo, nos anos 2005 e 2006, detectou-se a presença de *P. boernerii* em 18 municípios de Santa Catarina (Fig. 1C), 18 do Paraná (Fig. 1B) e em 15 de São Paulo (Fig. 1A), ocorrendo em áreas de plantio comercial de *Pinus* e em árvores isoladas presente nos municípios. A espécie também já foi detectada em Cambará do Sul, Rio Grande do Sul, por Penteado *et al.* (2004) e em Minas Gerais, no município de Nova Estrela do Sul, por Wilcken *et al.* (2004), seguindo a distribuição das áreas plantadas com espécies de *Pinus*, podendo estar presentes em outros estados do País, nas quais não foram feitas coletas até o momento.

Das 18 localidades de Santa Catarina, 16 foram registros novos (Fig. 1C), sendo que as populações de Rio Negrinho e Três Barras já haviam sido detectadas por Penteado *et al.* (2004), assim como Arapoti, Campo do Tenente, Colombo e Curitiba, no Paraná, onde 14 dos registros são novos para o estado (Fig. 2B). Em São Paulo, dos 15 registros feitos, 14 são novos para o estado, Wilcken *et al.* (2004) já haviam detectado a presença de *P. boernerii* no município de Itapeva, além dos municípios de Buri, Nova Campina, Bom Sucesso do Itararé, Itatinga, Botucatu e Capão Bonito (Fig. 1A).

No estado de Santa Catarina, *P. boernerii* foi registrada em todas as áreas bioclimáticas do estado. A região bioclimática 1, maior produtora comercial de *Pinus* no estado, apresentou 12 pontos de ocorrência (Chapecó, São Miguel do Oeste, Dionísio Cerqueira, Ibicaré, Rio das Antas, Caçador, Santa Cecília, Treze Tílias, Três Barras, Canoinhas, Rio Negrinho e Mafra). Esta região, conhecida como planalto Catarinense, caracteriza-se por apresentar Florestas de Araucária e Campos, com altitude variando de 600 a 1300 m e temperatura média anual de 12°C a 19°C (EMBRAPA 1988). Na região são plantadas principalmente as espécies *P. taeda* e *Pinus elliottii* Engelmann (EMBRAPA 1988). Em Santa Catarina, detectou-se *P. boernerii* também no município de Peritiba, no Vale do Rio Uruguai (Região 9) e no alto Vale do Itajaí, nos municípios de Rio do Sul e Apiúna, porém as regiões não apresentam grandes plantios de interesse econômico. Na região litorânea (região 7), situa-se a 2ª maior área de plantio no estado, e *P. boernerii* foi registrada nos municípios de Blumenau, Brusque e Rio dos Cedros.

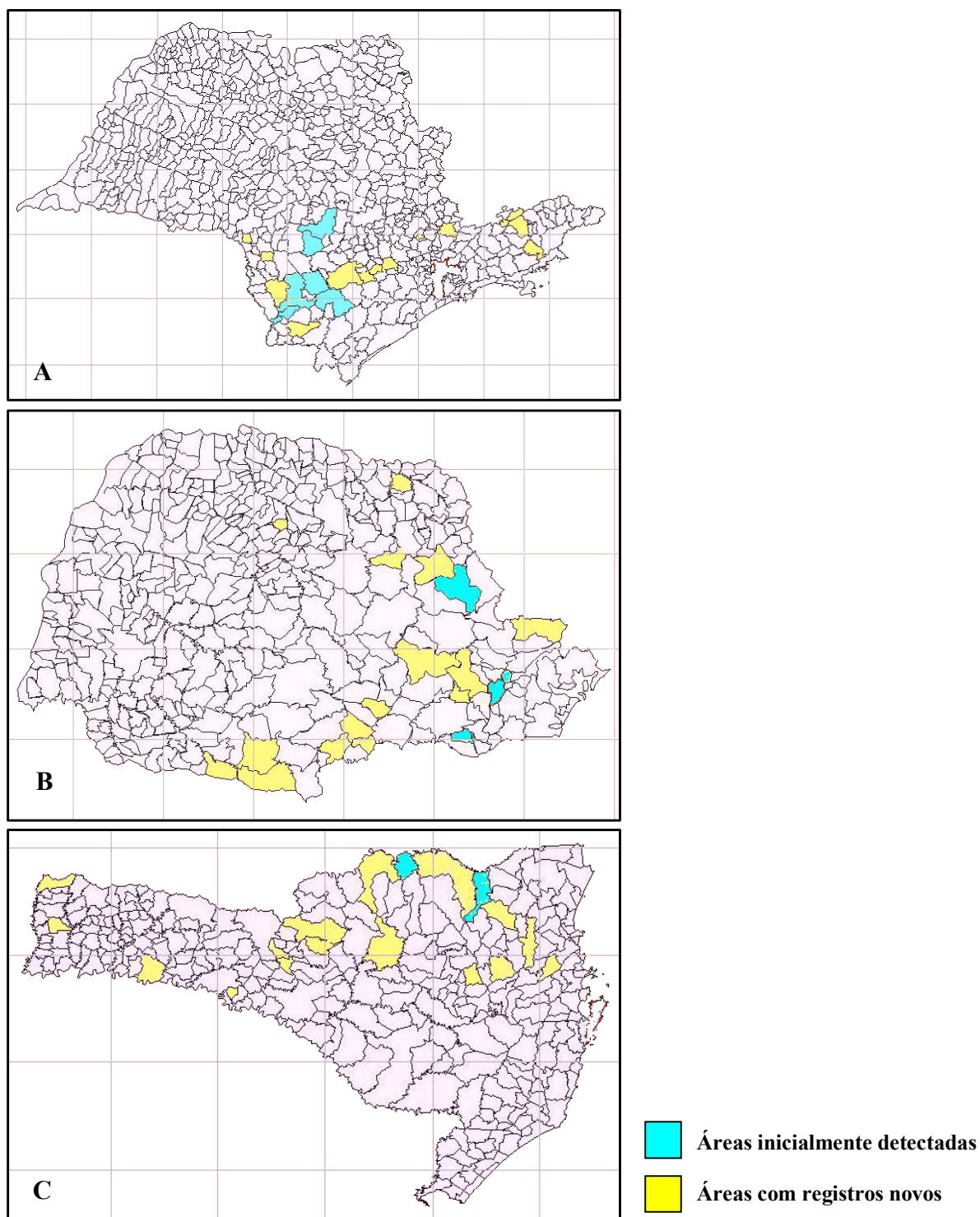


Fig. 1. Municípios onde foi detectada a presença de *Pineus boernerii*: A. Santa Catarina; B. Paraná.; C. São Paulo (Ver Anexo I, II e III para as localidades).

No Paraná não foi possível realizar coletas em todas as regiões bioclimáticas, porém, em todas as áreas investigadas foi diagnosticada a presença de *P. boernerii*. As regiões 1 e 2 são as maiores produtoras de *P. taeda* e *P. elliottii* no estado. A região bioclimática 1, caracteriza-se por apresentar floresta ombrófila mista campos submontanos, altitude variando de 650 a 1100 m e temperatura média entre 15° e 19°C, com chuvas uniformes (EMBRAPA 1986). Nesta região coletou-se *P. boernerii* nos municípios de Coronel Domingos Soares, Clevelândia, Palmas, Paulo Frontin, Rebouças, União da Vitória, Campo do Tenente, Curitiba, Colombo, Campo Largo, Ponta Grossa e Jaguariaíva.

Na região bioclimática 2 *P. boernerii* foi detectada nos municípios de Arapoti e Curiúva. A região caracteriza-se por ser uma área de transição, com altitude variando de 550 a 900 m, clima submontano, temperatura variando de 17,5° a 21°C, precipitação intermediária, floresta ombrófila mista ou não e campos submontanos (Golfari *et al.* 1978, EMBRAPA 1986). *P. boernerii* foi detectada, ainda, no município de Adrianópolis, pertencente ao Vale do Ribeira (região 5) e que vem se consolidando, nos últimos anos, como área de cultivo de *Pinus*. A espécie foi detectada, ainda, nos municípios de Jandaia do Sul (região bioclimática 4) e Bandeirante (região bioclimática 6). Não foram realizadas coletas na região litorânea (região bioclimática 7) e oeste de Guarapuava (região bioclimática 3), não havendo informações sobre a ocorrência da espécie nas duas regiões.

No estado de São Paulo *P. boernerii* está presente nos municípios de Itapeva, Itapetininga, Tejuapá, Itaberá e Apiaí, além dos municípios de Buri, Nova Campina, Bom Sucesso do Itararé, Itatinga, Botucatu e Capão Bonito (Wilcken 2004), todos pertencentes à região bioclimática 1 a qual caracteriza-se por apresentar clima temperado úmido, com altitude variando de 600 a 1000 m temperatura média entre 16° e 19°C e vegetação composta por floresta ombrófila e campos submontanos (Ferreira 1990). A área caracteriza-se por ser a maior produtora de *Pinus* em São Paulo e as principais espécies de *Pinus* cultivadas são *P. taeda* e *P. elliottii* (Golfari *et al.* 1978). A espécie foi detectada, ainda, na região da Serra da Mantiqueira, em Campos do Jordão, Pindamonhangaba (Pico do Itapeva) e Santo Antônio do Pinhal e também em Bragança Paulista (Região bioclimática 3) e também na região de Sorocaba, Sarapuí e Araçoiaba da Serra, áreas de clima subtropical moderado úmido (região bioclimática 4).

A região bioclimática 5, produtora de *Pinus* tropicais no estado de São Paulo (Golfari *et al.* 1978) e a região litorânea (região bioclimática 2) não foram investigadas quanto à ocorrência da espécie.

Pelo extensivo levantamento realizado, observou-se que *P. boernerii* encontra-se amplamente distribuída nos três estados (SC, PR e SP), tendo sido registrada em todas as regiões bioclimáticas onde foram feitas as coletas. Estes resultados mostram que *P. boernerii* encontra-se bastante adaptado aos vários climas das regiões e apresentou uma rápida dispersão, desde que foi inicialmente detectado no país, há apenas seis anos atrás.

Segundo McClure (1990), *P. boernerii* teve uma rápida dispersão em áreas de plantio natural de *P. resinosa*, no nordeste dos Estados Unidos, devido ao fato da espécie apresentar várias gerações em um ano, o que permitiu que as diversas correntes anuais de vento fossem melhor aproveitadas. O mesmo pode estar ocorrendo no Brasil, já que foi verificada que aqui a espécie também apresenta várias gerações anuais. Além disso, a ampla área de cultivo de *Pinus*, assim como ocorre em outras áreas de monocultura agrícola e florestal, e uma baixa quantidade de inimigos naturais associados, faz com que as espécies de afídeos que chegam ao país se dispersem rapidamente por todas as regiões, adquirindo, em determinadas condições, o caráter de praga.

Coletas extensivas devem ser realizadas nos outros estados onde ocorrem plantações comerciais de *Pinus* a fim de se comprovar a ocorrência de *P. boernerii*. Apesar da espécie não apresentar o caráter de praga no Brasil, ela apresenta potencial para vir a se tornar um problema, devendo ser monitorada quanto ao seu desempenho, nos próximos anos.

3.2. Variabilidade genética das populações de *Pinus boernerii*

Dos 36 iniciadores testados (Anexo IV), 16 amplificaram fragmentos de DNA de *P. boernerii*: OPA- 3, OPA-5, OPB-1, OPB-13, OPB-19, OPC-16, OPC-20, OPG-3, OPM-6, OPX-3, OPX-6, OPX-11 e OPX-12, OPY-3, OPY-7, OPY-10 e OPY-18. Desses, três foram testados a fim de se detectar variabilidade nas populações da espécie, conforme apresentado na Tabela 2.

Tabela 2: Sequências dos iniciadores utilizados para análise da variabilidade genética de populações de *Pineus boernerii* através de PCR-RAPD.

Iniciador	Seqüência
OPM-6	CTGGGCAACT
OPX-11	GGAGCCTCAG
OPY-10	CAAACGTGGG

Nenhum dos três iniciadores conseguiu detectar bandas polimórficas nas 19 amostras avaliadas, considerando-se apenas os padrões repetitivos para todas as amostras nas duas repetições. O iniciador OPM-6 amplificou cinco fragmentos monomórficos, com pesos moleculares de, aproximadamente, 1400, 1350, 1170, 1050 e 550 pb (Fig. 2). Já o iniciador OPX-11 amplificou 5 fragmentos de peso molecular com cerca de 1450, 1320, 1100, 850 e 800 pb (Fig. 4). O iniciador OPY-10 amplificou 4 fragmentos para todas as populações avaliadas, as quais apresentaram, aproximadamente 1150, 870, 680 e 570 pb (Fig. 3).

Se por um lado há evidências de que *P. boernerii* realmente possa apresentar uma baixa taxa de variabilidade genética no Brasil, já que a introdução é recente e a espécie é exclusivamente anolocíclica, a ausência de informações sobre a real distribuição e o tempo de introdução do inseto nos outros países da América do Sul, de onde provavelmente as populações do Brasil tenham surgido, e o baixo número de amostras e de iniciadores utilizados neste trabalho, não permitem determinar o grau real de variabilidade genética dessas populações, nem o número de introduções que possam ter ocorrido no país.

É necessário que um número maior de amostras e de localidades sejam avaliados, não só no Brasil mas também em outros países da América do Sul, para que se possa afirmar com certeza que a variabilidade de *P. boernerii* seja realmente baixa. Carvalho (2004) avaliou a variabilidade genética da espécie recém-introduzida *Tinocallis kahawaluokalani* (Kirkaldy, 1907), de várias localidades do Brasil utilizando 106 amostras e cerca de 30 iniciadores e encontrou apenas 14% de variabilidade genética para a espécie mostrada por três iniciadores.

Além disso, a técnica de RAPD, apesar de ser eficiente para a identificação de clones, apresenta muitos problemas, como a amplificação de artefatos da PCR e de microorganismos, impossibilidade de se afirmar que as bandas separadas nos géis provém do mesmo locus; incapacidade, muitas vezes, de se repetir o resultado; e também por não ser capaz de diferenciar organismos homozigotos e heterozigotos (Loxdale & Lushai 1998; Sunnucks 2000 Zitoudi *et al.* 2001; Wilson *et al.* 2003).

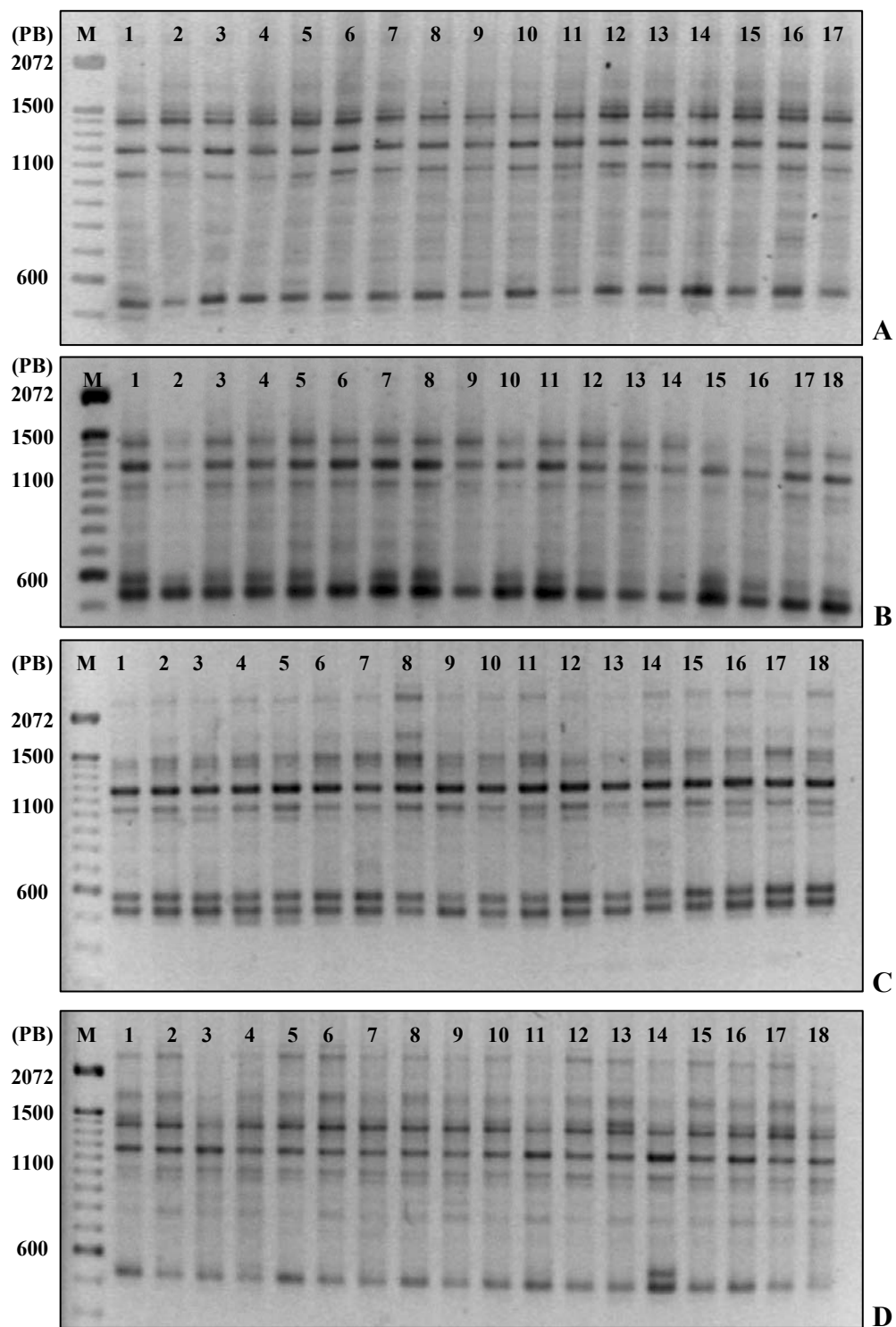


Fig. 2: Padrão de fragmentos monomórficos amplificados por PCR – RAPD, para populações de diferentes localidades de *Pineus boernerii*, utilizando o iniciador OPM-6. A. Ponta Grossa, PR; B. Palmas, PR; C. Rio do Sul, SC; D. Brusque, SC.

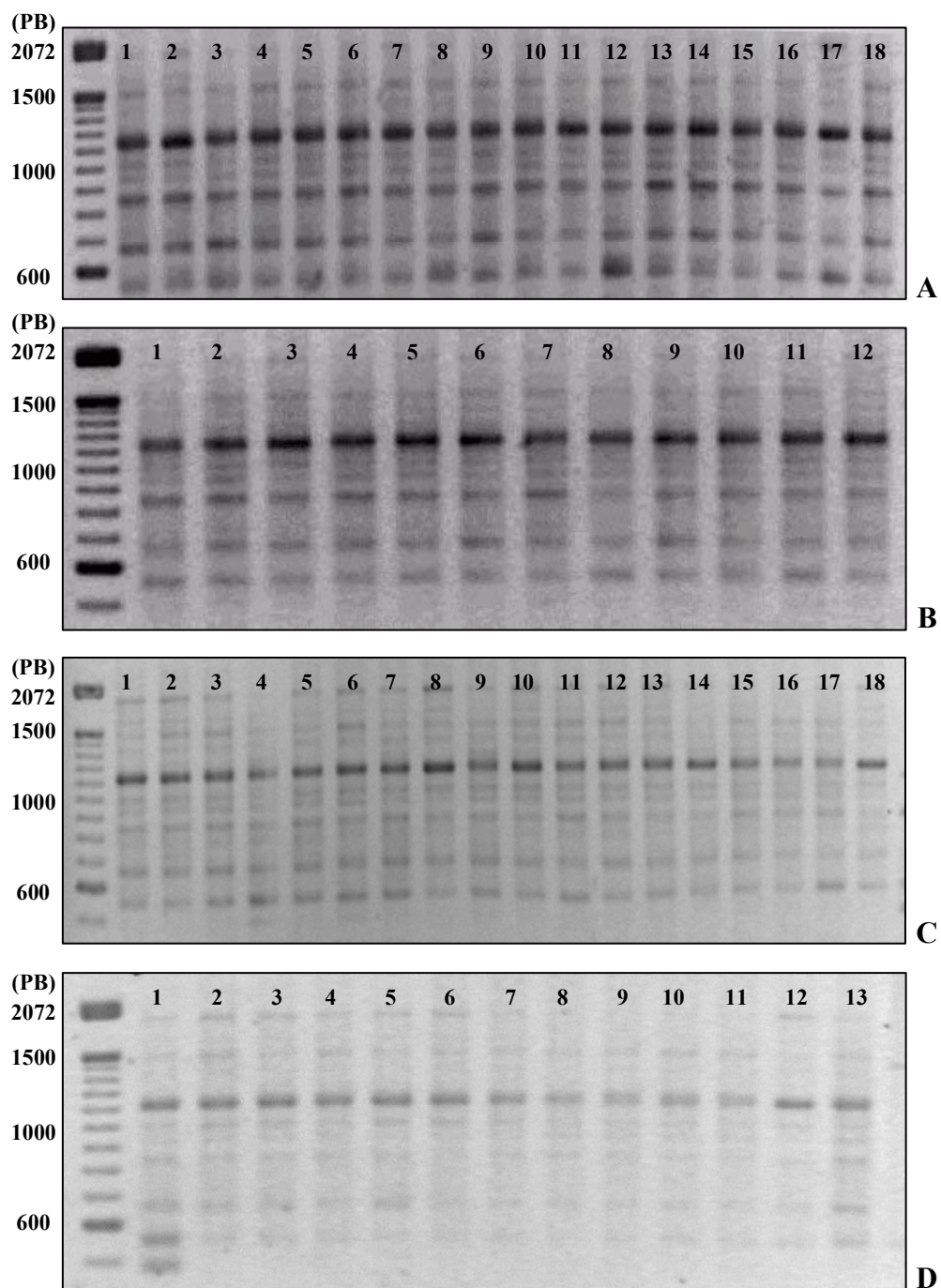


Fig. 3: Padrão de fragmentos monomórficos amplificados por PCR – RAPD, para populações de diferentes localidades de *Pineus boernerii*, utilizando o iniciador OPY-10. A. Arapoti, PR; B. Jandaia do Sul, PR; C. Três Barras, SC; D. Peritiba, SC.

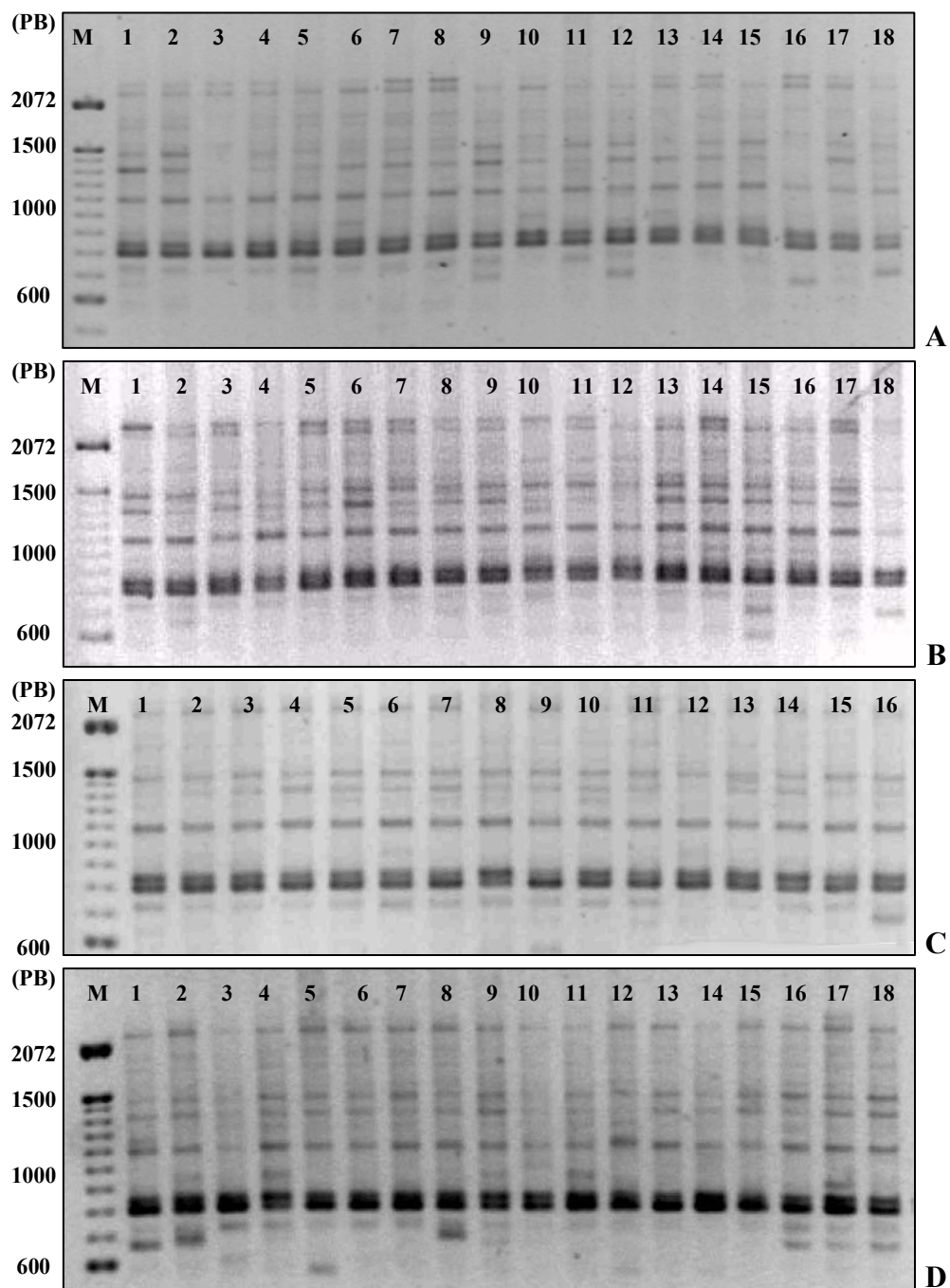


Fig. 4: Padrão de fragmentos monomórficos amplificados por PCR – RAPD, para populações de diferentes localidades de *Pineus boernerii*, utilizando o iniciador OPX-11. A. Ponta Grossa, PR; B. Quatro Barras, PR; C. Dionísio Cerqueira, SC; D. Brusque, SC.

Atualmente, os marcadores RAPD estão sendo gradualmente substituídos por técnicas mais eficazes de análise genética, como a técnica de microsátélites, a qual tem se mostrado extremamente eficiente para o estudo de populações de afídeos. Os microsátélites são pedaços curtos de seqüências de DNA (1 a 10 pb), altamente polimórficos e presentes no genoma de todos os organismos eucariotos. A técnica tem sido capaz de identificar genótipos de afídeos com alta precisão, tanto em casos de reprodução sexuada quanto assexuada (Loxdale & Lushai 1998, Sunnucks 2000, Wilson *et al.* 2003). Esta técnica seria bastante útil para o estudo da variabilidade de *P. boernerii*, porém não foi possível utilizá-la neste trabalho, mas deverá ser considerada em estudos posteriores.

Finalmente, a determinação da real diversidade genética de *P. boernerii*, bem como do número de introduções da espécie no país permitem que se compreenda a rápida dispersão e adaptação do inseto nas diferentes regiões bioclimáticas do Brasil, além de auxiliar nas tomadas de decisões quanto à utilização de medidas visando o monitoramento e, em caso de vir a ocorrer surtos populacionais, de controle da espécie.

4. CONCLUSÕES

Pineus boernerii encontra-se amplamente distribuída e adaptada às diversas regiões bioclimáticas dos estados do Santa Catarina, Paraná e São Paulo.

Não foi detectada variabilidade genética nas amostras de *P. boernerii* nas condições em que a pesquisa foi conduzida.

Através da análise feita não é possível estabelecer o número de introduções de *P. boernerii* no País.

Há necessidade de um número maior de amostras e iniciadores e para determinar a ocorrência de variabilidade genética e, se possível, utilizando outros tipos de marcadores moleculares, além do RAPD.

5. BIBLIOGRAFIA

- Barnes, R. D.; R. F. Jarvis; M. A. Schweppenhauser & L. J. Mullin. 1976. Introduction, spread and control of the pine woolly aphid, *Pineus pini* (L), in Rhodesia. **South African Forestry Journal** **96**: 1 – 11.
- Black IV, W. C.; N. M. DuTeau; G. J. Puterka; J. R. Nechols & J. M. Pettorini 1992. Use of the random amplified polymorphic DNA chain reaction (RAPD-PCR) to detect DNA polymorphisms in aphids (Homoptera: Aphididae). **Bulletin of Entomological Research** **82**: 151 – 159.
- Blackman, R. L. & V. F. Eastop 1994. **Aphids on the world's trees: an identification and information guide**. Wallingford, CAB International, 987 p.
- Bournoville, R.; J. C. Simon; I. Badenhauer; C. Girousse; T. Guilloux & S. André. 2000. Clones of pea aphids *Acyrtosiphon pisum* (Hemiptera: Aphididae) distinguished using genetic markers, differ in their damaging effect on a resistant alfafa cultivar. **Bulletin of Entomological Research** **90**: 33 – 39.
- Carvalho, R. C. Z. 2004. **Bioecologia, de *Tinocallis kahawaluokalani* (Kirkauldy) (Hemiptera: Aphididae) em *Lagerstroemia indica* L. (Lythraceae), em Curitiba, Paraná, e variabilidade genética determinada por PCR-RAPD**. Tese de Doutorado, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, PR. 132p.
- Carvalho, O. R. A. & L. G. E. Vieira. 2000. Comparison of preservation methods of *Atta* spp. (Hymenoptera: Formicidae) for RAPD analysis. **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil** **29**: 489 – 496.
- Carvalho, O. R. A. & L. G. E. Vieira. 2001. Determinação das condições ótimas para análises de RAPD em *Atta sexdens rubropilosa* (Hymenoptera: Formicidae). **Neotropical Entomology** **30**: 593 - 600.
- Cheung, W. Y.; N. Hubert & B. S. Landry. 1993. A simple and rapid microextraction method for plant, animal and insect suitable for RAPD and other PCR analyses. **PCR Methods and Applications** **3**: 69 – 70.
- Chilima, C. Z. & S. R. Leather. 2001. Within-tree and seasonal distribution of the pine woolly aphid *Pineus boernerii* on *Pinus kesiya* trees. **Agricultural and Forest Entomology** **3**: 138 – 145.

- Clements, K. M., C. E. Sorenson, B. M. Wigmann, P. A. Neese & R. M. Roe. 2000. Genetic, biochemical and behavioral uniformity among populations of *Myzus nicotianae* and *Myzus persicae*. **Entomologia Experimentalis et Applicata** **95**: 269 – 281.
- Dixon, A. F. 1985. Structure of aphids populations. **Annual Review of Entomology** **30**: 155 – 174.
- Downie, D. A. 2000. Patterns in the genetic variation in native grape Phylloxera in two sympatric host species. **Molecular Ecology** **9**: 505 – 514.
- EMBRAPA. Centro Nacional de Pesquisa de Florestas. 1986. **Zoneamento ecológico para plantios florestais no estado do Paraná**. Brasília:EMBRAPA-DDT, 89 p. (EMBRAPA-CNPF. Documentos, 17).
- EMBRAPA. Centro Nacional de Pesquisa de Florestas. 1988. **Zoneamento ecológico para plantios florestais no estado do Santa Catarina**. Curitiba, 113 p. (EMBRAPA-CNPF. Documentos, 21).
- Ferreira, M. E. & D. Grattapaglia 1998. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. 3^a ed. Brasília: EMBRAPA-CENARGEN, 220 p..
- Ferreira, M. 1990. Escolha de espécies arbóreas para formação de maciços florestais. **Documentos Florestais, Piracicaba** **7**: 1 – 15.
- Figueroa, C. C.; J. C. Simon; J. F. Le Gallic & H. M. Niemeyer 1999. Molecular markers to differentiate two morphologically-close species of the genus *Sitobion*. **Entomologia Experimentalis et Applicata** **92**: 217 – 225.
- Golfari, L.; R. L. Caser & V. P. Moura. 1978. **Zoneamento ecológico esquemático para reflorestamento no Brasil (2^a aproximação)**. Brasília, PNUD/FAO/IBDF/BRA – 45, 66p. (Série Técnica N^o 11).
- Havill, N. P.; M. E. Montgomery; G. Yu; S. Shiyake & A. Caccone. 2006. Mitochondrial DNA from hemlock woolly adelgid (Homoptera: Adelgidae) suggests cryptic speciation and pinpoints the source of the introduction to eastern north America. **Annals of the Entomological Society of America** **99**: 195 – 203.
- Haymer, D. S. 1994. Random amplified polymorphic DNAs and microsatellites: what are they, and can they us anything we don't already know? **Annals of the Entomological Society of America** **87**: 717 – 722.
- Loxdale, H. D. & C. P. Brookes 1990. Prevalence of *Sitobion fragariae* (Walker) over *S. avenae* (Fabricius) (Homoptera: Aphididae) on wild cocksfoot grass (*Dactylis glomerata*) in south-east England. **Bulletin of Entomological Research**. **80**: 27 – 29.

- Loxdale, H. D. & G. Lushai 1998. Molecular markers in entomology. **Bulletin of Entomological Research**. **88**: 577 – 600.
- Lushai, G.; P. J. De Barro; O David; T. N. Sherratt & N. MacClean 1998. Genetic variation within a parthenogenetic lineage. **Insect Molecular Biology** **7**: 337 – 344.
- Lushai, G. & H. D. Loxdale 2002. The biological improbability of a clone. **Genetical Research** **79**: 1 – 9.
- Mailu, A. M.; C. P. M. Khamal & D.J.W. Rose. 1978. Evaluation of pine wooly aphid damage to *Pineus pini* (L.) in Kenya. **East African Agricultural Journal**, **43**: 256 – 259.
- Mailu, A. M.; C. P. M. Khamal & D.J.W. Rose. 1980. Population dynamics of pine wooly aphid, *Pineus pini* (Gmelin) (Homoptera: Adelgidae) in Kenya. **Bulletin of Entomological Research** **70**: 483 – 490.
- Margaritoupoulos, J. T.; Z. Mamuris & J. A. Tsitsipis. 1998. Attempted discrimination of *Myzus persicae* and *Myzus nicotianae* (Homoptera: Aphididae) by random amplified polymorphic DNA polimerase chain reaction technique. **Annals of the Entomological Society of America** **91**: 602 – 607.
- Martinez-Torres, D.; R. Carrió; A. Latorre; J. C. Simon; A. Hermoso & A. Moya. 1997. Assessing the nucleotide diversity of three aphid species by RAPD. **Journal of Evolutionary Biology** **10**: 459 – 477.
- McClure, M. S. 1982. Distribution and damage of two *Pineus* species (Homoptera: Adelgidae) on red pine in New England. **Annals of the Entomological Society of America** **75**: 150 – 157.
- McClure, M. S. 1984. Influence of cohabitation and resinosis on site selection and survival of *Pineus boernerii* Annand and *P. coloradensis* (Gillette) (Homoptera: Adelgidae) on red pine. **Environmental Entomology** **13**: 657 – 663.
- McClure, M. S. 1989a. Importance of weather to the distribution and abundance of introduced Adelgidae and scale insects. **Agricultural and Forest Meteorology** **47**: 291 – 302.
- McClure, M. S. 1989b. Biology, population trends and damage of *Pineus boernerii* and *P. coloradensis* (Homoptera: Adelgidae) on red pine. **Environmental Entomology** **18**: 1066 – 1073.
- McClure, M. S. 1990. Cohabitation and host species effects on the population growth of *Matsucoccus resinosa* (Homoptera: Margarodidae) and *Pineus boernerii* (Homoptera: Adelgidae) on red pine. **Environmental Entomology** **19**: 672 – 676.

- McClure, M. S. & C. A. S. J. Chea. 1999. Reshaping the ecology of invading populations of hemlock woolly adelgid, *Adelges tsugae* (Homoptera: Adelgidae), in eastern North America. **Biological Invasions 1**: 247 – 254.
- Mills, N. J. 1990. Biological control of forest aphid pests in Africa. **Bulletin of Entomological Research 80**: 31 – 36.
- Nicol, D.; K. F. Armstrong; S. D. Wratten; C. M. Cameron; C. Frampton & B. Fenton 1997a. Genetic variation in a introduced aphid pest (*Metopolophium dirhodum*) in New Zealand and relation to individuals from Europe. **Molecular Ecology 6**: 255 – 265.
- Nicol, D.; K. F. Armstrong; S. D. Wratten; P. Walsh; C. M. Cameron; C. Lahmann & C. Frampton 1997b. Genetic diversity of two introduced aphid species in New Zealand. **Proc. 50th N. Z. Plant Protection Conference**, p. 322 – 325.
- Nicol, D.; K. F. Armstrong; S. D. Wratten; P. Walsh; N. A. Straw, C. M. Cameron; C. Lahmann & C. Frampton 1998. Genetic diversity of an introduced pest of green spruce aphid *Elatobium abientinum* (Hemiptera: Aphididae) in New Zealand and United Kingdom. **Bulletin of Entomological Research 88**: 537 – 543.
- Parker, B. L.; M. Skinner; S. Gouli & H. B. Teillon. 2002. **Cold temperatures. Will they limit range expansion?** Proceedings of the Hemlock Woolly Adelgidae in the Eastern United States Symposium . February 5 – 7, p 269 – 273. East Brunswick, New Jersey.
- Penteado, S. R. C.; R. F. Trentini; E. T. Iede & W. Reis-Filho. 2000. Pulgão do Pinus: nova praga florestal. **Série Técnica IPEF 13**: 97 – 102.
- Stern, D. L.; S. Aoki & U. Kurosu 1997. Determining aphid taxonomic affinities and life cycles with molecular data: a case of the tribe Cerataphidini (Hormaphididae: Aphidoidea: Hemiptera). **Systematic Entomology 22**: 81 – 96.
- Sigurdsson, V., G. Haldórsson, A. Sigurgeirsson, E. Th. Thórsson & K. Anamthawat-Jónsson. 2000. Genetic differentiation of the green spruce aphid (*Elatobium abientinum* Walker), a recent invader to Iceland. **Agricultural and Forest Entomology 1**: 157 – 163.
- Sunnucks, P. 2000. Efficient genetic markers for population biology. **Tree 15**: 199 – 203.
- Sunnucks, P.; F. Driver; W. V. Brown; M. Carver; D. F. Hales & W. M. Milne 1997. Biological and genetic characterization of morphologically similar *Therioaphis trifolii* (Hemiptera: Aphididae) with different host utilization. **Bulletin of Entomological Research 87**: 425 – 436.
- Tanton, M. T. & D. Alder. 1977. The distribution and possible effects of the woolly aphid *Pineus* (Homoptera: Adelgidae) on *Pinus radiata* D. Don growing in the Australian capital territory. **Australian Forest Research 7**: 253 – 263.

- Timm, A. E., K. L. Pringle & L. Warnich. 2005. Genetic diversity of woolly apple aphid *Eriosoma lanigerum* (Hemiptera: Aphididae) populations in the Western cape, South Africa. **Bulletin of Entomological Research** **95**: 187 – 191.
- Vanlerberghe-Masutti F. & P. Chavigny. 1998. Host based genetic differentiation in the aphid *Aphis gossypii* Glover, evidenced from RAPD fingerprintings. **Molecular Ecology** **7**: 905 – 914.
- Wilcken, C. F., N. C. Oliveira, R. C. Zonta-de-Carvalho, E. B. Couto & P. J. Ferreira-Filho. 2004. Ocorrência do pulgão lanígero do *Pinus Pineus boernerii* (Hemiptera: Adelgidae) em plantios de *Pinus* nos estados de São Paulo e Minas Gerais. **Anais do XX Congresso Brasileiro de Entomologia**, Gramado, RS.
- Wilson, A. C. C.; P. Sunnucks & D. F. Hales. 2003. Heritable genetic variation and potential for adaptative evolution in asexual aphids (Aphidoidea). **Biological Journal of the Linnean Society** **79**: 115 – 135.
- Zitoudi, K.; J. T. Margaritopoulos, Z. Mamuris & J. A. Tsitsipis. 2001. Genetic variation in *Myzus persicae* populations associated with host-plant and life cycle category. **Entomologia Experimentalis et Applicata** **99**: 303 – 311.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A identificação das espécies de Adelgidae é bastante complicada, uma vez que pode haver, dentro de uma mesma espécie, uma grande variedade de formas ocorrendo em diferentes plantas hospedeiras. Além disso, é bastante comum, dentro do grupo, uma redução nas estruturas das fêmeas ápteras, devido ao hábito séssil. *Pineus boernerii* e *Pineus pini* tem sido extensivamente confundidas, em vários países, sendo necessário que se faça uma investigação com populações de várias regiões, de forma a se poder determinar com mais precisão a distribuição das duas espécies no mundo.

Através da comparação dos dados morfológicos, com dados da literatura, a espécie detectada no Brasil é a mesma descrita nos Estados Unidos como *Pineus boernerii* Annand, 1928, e no Paquistão como *Pineus simmondsi* Yassen & Ghani, 1971, porém, provavelmente não se trate da mesma espécie descrita na Argentina como *Pineus havrylenkoi* Blanchard, 1944. Sendo assim, é correto que se conclua que pode haver mais de uma espécie de *Pineus* ocorrendo na América do Sul, *P. havrylenkoi*, descrita por Blanchard, na Argentina, e *P. boernerii* registrada no Brasil e no Chile. Uma análise da variabilidade molecular de *Pineus* provenientes de várias localidades da América do Sul poderia resolver a questão de quantas espécies ocorrem na região.

No Brasil *P. boernerii* tem-se mostrado adaptado às diferentes regiões bioclimáticas, incluindo aquelas de interesse comercial para o plantio de *Pinus*, podendo ocorrer durante todo o ano. O estudo da biologia do inseto nas duas principais espécies comerciais de *Pinus*, *P. taeda* e *P. elliottii*, mostra que *P. boernerii* é capaz de se reproduzir e aumentar a população, principalmente em *P. elliottii*.

A determinação da biologia de *P. boernerii* em diferentes cultivares de *P. elliottii* e *P. taeda*, bem como a análise dos padrões alimentares através da técnica de monitoramento eletrônico podem auxiliar na determinação de variedades mais resistentes ao ataque dos insetos. Da mesma forma, técnicas silviculturais, como a poda constante das árvores pode levar a uma grande diminuição ou, no caso de uma infestação recente, à eliminação total do inseto da planta, uma vez que ele se estabelece, preferencialmente nos galhos inferiores da árvore.

Em função da capacidade de colonização de *P. boernerii* e de suas características biológicas, e mesmo que não haja informações, até o presente momento, de que *P. boernerii* venha causando danos econômicos em áreas de plantio de *Pinus* no Brasil ou de outros países

da América do Sul, é necessário que se faça o monitoramento contínuo da espécie nas regiões de maior interesse comercial, de forma a detectar possíveis surtos populacionais que poderiam vir a ocasionar perdas comerciais.

ANEXOS

Anexo I. Localidades onde foram coletadas as populações de *Pineus boernerii* em *Pinus* spp. no estado de Santa Catarina nos anos 2005/2006

Localidade	Latitude	Longitude	Data de coleta
Rio dos Cedros	26° 44' 18''	49° 16' 27''	01/01/05
Blumenau	26° 55' 10''	49° 03' 58''	16/12/05
Brusque	27° 05' 53''	48° 55' 03''	17/12/05
Santa Cecília	26° 57' 39''	50° 25' 37''	18/01/06
Treze Tílias	27° 00' 06''	51° 24' 23''	19/01/06
Caçador	26° 46' 31''	51° 00' 54''	19/01/06
Rio das Antas	26° 53' 55''	51° 04' 28''	19/01/06
Peritiba	27° 22' 23''	51° 54' 14''	20/01/06
Ibicaré	27° 05' 15''	51° 22' 45''	20/01/06
São Miguel do Oeste	26° 43' 31''	53° 31' 05''	21/01/06
Dionísio Cerqueira	26° 15' 18''	53° 38' 23''	21/01/06
Chapecó	27° 05' 47''	52° 37' 06''	21/01/06
Três Barras	26° 06' 23''	50° 19' 20''	03/06/06
Rio Negrinho	26° 15' 16''	49° 31' 06''	04/06/06
Canoinhas	26° 10' 38''	50° 23' 24''	04/06/06
Mafra	26° 06' 41''	49° 48' 19''	04/06/06
Rio do Sul	27° 12' 51''	49° 38' 35''	18/09/06
Apiúna	27° 02' 08''	49° 23' 23''	18/09/06

Anexo II. Localidades onde foram coletadas as populações de *Pineus boernerii* em *Pinus* spp. no estado do Paraná nos anos 2005/2006.

Localidade	Latitude	Longitude	Data de coleta
Coronel Soares	26° 13' 40''	52° 01' 55''	26/01/05
Balsa Nova	25° 28' 18''	49° 42' 53''	31/12/05
União da Vitória	26° 13' 48''	51° 05' 11''	22/01/06
Rebouças	25° 37' 14''	50° 41' 34''	22/01/06
Palmas	26° 29' 03''	51° 59' 26''	22/01/06
Paulo Frontin	26° 02' 23''	50° 50' 09''	22/01/06
Clevelândia	26° 22' 19''	52° 28' 14''	22/01/06
Curiúva	24° 01' 57''	50° 27' 30''	18/02/06
Jandaia do Sul	23° 36' 11''	51° 38' 36''	16/02/06
Bandeirante	23° 06' 36''	50° 22' 03''	16/02/06
Jaguariaíva	24° 15' 04''	49° 42' 21''	18/02/06
Arapoti	24° 09' 28''	49° 49' 36''	18/02/06
Campo Largo	25° 27' 31''	49° 31' 42''	19/02/06
Ponta Grossa	25° 05' 42''	50° 09' 43''	19/02/06
Adrianópolis	24° 39' 26''	48° 59' 28''	30/07/06
Curitiba *	25° 25' 40''	49° 16' 23''	
Campo do Tenente *	25° 58' 41''	49° 40' 58''	
Colombo *	25° 17' 30''	49° 13' 27''	

* Várias coletas realizadas no período de 2003 a 2006.

Anexo III. Localidades onde foram coletadas as populações de *Pineus boernerii* em *Pinus* spp. no estado de São Paulo no ano de 2006.

Localidade	Latitude	Longitude	Data de Coleta
Sapuí	23° 38' 26''	47° 38' 26''	14/01/06
Araçoiaba da Serra	23° 30' 19''	47° 36' 51''	14/01/06
Sorocaba	23° 30' 06''	47° 27' 29''	14/01/06
Itapetininga	23° 35' 30''	48° 03' 11''	15/01/06
Apiaí	24° 30' 34''	48° 50' 33''	15/01/06
Ipaussú	23° 03' 24''	49° 37' 35''	17/02/06
Tejupá	23° 20' 34''	49° 22' 35''	17/02/06
Itaberá	23° 51' 43''	49° 08' 14''	17/02/06
Itapeva	23° 58' 56''	48° 52' 32''	18/02/06
São Luís do Paraitinga	23° 13' 18''	45° 18' 36''	27/07/06
Santo Antônio do Pinhal	22° 49' 38''	45° 39' 45''	27/07/06
Pindamonhangaba (Pico do Itapeva)	22° 73' 94''	45° 59' 14''	28/07/06
Campos do Jordão	22° 42' 22''	45° 35' 29''	28/07/06
Bragança Paulista	22° 57' 07''	46° 32' 31''	29/07/06
Vinhedo	23° 01' 47''	46° 58' 31''	29/07/06

Anexo IV. Seqüências dos iniciadores testados quanto à amplificação de bandas de DNA para análise da variabilidade genética de populações de *Pineus boeneri* através de PCR-RAPD.

Iniciador	Seqüência
OPA-1	CAGGCCCTTC
OPA- 3	AGTCAGCCAC
OPA-5	AGGGGTCTTG
OPA-6	GGTCCCTGAC
OPA-7	GAAACGGGTG
OPA-10	GTGATCGCAG
OPA-12	TCGGCGATAG
OPA-13	CAGCACCCAC
OPA-14	TCTGTGCTGG
OPA-15	TTCCGAACCC
OPA-16	AGCCAGCGAA
OPA-17	GACCGCTTGT
OPA-18	AGGTGACCGT
OPA-20	GTTGCGATCC
OPB-1	GTTTCGCTCC
OPB-10	CTGCTGGGAC
OPB-12	CCTTGACGCA
OPB-13	TTCCCCGCT
OPB-17	AGGGAACGAG
OPB-18	CCACAGCAGT
OPB-19	ACCCCCGAAG
OPC-5	GATGACCGCC
OPC-16	CACACTCCAG
OPC19	GTTGCCAGCC
OPC-20	ACTTCGCCAC
OPG-3	GAGCCCTCCA
OPM-6	CTGGGCAACT
OPX-3	TGGCGCAGTG
OPX-6	ACGCCAGAGG
OPX-11	GGAGCCTCAG
OPX-12	TCGCCAGCCA
OPY -1	GTGGCATCTC
OPY-3	ACAGCCTGCT
OPY-7	AGAGCCGTCA
OPY-10	CAAACGTGGG
OPY-18	GTGGAGTCAG