

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JULIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

ANÁLISE DOS GENES MITOCONDRIAIS COI E 16S DE
POPULAÇÕES DE *Chrysoperla externa* (HAGEN, 1861)
(NEUROPTERA:CHRYSOPIDAE) DE DIFERENTES
LOCALIDADES GEOGRÁFICAS

Mariah Valente Baggio

Bióloga

JABOTICABAL – SÃO PAULO - BRASIL

Fevereiro de 2010

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JULIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**ANÁLISE DOS GENES MITOCONDRIAIS COI E 16S DE
POPULAÇÕES DE *Chrysoperla externa* (HAGEN, 1861)
(NEUROPTERA:CHRYSOPIDAE) DE DIFERENTES
LOCALIDADES GEOGRÁFICAS**

Mariah Valente Baggio

Orientador: Prof. Dr. Sérgio de Freitas

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, UNESP, Campus de Jaboticabal, para obtenção do título de mestre em Agronomia, Área de Concentração em Entomologia Agrícola

JABOTICABAL – SÃO PAULO – BRASIL

Fevereiro de 2010

B144a Baggio, Mariah Valente
Análise dos genes mitocondriais COI e 16S de populações de
Chrysoperla externa (Hagen, 1861) (Neuroptera: Chrysopidae) de
diferentes localidades geográficas / Mariah Valente Baggio. --
Jaboticabal, 2010
x, 46 f. : il. ; 28 cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista,
Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2010
Orientador: Sérgio de Freitas
Banca examinadora: Nilza Maria Martinelli, Karina Lucas da Silva
Brandão
Bibliografia

1. *Chrysoperla externa*. 2. Genética de populações. I. Título. II.
Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 595.74

Ficha catalográfica elaborada pela Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação – Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação - UNESP, Câmpus de Jaboticabal.

DADOS CURRICULARES DA AUTORA

MARIAH VALENTE BAGGIO – Nascida em São Paulo – SP em 16 de Maio de 1985, é Bióloga graduada pela Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV/UNESP), onde foi bolsista da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) no período de Setembro/05 a Setembro/06. Em Março de 2008 iniciou o curso de Mestrado em Agronomia – Área de Concentração em Entomologia Agrícola na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV/UNESP), sendo bolsista da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), no período de Março/08 a Fevereiro/10.

AGRADECIMENTOS

- Ao Prof. Dr. Sérgio de Freitas, pelos ensinamentos, pela ajuda, amizade, apoio e orientação neste trabalho.
- À Prof^a. Dr^a. Adriana C. Morales por me ensinar a trabalhar com os programas moleculares.
- À mestranda Taís Carmona Lavagnini por me ajudar com a manipulação do DNA.
- À banca examinadora, Prof^a. Dr^a. Nilza Maria Martinelli e Dr^a. Karina Lucas da Silva Brandão, pelas sugestões para a melhoria deste trabalho.
- À Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, UNESP, Campus de Jaboticabal, pela oportunidade de realizar este trabalho.
- À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo financiamento deste trabalho.
- À bibliotecária Tiêko Takamiya Sugahara pelas correções das referências deste trabalho.
- À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de mestrado.

Dedico

À minha família e amigos,

pelo incentivo e auxílio nos momentos de dificuldade.

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE FIGURAS.....	vii
LISTA DE TABELAS.....	viii
RESUMO.....	ix
ABSTRACT	x
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	3
3. MATERIAL E MÉTODOS	7
3.1. Localidades amostradas.....	7
3.2. Metodologia	9
3.3. Análise dos resultados.....	10
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	11
4.1. Diversidade haplotípica.....	15
4.1.1. Gene COI.....	15
4.1.2. Gene 16S.....	16
4.2. Estrutura genética de <i>C. externa</i>	18
4.2.1. Gene COI.....	18
4.2.2. Gene 16S.....	22
4.3. Ocupação geográfica dos haplótipos de <i>C. externa</i>	26
5. CONCLUSÕES.....	30
6. REFERÊNCIAS	30
APÊNDICES.....	39
APÊNDICE A – SEQUÊNCIAS DO GENE COI.....	40
APÊNDICE B – SEQUÊNCIAS DO GENE 16S.....	44

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Rede haplotípica das sequências do gene COI de populações de <i>C. externa</i> de diferentes localidades	21
Figura 2. Rede haplotípica “Median Joining” das sequências de DNA do gene COI de populações de <i>C. externa</i> de diferentes localidades	22
Figura 3. Rede haplotípica das sequências do gene 16S de populações de <i>C. externa</i> de diferentes localidades	25
Figura 4. Rede haplotípica “Median Joining” das populações de <i>C. externa</i> de diferentes localidades para o gene 16S.....	26

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1. Locais, data de coleta, número de identificação dos indivíduos, número de adultos (n) de <i>C. externa</i> que foram utilizados para a extração dos genes mitocondriais 16S e COI	8
Tabela 2. Sequências dos oligonucleotídeos (SIMON et al.1994) utilizados para a amplificação por PCR e sequenciamento da subunidade I (COI) da Citocromo Oxidase mitocondrial e 16S dos indivíduos de <i>Chrysoperla externa</i>	9
Tabela 3. Número das sequências de DNA amplificadas e os sítios variáveis encontrados no gene COI de populações de <i>C. externa</i> de diferentes localidades.....	13
Tabela 4. Número das sequências de DNA amplificadas e os sítios variáveis encontrados no gene 16S de populações de <i>C. externa</i> de diferentes localidades.....	14
Tabela 5. Dados descritivos referentes aos polimorfismos das sequências de DNAmT do gene COI de populações de <i>C. externa</i> de diferentes localidades.....	16
Tabela 6. Dados descritivos referentes aos polimorfismos das sequências de DNAmT do gene 16S de populações de <i>C. externa</i> de diferentes localidades.....	18
Tabela 7. Distância genética entre as sequências nucleotídicas do gene COI de populações de <i>C. externa</i> dentro de cada localidade	19
Tabela 8. Distância genética entre as sequências nucleotídicas do gene COI de populações de <i>C. externa</i> de diferentes localidades	20
Tabela 9. Distância genética entre as sequências nucleotídicas do gene 16S de populações de <i>C. externa</i> dentro de cada localidade	23
Tabela 10. Distância genética entre as sequências nucleotídicas do gene 16S de populações de <i>C. externa</i> de diferentes localidades	23
Tabela 11. Distância linear aproximada, em quilômetros, entre cada uma das localidades utilizadas para o estudo de populações de <i>C. externa</i>	29

**ANÁLISE DOS GENES MITOCONDRIAIS COI E 16S DE POPULAÇÕES DE
Chrysoperla externa (HAGEN, 1861) (NEUROPTERA:CHRYSOPIDAE) DE
DIFERENTES LOCALIDADES GEOGRÁFICAS**

RESUMO - *Chrysoperla externa* é uma espécie de crisopídeo encontrada em diversos agroecossistemas brasileiros, capaz de se alimentar de diferentes pragas agrícolas. Em cada ambiente em que for encontrada poderá sofrer diferentes pressões seletivas do ambiente. Para a verificação das mutações genéticas presentes nas populações de *C. externa* podem ser usados marcadores moleculares, em especial os genes mitocondriais, que são de fácil manipulação. *C. externa* é de fácil criação e a mais estudada para multiplicação massal, por isso se faz necessário estudar a resposta das populações quando liberadas em ambientes diferentes, visto que estas podem não sobreviver em áreas biogeográficas distintas, inviabilizando o seu papel como agente de controle de pragas. O objetivo deste trabalho foi caracterizar geneticamente as populações de *C. externa* nos municípios de Brotas (SP), Jaboticabal (SP), Rifaina (SP), São Carlos (SP), São José dos Campos (SP) e São Sebastião do Paraíso (MG). Para o gene COI foram verificados oito haplótipos, seis mutações e a maior diversidade haplotípica foi encontrada em Brotas e São Sebastião do Paraíso. Para o gene 16S foram observadas quatro mutações, seis haplótipos e a maior diversidade haplotípica ocorreu no município de São Sebastião do Paraíso. A distância genética encontrada entre as populações de *C. externa* não foi significativa para os dois genes analisados, evidenciando que provavelmente as populações são geneticamente compatíveis. O estudo da estrutura genética dessas populações de *C. externa*, de ambos os genes, mostrou que essas populações não apresentam um padrão de distribuição haplotípica. Então, talvez sejam necessários outros estudos com populações desta espécie oriundas de localidades mais distantes geograficamente dos que as utilizadas neste trabalho.

Palavras-chave: *Chrysoperla externa*, genética de populações, gene COI, gene 16S.

ANALISYS OF MITOCHONDRIAL GENES COI AND 16S FROM POPULATIONS OF *Chrysoperla externa* (Hagen, 1861) (Neuroptera: Chrysopidae) FROM DIFFERENT GEOGRAPHICAL LOCALITIES

ABSTRACT - *Chrysoperla externa* is a species of green lacewing found in several Brazilian agroecosystems able to feed on various agricultural pests. In each environment that is found may experience different environmental selective pressures. In order to verify genetic mutations in *C. externa* populations it may be used molecular markers, in particular mitochondrial genes, which are easy handling and extraction. *C. externa* is easy to create and the most studied for mass multiplication, so it is necessary to study on the response of populations when released in different environments, since they may not survive in different biogeographic areas, derailing its role as a pest controller. The objective of this study was to characterize genetically the populations of *C. externa* from the cities of Brotas (SP), Jaboticabal (SP), Rifaina (SP), São Carlos (SP), São José dos Campos (SP) and São Sebastião do Paraíso (MG). For the COI gene it was found eight haplotypes, six mutations and greater haplotype diversity in Brotas and São Sebastião do Paraíso. In the 16S there were four mutations, six haplotypes and haplotype diversity was higher in São Sebastião do Paraíso. The genetic distance among populations of *C. externa* was not significant for the two genes analyzed, showing that the populations are probably genetically compatible. The study of the genetic structure of populations of *C. externa*, showed for both genes that these populations do not show a pattern of haplotype distribution. So, it may need further study on populations of this species originating from geographically more distant locations of those used in this work.

Key-words: *Chrysoperla externa*, genetic of populations, COI gene, 16S gene.

1. INTRODUÇÃO

Chrysoperla externa (Hagen, 1861) (Neuroptera: Chrysopidae) é importante inimigo natural de diversas pragas agrícolas, tais como tripes, cochonilhas, ovos e larvas de diferentes lepidópteros e mosca-branca (FREITAS, 2001). Além disso, esta é uma das espécies mais estudadas da família Chrysopidae, tendo em vista sua grande plasticidade ecológica e vasta distribuição geográfica, ao longo da América Central e América do Sul (BROOKS, 1994; FREITAS & PENNY, 2001).

Esta espécie apresenta potencial para controle de vários insetos praga, uma vez que é encontrada em muitos agroecossistemas brasileiros, tais como citrus (SOUZA & CARVALHO, 2002), algodão (CARVALHO et al. 2003), sorgo (FIGUEIRA & LARA, 2004), *Pinus taeda* (Linnaeus, 1753) (CARDOSO et al. 2003), manga (RIBEIRO et al. 2009) e maçã (FERREIRA et al. 2006), café (SILVA et al. 2006) e soja (BELORTE et al. 2004).

Para povoar diferentes habitats os insetos realizam migrações, que podem ser influenciadas por vários fatores como mudanças em seu habitat, alterações climáticas, busca por alimento, reprodução, disponibilidade de plantas hospedeiras, competição e até mesmo o comportamento (LOXDALE & LUSHAI, 1999).

No caso de *C. externa*, esta pode ser capaz de apresentar tanto migração devido a fatores bióticos e abióticos, quanto à migração obrigatória de pré-oviposição, visto que DUELLI (1980) retrata tal comportamento para a espécie *Chrysoperla carnea* (Stephens, 1836). *C. externa* pode, então, migrar para diferentes habitats e sofrer diferentes pressões ambientais.

Assim sendo, em cada ecossistema em que for encontrada, diferentes pressões seletivas do ambiente atuarão sobre sua população, como por exemplo, o tipo e a qualidade nutricional do alimento, variações de temperatura, umidade relativa e radiação ultravioleta. Essas podem influenciar a segregação de haplótipos com mutações.

As mutações podem ser geradas em função de erros no processo de replicação do DNA, de elementos do DNA que se movem de um lugar para outro (transposons), de

mudanças químicas espontâneas e de lesões causadas por metabólitos gerados pelas atividades celulares normais (JABLONKA & LAMB, 2005). Além disso, agentes físicos como raios-X e radiação ultravioleta também causam lesões no DNA. Se essas lesões não forem ajustadas pelo mecanismo de reparo do DNA, então, as mesmas serão denominadas mutações (JABLONKA & LAMB, 2005).

A constatação da ocorrência de mutações pode ser feita por meio do estudo das sequências de pares de bases dos genes. Dentre eles destacam-se os genes mitocondriais, que são de fácil manipulação e recomendados para estudos em nível genérico e específico (HOY, 1994; CATERINO et al. 2000; ARIAS et al. 2003).

As mitocôndrias são organelas auto-duplicantes, que ocorrem no citoplasma de todos os eucariotos, as quais são herdadas citoplasmaticamente e seus genes são primariamente transmitidos através do gameta materno (ARIAS et al. 2003). O genoma mitocondrial é circular com aproximadamente, 16 kb em animais. Sua taxa de substituição de bases nitrogenadas é bastante alta em comparação com o genoma nuclear (ARIAS et al. 2003).

Genomas mitocondriais são fitas duplas circulares que codificam 5% das atividades necessárias para o funcionamento da mitocôndria (ARIAS & INFANTE-MALACHIAS, 2001) e nos insetos não tem íntrons, sendo que as regiões intergênicas são pequenas ou ausentes (HOY, 1994).

Além destas características, o DNA mitocondrial tem sido extensivamente estudado por ser de fácil extração, devido a sua alta densidade, grande número de cópias dentro da célula e sua localização dentro da organela (HOY, 1994). Conseqüentemente seu isolamento é muito fácil.

A utilização de genes mitocondriais para verificar a presença de mutações pode ser muito vantajosa, uma vez que pode esclarecer a presença ou ausência de fluxo gênico entre sub-populações, informar sobre suas migrações e ancestralidade, por exemplo (HEDRICK, 2005).

Os crisopídeos têm sido indicados para uso em programas de controle biológico. A espécie *C. externa*, devido à facilidade de sua criação, é a mais estudada para multiplicação massal. Entretanto, pouco se sabe sobre a resposta das populações quando liberadas em ambientes diferentes, visto que estas podem não sobreviver em

áreas com características biogeográficas distintas, inviabilizando o seu papel como agente de controle de pragas.

Populações de *C. externa* podem ser liberadas de forma massal para o controle de pragas. Todavia, com a análise da divergência genética entre as populações e sua distribuição espacial haplotípica será possível estabelecer a liberação de populações específicas para as localidades onde são geneticamente compatíveis.

Desta forma, o presente trabalho tem como objetivos:

- Caracterizar geneticamente as populações de *C. externa* nos municípios de Brotas (SP), Jaboticabal (SP), Rifaina (SP), São Carlos (SP), São José dos Campos (SP) e São Sebastião do Paraíso (MG);
- Estabelecer as alterações nos genes estudados;
- Verificar a diversidade haplotípica nas populações dessas localidades;
- Determinar a estrutura genética dessas populações;
- Estabelecer a distância genética entre as populações;
- Associar a ocorrência dos haplótipos com as localidades amostradas.

2. REVISÃO DE LITERATURA

A espécie *C. externa* pode ser criada massalmente e estudos revelam também a sua grande capacidade de predação, como por exemplo, o consumo de cerca de 313 pulgões *Schizaphis graminum* (Rondani, 1852) (Hemiptera: Aphididae) (FONSECA et al. 2000), 567 ovos de *Diatraea saccharalis* (Fabricius, 1794), 930 ovos de *Sitotroga cerealella* (Olivier, 1819) e 1.553 ovos de *Anagasta kuehniella* (Zeller, 1879), aproximadamente, ao longo de seu período larval (BORTOLI et al. 2006).

Outros estudos revelam que esta espécie é capaz de concluir seu ciclo biológico, ou seja, sobreviver em ambientes com temperatura variando entre 15 e 30° C (CROUZEL & BOTTO, 1976/77; NUÑEZ, 1988; ALBUQUERQUE et al. 1994; FIGUEIRA et al. 2000;).

Apesar da grande capacidade predatória, alto potencial reprodutivo, vasta distribuição geográfica e alta plasticidade ecológica, poucos são os estudos populacionais com *C. externa* (FREITAS, 2001; BEZERRA et al. 2006; WINTERTON & FREITAS, 2006).

Até recentemente, a similaridade ou dissimilaridade de dados fenotípicos a partir da morfologia, fisiologia e comportamento foram utilizados para separar ou fazer inferências ecológicas a respeito de populações. Entretanto, é possível realizar tal estudo com maior exatidão utilizando-se ferramentas moleculares.

Com o advento da biologia molecular tornou-se possível analisar o genótipo de indivíduos e responder questões acerca da filogenia, evolução, ecologia e dinâmica populacional com maior confiabilidade (HOY, 1994). As técnicas moleculares permitem o estudo da estrutura populacional, por meio da variação geográfica, sistemas de acasalamento e heterozigosidade. Além disso, dados moleculares fornecem informações genéticas hereditárias que podem explicar dados fenotípicos (BAVERSTOCK & MORITZ, 1996).

As populações de insetos podem se constituir em unidades reprodutivas ou subpopulações constituídas de diferentes unidades reprodutivas ou podem ser populações contínuas, mas os indivíduos reproduzem-se apenas com aqueles geograficamente próximos; os três diferentes modelos de estrutura populacional resultam em diferentes modelos de diferenciação genética dentro e entre locais geográficos (BAVERSTOCK & MORITZ, 1996).

A utilização de marcadores moleculares para estudos de populações de insetos tem sido vastamente explorada e utilizada por muitos pesquisadores, o que mostra e garante sua eficiência para diferentes ordens de insetos, tais como Hemiptera, Hymenoptera, Diptera e Neuroptera (MONTEIRO et al. 1999; BRITO et al. 2002; OLIVEIRA et al. 2002; WINTERTON & FREITAS, 2006).

Dentre os marcadores moleculares utilizados estão os genes mitocondriais. Estes genes fazem parte do DNAm_t, que em geral, é composto pelas seguintes regiões codificadoras: ND2, COI, CO2, ATP, C3, N3, ND5, ND4, ND6, Cyt b, ND1, 16S, 12S e regiões A+T, como verificado na espécie *Drosophila yakuba* (Burla, 1954) (LOXDALE &

LUSHAI, 1998). Assim sendo, a análise destes genes, especialmente COI e 16S, foi realizada em estudos populacionais para vários grupos de insetos.

A filogenia molecular dos crisopídeos (Neuroptera, Chrysopidae) foi realizada à partir de três genes, sendo dois deles mitocondriais, o 16S, com um total de 530 pares de bases, e o gene COI, com 820 pb . Esta foi a primeira tentativa de uso da ferramenta molecular para o estabelecimento da filogenia desta família (WINTERTON & FREITAS, 2006).

O taxon *Chrysoperla carnea* (Stephens, 1836) também foi estudado por meio dos genes mitocondriais COI, COII, 16S e Cyt b. Para os genes COI e 16S foram obtidos 575pb e 475pb, respectivamente. Além disso, com a análise dos fragmentos de todos os genes foi possível constatar que esta espécie é bem definida, quando comparada com outras espécies do grupo (LOURENÇO et al. 2006).

Dois populações de *Spodoptera frugiperda* (Smith, 1797) encontradas nos cultivos de milho e arroz, indistinguíveis morfologicamente, puderam ser segregadas a partir da análise de 569pb do gene mitocondrial COI (LEVY et al. 2002).

Um estudo realizado por AUSTIN et al. (2004) com *Reticulitermes* (Isoptera) utilizou o gene mitocondrial 16S. Um total de 428pb foi amplificado para várias espécies deste gênero, oriundas de diferentes regiões geográficas. Por meio da análise da variação genética deste gene foi possível concluir que eram necessárias amostras de zonas geográficas maiores, ou que o número de amostras seqüenciadas deveria ser maior, ou ainda, que a falta de continuidade espacial deste gênero pode ser atribuída a origens antropogênicas.

Segundo a literatura, não há número definido de amostras para estudos populacionais de insetos. LOPES-DA-SILVA & VIEIRA (2007) utilizaram entre um e três indivíduos de *Metopolophium dirhodum* (Walker, 1849) (Hemiptera) por localidade para analisar a diversidade genética dessas populações. Já PEREIRA et al. (2009) usaram entre uma e sete amostras de *Melipona quinquefasciata* (Lepeletier, 1836) (Hymenoptera) por localidade do nordeste do Brasil para o estudo da variabilidade genética da espécie.

Assim sendo, para realizar a análise de genes mitocondriais, vários parâmetros podem ser utilizados. Pode-se citar o estudo da variabilidade genética de *Anopheles*

albimanus (Wiedemann, 1820), comparando população de laboratório com a de campo, em que alguns parâmetros de polimorfismo de DNA foram utilizados (ARIAS et al. 2005). Dentre eles destacam-se o número de sítios polimórficos, a diversidade haplotípica, a diversidade nucleotídica usando a correção de JUKES & CANTOR (1969), a média do número de diferenças nucleotídicas e o teste de neutralidade de TAJIMA (1989).

A quantidade de polimorfismo de DNA pode ser determinada por vários fatores, como por exemplo, mutação, seleção natural, tamanho populacional, estrutura da população, migração, deriva genética, dentre outros (TAJIMA, 1993).

Os sítios polimórficos correspondem àqueles que apresentam qualquer tipo de variação, como substituição, inserção ou deleção de bases. Já a diversidade haplotípica refere-se ao percentual de haplótipos encontrados em uma dada população.

Deve-se ressaltar que um haplótipo pode ser definido como a forma única de um gene que se difere de outro haplótipo em pelo menos uma base nucleotídica (AUSTIN et al. 2004).

A correção de JUKES & CANTOR (1969) para a diversidade nucleotídica é normalmente utilizada, porque permite a múltipla substituição por sítio e também assume que a taxa de substituição nucleotídica é idêntica para os quatro nucleotídeos A, C, T e G.

Já o teste de TAJIMA (1989) deve ser utilizado para testar a teoria da neutralidade, em que as mutações ocorrem aleatoriamente. Neste teste são usados o número de sítios segregantes e a média do número de diferenças nucleotídicas. Caso o resultado do mesmo seja significativo e negativo, provavelmente se trata da seleção de purificação, ou recente expansão populacional, ou subdivisão da população. Por outro lado caso o teste seja significativo e positivo, possivelmente houve pressão de seleção sobre a população, ou recente redução da população, ou ainda a subdivisão populacional.

Há também o teste de neutralidade proposto por FU & LI (1993), que se baseia nas diferenças entre o número de “singletons” e o número total de mutações. Este teste foi utilizado em estudos de genes mitocondriais, como para a espécie *Drosophila*

simulans (Sturtevant, 1919) (BALLARD et al. 2002) e para a formiga *Solenopsis invicta* (Buren, 1972) (AHRENS, 2005).

Além dos polimorfismos de DNA, é possível estimar a distância genética existente entre populações de insetos. Para tanto, normalmente utiliza-se o método Kimura-2-parâmetros, o qual leva em conta diferentes taxas de substituição entre transições e transverções, em que a razão transição-transverção é estimada à partir dos dados (KIMURA, 1980). Seus valores variam entre 0 e 1, visto que quanto mais próximos de 1, mais distante geneticamente são as populações analisadas.

Também é importante estimar a taxa nucleotídica das sequências dos genes analisados, uma vez que em geral, o grupo dos insetos é caracterizado por altas taxas de adenina e timina em seu DNA mitocondrial quando comparado com o DNAm de vertebrados (ZHANG & HEWITT, 1997).

Além disso, a análise das taxas de transição e transversão é essencial, pois transições (pirimidina por pirimidina ou purina por purina) geralmente resultam em substituições sinônimas, ou seja, o mesmo aminoácido é formado. Já as transversões (pirimidina por purina ou vice-versa) em muitos casos resultam em substituições não-sinônimas, levando a formação de um aminoácido diferente (HEDRICK, 2005). Deve-se lembrar que o segundo evento é vinte vezes mais raro do que o primeiro para o DNAm humano (BANDELT et al. 1999).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Localidades amostradas

A coleta dos adultos de *C. externa* foi realizada com a utilização de rede entomológica. Logo após, os indivíduos foram colocados em tubos plásticos contendo álcool absoluto e armazenados em freezer a -20° C. O estudo da genitália dos adultos foi realizado para a identificação da espécie.

Foram amostradas seis localidades, conforme listado a seguir:

- Brotas (SP) – pastagem e plantação de eucalipto;

- Jaboticabal (SP) – ambiente misto (diferentes cultivos, mata ciliar, pastagem e vestígios de mata nativa);
- Rifaina (SP) – bordadura de mata;
- São Carlos (SP) – pastagem;
- São José dos Campos (SP) – ambiente urbano;
- São Sebastião do Paraíso (MG) – pomar de figo.

O número de indivíduos amostrados, a data de coleta e a identificação por localidade amostrada constam na Tabela 1.

Tabela 1. Locais, data de coleta, número de identificação dos indivíduos, número de adultos (n) de *C. externa* que foram utilizados para a extração dos genes mitocondriais 16S e COI.

Locais de coleta	Gene COI			Gene 16S		
	Data coleta	Número identificação	n	Data coleta	Número identificação	n
Brotas	15/XII/2007	722	04	15/XII/2007	722	04
	15/XII/2007	723		15/XII/2007	723	
	15/XII/2007	724		15/XII/2007	724	
	15/XII/2007	725		15/XII/2007	725	
Jaboticabal	08/VIII/2007	006	05	11/IX/2007	151	04
	08/VIII/2007	008		11/IX/2007	152	
	28/IX/2007	010		11/IX/2007	153	
	11/III/2008	012		14/X/2006	154	
	26/IX/2007	015				
Rifaina	30/V/2008	394	03	30/V/2008	728	03
	30/V/2008	729		30/V/2008	729	
	30/V/2008	730		30/V/2008	730	
São Carlos	27/VII/2007	733	03	27/VII/2007	733	04
	27/VII/2007	734		27/VII/2007	734	
	27/VII/2007	735		27/VII/2007	735	
				27/VII/2007	736	
São José dos Campos	25/IV/2008	726	02	25/IV/2008	726	02
	II/2008	727		II/2008	727	
São Sebastião do Paraíso	27/VII/2007	668	04	27/VII/2007	668	04
	27/VII/2007	669		27/VII/2007	669	
	27/VII/2007	670		27/VII/2007	670	
	27/VII/2007	671		27/VII/2007	671	
Total			21			21

3.2. Metodologia

A extração, amplificação e purificação do DNA foram realizadas no laboratório de Biossistemática de Crisopídeos da UNESP – Campus de Jaboticabal.

Primeiramente, foi feita a separação do tórax dos adultos de *C. externa*. O restante do corpo do inseto foi conservado em tubos criogênicos (voucher) contendo álcool absoluto, com a devida identificação.

A partir do tórax, identificado com o mesmo número do voucher, foi feita a extração do DNA mitocondrial, utilizando o kit “Wizard Genomic Purification” (Promega).

O isolamento do DNA de interesse foi realizado através da reação em cadeia da polimerase (PCR) (MULLIS & FALOONA, 1987). Os marcadores moleculares utilizados foram o gene da subunidade I (COI) da Citocromo Oxidase mitocondrial e o gene 16S, também mitocondrial. Os oligonucleotídeos utilizados para amplificar e sequenciar estes fragmentos foram: C1-J-2183 e TL2-N-3014; LR-J-12887, SR-N-13398b, respectivamente (SIMON et al. 1994). Suas sequências estão contidas na Tabela 2, sendo os números dos nomes dos oligonucleotídeos correspondentes à posição das bases no genoma do DNA mitocondrial.

As condições da PCR foram: 1 passo de 5’ a 95° C, e 33 ciclos de 20” a 93° C, 40” a 50° C e 2’a 72° C.

Tabela 2. Sequências dos oligonucleotídeos (SIMON et al. 1994) utilizados para a amplificação por PCR e sequenciamento da subunidade I (COI) da Citocromo Oxidase mitocondrial e 16S dos indivíduos de *Chrysoperla externa*.

Oligonucleotídeo	Sequência
C1 – J – 2183	5’ CAACATTTATTTTGATTTTTTGG 3’
TL2 –N -3014	5’ TCCATTGCACTAATCTGCCATATTA 3’
LR-J-12887	5’ CCGGTTTGAACCTCAGATCATGT 3’
SR-N-13398b	5’ CRCYTGTTTAWCAAAAACAT 3’

Misturou-se 3µl de cada amostra contendo o gene de interesse com 1 µl da solução Dye e submetidos à eletroforese em gel de agarose 1%, uma vez que os genes amplificados situam-se entre 0,5 a 1 kpb (KAMOUN, 2006). Utilizou-se também o marcador de 1,0 kb. A corrente foi de 60 volts e o tempo de corrida foi de 30 minutos.

Ao final da eletroforese, o gel foi corado com brometo de etídio (0,5 µg/ml). As soluções contendo os genes amplificados restantes foram armazenadas em freezer, em tubos criogênicos, numerados e identificados.

Depois de corado, o gel foi fotodocumentado e as fotos devidamente numeradas e identificadas. Após a verificação em gel de agarose, todos os produtos finais da PCR foram então purificados utilizando o kit “Wizard® Clean-up” (Promega).

Após a extração, amplificação, purificação e fotodocumentação dos genes COI e 16S, os mesmos foram seqüenciados.

3.3. Análise dos resultados

As sequências de DNA obtidas a partir do sequenciamento foram lidas pelo programa Chromas Lite 2.01 (TECNELYSIUM PTY LTD. 2007) e alinhadas pelo programa BioEdit 7.0 (HALL, 1999) com conferência manual das mesmas.

A análise descritiva das sequências de DNA das populações de *C. externa* foi realizada utilizando-se o programa DnaSP 4.90 (ROZAS et al. 2003) e a distância genética entre populações foi feita com o MEGA 4.0 (TAMURA et al. 2007) pelo método Kimura-2-parâmetros. A estrutura populacional foi estudada pelos programas TCS 1.21 (CLEMENT et al. 2000) e “Network” 4.0 (BANDELT et al. 1999).

Na rede haplotípica gerada pelo programa TCS 1.21 (CLEMENT et al. 2000) o tamanho de cada agrupamento refere-se à frequência dos haplótipos, os números representam cada agrupamento e o agrupamento de formato quadrado indica o haplótipo ancestral.

Para a rede haplotípica obtida à partir do programa “Network” 4.0 (BANDELT et al. 1999) cada nóculo representa a frequência haplotípica e o preenchimento, as diferentes localidades. Os números sublinhados mostram o loci da sequência nucleotídica onde ocorreu a mutação que levou à segregação do haplótipo.

Os dados referentes às distâncias entre as localidades das populações de *C. externa* foram obtidos utilizando o site www.tutempo.net.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A partir das sequências de DNA alinhadas das populações de *C. externa* foi possível obter o total de 528 pares de bases e 779pb para os genes 16S e COI, respectivamente (Apêndices A e B). A composição nucleotídica não variou nos dois genes.

O gene COI apresentou 42,4% de timina, 13,5% de citosina, 29,5% de adenina e 14,6% de guanina. Já o gene 16S teve taxas de 34,8% de timina, 16,5% de citosina, 38,6% de adenina e 10,1% de guanina. Esta maior proporção de timina e adenina também foi encontrada para o DNAmT de outros insetos, conforme afirmado por ZHANG & HEWITT (1997).

Foram observadas mutações nas sequências de bases. Dentre as sequências gênicas do gene COI, apenas o sítio 144 apresentou transversão (0,13%) e cinco sítios tiveram transições de bases (0,64%), levando a uma porcentagem total de 0,77% de sítios variáveis (Tabela 3). Nas sequências nucleotídicas do gene 16S foram observadas uma transversão no sítio 290 (0,19%) e três transições (0,57%) em todos os sítios analisados (Tabela 4). Isto quer dizer que 0,76% dos sítios foram segregantes.

Diante destes dados pode-se observar uma constância na porcentagem de sítios variáveis em ambos os genes. Isto ocorreu pelo fato de as substituições de bases terem permanecido proporcionais nos dois genes mitocondriais. Todavia, a quantidade de mutações encontradas foi muito baixa, correspondendo a menos de 1% dos sítios estudados, evidenciando que provavelmente os genes estudados sejam conservados dentro das populações de *C. externa*.

Foram constatadas duas “indels” nas sequências do gene 16S, localizados nos sítios 204 e 205 (Tabela 4). Este fenômeno pôde ser verificado em um estudo com caranguejo, em que três “indels” foram encontradas em um total de 379pb do gene 16S (WEINBERG et al. 2003). Este fenômeno é de suma importância, uma vez que ocorre com menor incidência (BANDELT et al. 1999), podendo ser um dos fatores segregantes populacionais.

Analisando os sítios variáveis encontrados nas sequências de DNA do gene COI é possível identificar que a transversão no sítio 144 permanece em todas as localidades amostradas (Tabela 3). Essa transversão foi observada em duas das sequências de Jaboticabal, três das de Brotas, duas das de São José dos Campos, uma das de São Sebastião do Paraíso, duas das de Rifaina e nas três de São Carlos (Tabela 3). Também foram observadas diferentes taxas de transição.

As sequências dos indivíduos de *C. externa* da população de Jaboticabal apresentaram dois sítios variáveis e apenas uma transição no sítio 216. O mesmo não foi encontrado em Brotas, cujas sequências tiveram quatro sítios variáveis, sendo que três correspondiam a transições nos sítios 216, 270 e 701 (Tabela 3).

São José dos Campos e em São Carlos apresentaram indivíduos de *C. externa* com sequências de DNA variando em apenas um sítio (Tabela 3).

As sequências de DNA de indivíduos de *C. externa* da população de São Sebastião do Paraíso tiveram mutações em três sítios de suas sequências de bases, sendo que foram identificadas transições nos sítios 216 e 688. Já nas sequências de DNA da população de Rifaina foram observadas duas mutações, sendo que no sítio 648 houve uma transição de base (Tabela 3).

Foram encontradas também mutações pontuais nos sítios 270, em Brotas, 648, em Rifaina, 688, em São Sebastião do Paraíso; e 701, em Brotas (Tabela 3).

Tabela 3. Número das sequências de DNA amplificadas e os sítios variáveis encontrados no gene COI de populações de *C. externa* de diferentes localidades.

Número sequência	Localidades	Sítios variáveis					
		144	216	270	648	688	701
006		C	G	T	A	G	C
008	
010	Jaboticabal	A
012		A
015		.	A
722		A	A
723	Brotas	A
724		.	.	C	.	.	.
725		A	T
726	São José dos Campos	A
727		A
668		A	.
669	São Sebastião do	A
670	Paraíso
671		.	A
394		A
729	Rifaina	.	.	.	G	.	.
730		A
733		A
734	São Carlos	A
735		A

* Cada ponto simboliza a mesma base nitrogenada da primeira sequência (sequência modelo).

Para as sequências de DNA analisadas do gene 16S pode-se afirmar que o sítio 290 apresentou uma transversão (Tabela 4). Porém, diferentes taxas de transições e “indels” podem ser encontradas nas sequências gênicas de indivíduos de *C. externa* de populações de diferentes localidades.

Nas sequências nucleotídicas dos indivíduos da população de Jaboticabal observou-se uma “indel” no sítio 205 em três de suas sequências (Tabela 4). Já nas de Brotas foi possível verificar uma transição no sítio 203 e duas “indels” nos sítios 204 e 205 (Tabela 4).

Por meio da análise das bases nucleotídicas das sequências dos indivíduos das populações de *C. externa* de São José dos Campos e São Carlos observou-se uma “indel” no sítio 205 (Tabela 4). Foi possível também verificar que as duas populações não apresentaram diferenças em suas sequências gênicas.

As sequências de DNA da população de *C. externa* de São Sebastião do Paraíso apresentaram duas “indels” nos sítios 204 e 205 e duas transições nos sítios 162 e 209 (Tabela 4). Já as de Rifaina também apresentam uma “indel” no sítio 205 e vale ressaltar que uma de suas sequências compartilha a mesma mutação com uma sequência de São Sebastião do Paraíso no sítio 162 (Tabela 4).

O compartilhamento de tal mutação pode ocorrer, devido ao fato desses dois municípios serem próximos geograficamente favorecendo a migração de adultos e, conseqüentemente, o fluxo gênico entre suas populações de *C. externa* (Tabela 11).

Tabela 4. Número das sequências de DNA amplificadas e os sítios variáveis encontrados no gene 16S de populações de *C. externa* de diferentes localidades.

Número sequência	Localidades	Sítios variáveis					
		162	203	204	205	209	290
151	Jaboticabal	C	A	-	-	A	T
152		.	.	-	A	.	A
153		.	.	-	A	.	A
154		.	.	-	A	.	A
722	Brotas	.	G	-	A	.	A
723		.	.	-	-	.	A
724		.	.	T	A	.	A
725		.	.	-	A	.	A
726	São José dos Campos	.	.	-	-	.	A
727		.	.	-	A	.	A
668	São Sebastião do Paraíso	.	.	T	A	.	A
669		.	.	T	A	G	A
670		T	.	-	-	.	A
671		.	.	-	-	.	A
394	Rifaina	.	.	-	A	.	A
729		T	.	-	-	.	A
730		.	.	-	A	.	A
733	São Carlos	.	.	-	A	.	A
734		.	.	-	A	.	A
735		.	.	-	A	.	A
736		.	.	-	-	.	A

* Cada ponto simboliza a mesma base nitrogenada da primeira sequência (sequência modelo) e cada traço representa a inserção/deleção de uma base nitrogenada.

4.1. Diversidade haplotípica de *C. externa*

4.1.1. Gene COI

Não foi possível realizar os testes de neutralidade para localidades com o número de sequências inferior a quatro. Observa-se que para todas as sequências de DNA dos indivíduos das populações de *C. externa* analisadas os testes de neutralidade não foram significativos (Tabela 5). Isto mostra que provavelmente as mutações encontradas nestas sequências não ocorreram em função de uma pressão seletiva, mas sim ao acaso, se encaixando no modelo de neutralidade (TAJIMA, 1989).

As sequências gênicas da população de *C. externa* de Jaboticabal analisadas em conjunto apresentaram alta diversidade haplotípica (80%), tendo em vista que a partir das cinco sequências amostradas foram encontrados três haplótipos. Entretanto, seu número médio de diferenças nucleotídicas foi relativamente baixo (1,000), quando comparado com Brotas, Rifaina e São Sebastião do Paraíso (Tabela 5).

As sequências nucleotídicas das populações de *C. externa* de São Carlos e São José dos Campos não apresentaram polimorfismos, sendo representados por apenas um haplótipo em cada localidade, que pode ser em função do baixo número de indivíduos amostrados (Tabela 5).

Brotas e São Sebastião do Paraíso obtiveram os maiores valores de diversidade haplotípica (100%) em suas sequências de DNA analisadas de indivíduos de *C. externa*. A primeira população de *C. externa* mostrou sequências gênicas com quatro sítios polimórficos em quatro indivíduos amostrados e, como consequência, teve quatro haplótipos e as maiores diversidade nucleotídica (0,00257) e diferenças nucleotídicas (2,000). Na segunda população de *C. externa*, por sua vez, ocorreram três mutações em quatro de suas sequências nucleotídicas, levando a quatro haplótipos, além da alta diversidade nucleotídica (0,00193) (Tabela 5).

Por meio da análise das sequências de DNA da população de *C. externa* Rifaina foi possível observar valores intermediários de diversidade haplotípica (67%) e nucleotídica (0,00171). Nestas sequências houve duas mutações em três indivíduos amostrados, levando a dois haplótipos (Tabela 5).

Analisando-se todas as sequências de DNA de *C. externa* de todas as localidades amostradas conjuntamente, foi possível verificar a presença de oito

haplótipos em vinte e uma sequências amostradas, sendo que ocorreram seis sítios polimórficos e seis mutações. Além disso, a diversidade haplotípica foi aproximadamente 70% (Tabela 5).

Tabela 5. Dados descritivos referentes aos polimorfismos das sequências de DNAm_t do gene COI de populações de *C. externa* de diferentes localidades.

Localidades	N ¹	Variáveis								
		S	Eta	h	Hd	Pi	Pi(JC)	k	D	F*
Jaboticabal	5	2	2	3	0,800	0,00128	0,00129	1,000	0,24314	0,23860
Brotas	4	4	4	4	1,000	0,00257	0,00257	2,000	-0,78012	-0,72052
Rifaina	3	2	2	2	0,667	0,00171	0,00171	1,333	-----	-----
São Carlos	3	0	0	1	0,000	0,00000	0,00000	0,000	-----	-----
São José dos Campos	2	0	0	1	0,000	0,00000	0,00000	0,000	-----	-----
São Sebastião do Paraíso	4	3	3	4	1,000	0,00193	0,00193	1,500	-0,75445	-0,67466
Total	21	6	6	8	0,719	0,00145	0,00146	1,133	-1,00646	-1,65370

¹N - número de sequências amostradas; S - número de sítios polimórficos; Eta - número total de mutações; h - número de haplótipos; Hd - diversidade haplotípica; Pi - diversidade nucleotídica; Pi (JC) - diversidade nucleotídica com a correção de Jukes e Cantor; k - número médio de diferenças nucleotídicas; D - teste de neutralidade de Tajima, significativo quando $p < 0,10$; F* - teste de neutralidade de Fu e Li, significativo quando $p < 0,10$.

4.1.2. Gene 16S

Assim como ocorreu para o gene COI, nenhuma das sequências do gene 16S dos indivíduos das populações de *C. externa*, submetidas aos testes de neutralidade apresentou diferenças estatísticas significantes. Além disso, localidades com o número de amostras inferior a quatro não foram analisadas neste quesito (Tabela 6).

As sequências gênicas dos indivíduos das populações de *C. externa* de São José dos Campos e São Carlos não apresentaram mutações em suas sequências, formando apenas um haplótipo. Deve-se lembrar que para este gene houve o acréscimo de um indivíduo amostrado na localidade de São Carlos (Tabela 6).

O maior número de haplótipos foi encontrado entre as sequências de DNA da população de *C. externa* de São Sebastião do Paraíso, uma vez que das quatro sequências analisadas, três foram haplótipos distintos, oriundos de duas mutações. Além disso, foram encontradas duas “indels” e a maior diversidade haplotípica (88%) (Tabela 6).

Tanto Brotas quanto Jaboticabal apresentaram sequências nucleotídicas de suas populações de *C. externa* com resultados semelhantes, ao contrário do gene COI. Foram encontrados dois haplótipos em quatro sequências amostradas, em cada uma dessas localidades. O número de mutações e sítios polimórficos foi igual a um. A diversidade haplotípica foi de 50%. Todavia, as sequências nucleotídicas da população de *C. externa* de Brotas apresentaram duas “indels”, ao passo que as de Jaboticabal tiveram uma (Tabela 6).

Dois haplótipos foram identificados entre as sequências de DNA dos crisopídeos de Rifaina em um total de três sequências. O número de mutações “indels” foi igual a um. O valor da diversidade haplotípica, bem como da diversidade nucleotídica foi 0,667 (Tabela 6).

Analisando todas as sequências de DNA do gene 16S das populações de *C. externa* em conjunto foi possível observar que em vinte e uma sequências houve quatro sítios polimórficos, quatro mutações, cinco haplótipos e duas “indels”. A diversidade haplotípica e a diversidade nucleotídica, quando comparadas com o gene COI, foram relativamente baixas (Tabela 6).

Como em ambos os genes, COI e 16S os testes de neutralidade foram similares é possível reafirmar a hipótese de que todas as populações estudadas provavelmente sofreram mutações em razão de processos randômicos e que os genes não estão sobre pressão seletiva.

Tabela 6. Dados descritivos referentes aos polimorfismos das sequências de DNAMt do gene 16S de populações de *C. externa* de diferentes localidades.

Localidades	Variáveis										
	N ¹	S	Eta	h	Hd	Pi	Pi(JC)	k	D	F*	I
Jaboticabal	4	1	1	2	0,500	0,00095	0,00095	0,500	-0,61237	-0,47871	1
Brotas	4	1	1	2	0,500	0,00095	0,00095	0,500	-0,61237	-0,47871	2
Rifaina	3	1	1	2	0,667	0,00127	0,00127	0,667	-----	-----	1
São Carlos	4	0	0	1	0,000	0,00000	0,00000	0,000	-----	-----	1
São José dos Campos	2	0	0	1	0,000	0,00000	0,00000	0,000	-----	-----	1
São Sebastião do Paraíso	4	2	2	3	0,883	0,00190	0,00190	1,000	-0,70990	-0,60427	2
Total	21	4	4	5	0,424	0,00089	0,00089	0,467	-1,65358	-1,97003	2

¹N - número de sequências amostradas; S - número de sítios polimórficos; Eta - número total de mutações; h - número de haplótipos; Hd - diversidade haplotípica; Pi - diversidade nucleotídica; Pi (JC) - diversidade nucleotídica com a correção de Jukes e Cantor; k - número médio de diferenças nucleotídicas; D - teste de neutralidade de Tajima, significativo quando $p < 0,10$; F* - teste de neutralidade de Fu e Li, significativo quando $p < 0,10$; I - número total de eventos de inserção/deleção de bases analisados

4.2. Estrutura genética de *C. externa*

4.2.1. Gene COI

A distância genética entre as sequências de DNA de populações de *C. externa* variou dentro de cada localidade. Todavia, a distância encontrada não foi significativa, uma vez que valores próximos a zero indicam baixa divergência genética e vice-versa (Tabela 7).

A distância encontrada entre as sequências de nucleotídeos da população de Jaboticabal foi muito baixa (0,001), chegando a ser aproximadamente zero. Já para as de Brotas, a distância encontrada foi a maior (0,003), mas mesmo assim também correspondeu a um valor muito próximo de zero (Tabela 7).

Para as sequências de DNA das populações de São José dos Campos e São Carlos a distância genética foi igual a zero (Tabela 7), indicando que os indivíduos analisados em cada um desses municípios eram geneticamente iguais.

Em São Sebastião do Paraíso e em Rifaina foram encontradas sequências de DNA de indivíduos de *C. externa* com uma distância genética de 0,002 (Tabela 7).

A média geral da distância genética em todas as sequências analisadas foi 0,001, o que mostra a baixa divergência genética encontrada entre essas populações de *C. externa*.

Tabela 7. Distância genética entre as sequências nucleotídicas do gene COI de populações de *C. externa* dentro de cada localidade.

Localidades	Distância genética(d)
Jaboticabal	0,001
Brotas	0,003
São José dos Campos	0,000
São Sebastião do Paraíso	0,002
Rifaina	0,002
São Carlos	0,000

Além disso, não houve diferença genética entre as sequências de DNA das populações dos municípios de São José dos Campos e São Carlos (Tabela 8). Isso mostra que essas populações podem ser geneticamente iguais. Já as de Brotas apresentaram distância genética baixa quando comparada com as sequências de DNA dessas duas outras populações (0,001) (Tabela 8).

As sequências de DNA da população de *C. externa* de Brotas foram 0,002 distantes geneticamente das de São Sebastião do Paraíso, Rifaina e Jaboticabal. Já as de Jaboticabal apresentaram uma distância genética de 0,001 das sequências de DNA de *C. externa* de todas as outras populações, com exceção às de Brotas (0,002) (Tabela 8).

Quanto às sequências de nucleotídeos da população de *C. externa* de São José dos Campos pode-se dizer que foram distantes geneticamente 0,002 e 0,001 das de São Sebastião do Paraíso e Rifaina, respectivamente (Tabela 8).

A população de *C. externa* de São Sebastião do Paraíso apresentou sequências de DNA do gene COI com uma distância genética de 0,002 em comparação as de Rifaina e São Carlos (Tabela 8). Assim sendo, a população de *C. externa* de Rifaina teve sequências de DNA deste mesmo gene que divergiram geneticamente em 0,001 com as de São Carlos (Tabela 8).

Apesar de existir divergência genética entre as populações amostradas, as distâncias encontradas não foram significativas, uma vez que se aproximaram de zero. Diante disso, é possível inferir que todas essas populações de *C. externa* podem ser geneticamente compatíveis.

Tabela 8. Distância genética entre as sequências nucleotídicas do gene COI de populações de *C. externa* de diferentes localidades.

	1*	2	3	4	5	6
1						
2	0,002					
3	0,001	0,001				
4	0,001	0,002	0,002			
5	0,001	0,002	0,001	0,002		
6	0,001	0,001	0,000	0,002	0,001	

* 1- Jaboticabal, 2- Brotas, 3- São José dos Campos, 4- São Sebastião do Paraíso, 5- Rifaina, 6- São Carlos.

Quanto à estrutura genética entre as populações de *C. externa*, pode-se inferir que as mesmas não apresentam estrutura definida, pois a ausência de nós nas ramificações da rede haplotípica demonstra que não houve passos evolutivos segregando os haplótipos ramificados (Figura 1). Além disso, vários haplótipos são compartilhados em localidades distintas, não havendo um padrão de distribuição. Ou seja, há a diferenciação haplotípica dos indivíduos, entretanto, provavelmente, caracteriza-se uma mesma população.

O agrupamento enumerado 006 é composto por três sequências gênicas de indivíduos de *C. externa*, que são o mesmo haplótipo. Dentre elas, duas são da população de Jaboticabal (006 e 008) e uma da população de *C. externa* de São Sebastião do Paraíso (670). Essas três sequências representam o haplótipo ancestral, uma vez que o formato do agrupamento é quadrado e também pelo fato de ser a origem das ramificações (Figura 1).

A maior frequência haplotípica pôde ser observada no agrupamento 010, o qual apresenta o maior tamanho. Neste, que se ramificou a partir do agrupamento 006, encontraram-se duas sequências nucleotídicas da população de *C. externa* de Jaboticabal (010, 012), uma sequência de Brotas (723), as duas sequências de São José dos Campos (726, 727), uma sequência de São Sebastião do Paraíso (669), duas sequências de Rifaina (394, 730) e as três sequências de São Carlos (733, 734, 735) (Figura 1). Assim sendo, este haplótipo foi encontrado em todas as localidades amostradas e correspondeu a onze das vinte e uma sequências de DNA amplificadas do gene COI.

Os agrupamentos 729, 724, 668 e 015 também se derivaram do agrupamento ancestral 006. Os três primeiros correspondem aos haplótipos encontrados nas populações de *C. externa* de Rifaina, Brotas e São Sebastião do Paraíso, respectivamente. Entretanto, o agrupamento 015 foi formado por duas sequências gênicas, sendo uma da população de *C. externa* de Jaboticabal (015) e uma de São Sebastião do Paraíso (671) (Figura 1).

Pode-se observar também que os haplótipos mais recentes correspondem àqueles pertencentes à população de *C. externa* do município de Brotas (722, 725) (Figura 1).

Legenda:

Br – Brotas

Jab – Jaboticabal

Ri – Rifaina

Sc – São Carlos

SJC – São José dos Campos

SSP – São Sebastião do Paraíso

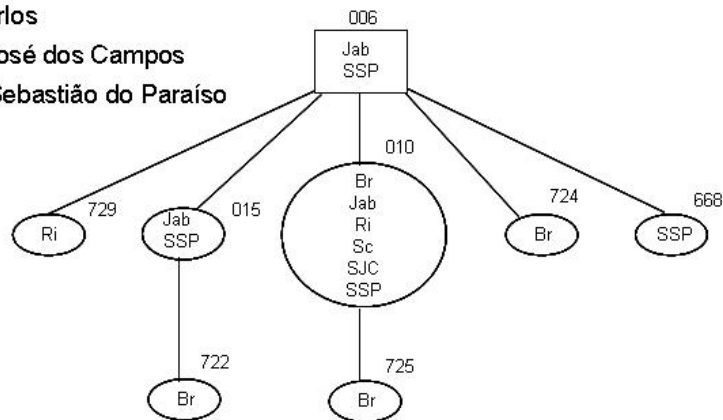


Figura 1. Rede haplotípica das sequências do gene COI de populações de *C. externa* de diferentes localidades.

Outra rede haplotípica foi gerada pelo programa “Network” 4.5 (BANDELT et al. 1999), porque com este programa foi possível variar o peso para cada tipo de evento mutacional. Por exemplo, aumenta-se o peso em três vezes para uma transversão de base, ou ainda é possível diminuir o peso de sítios hipervariáveis (BANDELT et al. 1999). Além disso, neste programa é possível discriminar cada uma das sequências de DNA amostradas em cada um dos cladogramas (Figura 2).

Apesar de todas essas ferramentas é possível observar praticamente os mesmos resultados entre ambas as redes haplotípicas (Figuras 1 e 2). A única exceção ocorreu

em um haplótipo da população de *C. externa* de Brotas (722), que no pelo programa TCS 1.21 (CLEMENT et al. 2000) deriva do agrupamento 015 (Figura 1) e na rede haplotípica derivou do agrupamento de maior frequência haplotípica (727).

Por outro lado, na rede haplotípica gerada pelo programa “Network” 4.5 (BANDELT et al. 1999) podem ser verificados quais os sítios variáveis que segregaram cada um dos haplótipos. Tais sítios estão sublinhados e podem ser observados nas ramificações.

O sítio número 216 foi o responsável pela segregação dos haplótipos 722 e 015 (Figura 2).

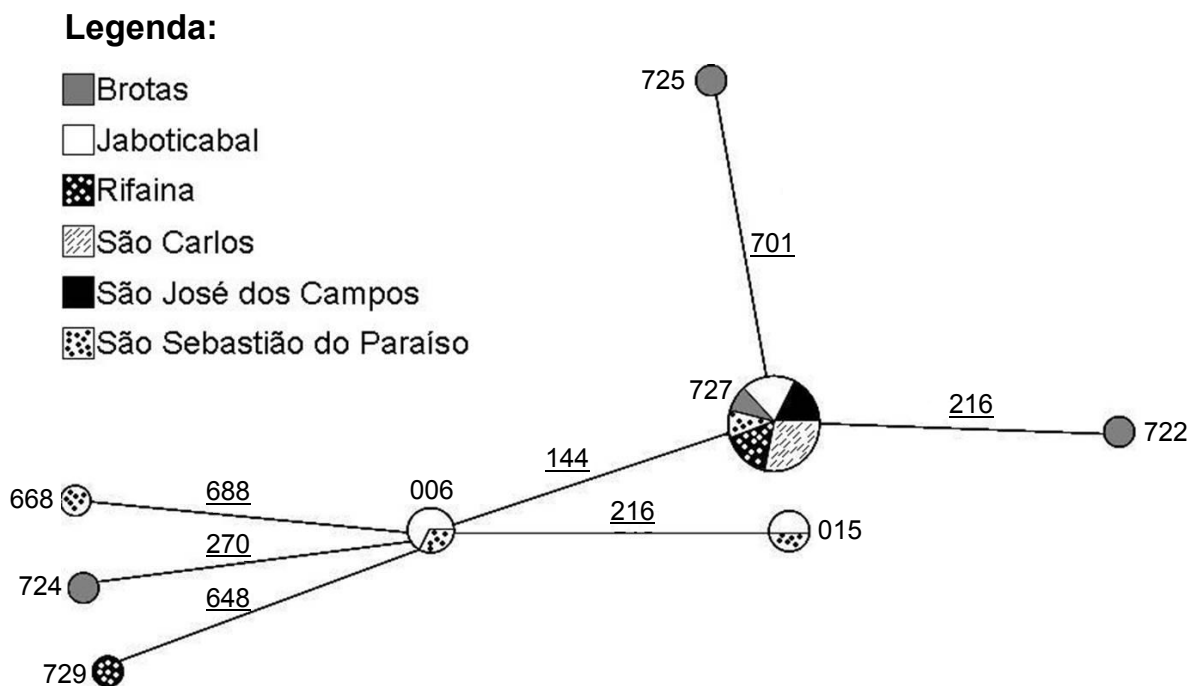


Figura 2. Rede haplotípica “Median Joining” das sequências de DNA do gene COI de populações de *C. externa* de diferentes localidades.

4.2.2. Gene 16S

Assim como para as sequências de DNA do gene COI, as distâncias genéticas entre as sequências nucleotídicas das populações de *C. externa* também foram muito baixas, se aproximando de zero.

As distâncias genéticas encontradas entre as sequências de DNA dentro de cada população de *C. externa* de cada localidade corresponderam a 0,001 para Jaboticabal, Brotas e Rifaina; 0,000 para São José dos Campos e São Carlos; e 0,002 para São Sebastião do Paraíso (Tabela 9).

Mesmo comparando todas as sequências gênicas de todas as populações de *C. externa* observa-se que o valor da distância genética equivale a 0,001. Isto indica que há baixa divergência genética dentro de cada uma dessas populações de *C. externa* analisadas, bem como entre todas elas.

Tabela 9. Distância genética entre as sequências nucleotídicas do gene 16S de populações de *C. externa* dentro de cada localidade.

Localidades	Distância genética(d)
Jaboticabal	0,001
Brotas	0,001
São José dos Campos	0,000
São Sebastião do Paraíso	0,002
Rifaina	0,001
São Carlos	0,000

Quanto à distância genética entre as sequências de DNA das populações de *C. externa* pode-se dizer que os valores variaram entre zero e 0,001 quando as populações de cada localidade foram comparadas entre si (Tabela 10). Estes dados reafirmam os observados com o gene COI, pois pelos valores próximos e/ou equivalentes a zero é possível inferir que todas essas populações são geneticamente contínuas.

Tabela 10. Distância genética entre as sequências nucleotídicas do gene 16S de populações de *C. externa* de diferentes localidades.

	1*	2	3	4	5	6
1						
2	0,001					
3	0,000	0,000				
4	0,001	0,001	0,001			
5	0,001	0,001	0,001	0,001		
6	0,000	0,000	0,000	0,001	0,001	

* 1- Jaboticabal, 2- Brotas, 3- São José dos Campos, 4- São Sebastião do Paraíso, 5- Rifaina, 6- São Carlos.

A estrutura genética do gene 16S das populações de *C. externa* foi similar à encontrada para o gene COI. Não foram encontrados nós nas ramificações da rede haplotípica, que simbolizam passos evolutivos e também não houve um padrão de distribuição dos haplótipos (Figura 3). Desta forma, pode-se reafirmar que provavelmente estas populações não apresentam uma estrutura definida.

O agrupamento 152 apresenta o haplótipo ancestral, bem como a maior frequência haplotípica. Nele foram encontradas sequências de DNA de populações de *C. externa* de diferentes localidades. Foram verificadas três sequências da população de Jaboticabal (152, 153, 154), uma de São José dos Campos (727), uma de Brotas (725), duas de Rifaina (728, 730), e três de São Carlos (733, 734, 735). O haplótipo pertencente a este agrupamento apresentou uma frequência de dez em um total de vinte e uma sequências de DNA amostradas. Além disso, ele foi compartilhado entre todas as populações, com exceção da de São Sebastião do Paraíso (Figura 3).

Já o haplótipo encontrado no agrupamento 671, derivado do ancestral, foi compartilhado entre quatro localidades: São Sebastião do Paraíso (671), São José dos Campos (726), Brotas (723) e São Carlos (736). O clado 668 também teve um haplótipo compartilhado entre as localidades de São Sebastião do Paraíso (668) e Brotas (724) (Figura 3).

Também pôde ser observado o haplótipo derivado do ancestral em Brotas (722) foi único e que os haplótipos mais recentes estão representados pelos agrupamentos 670, 151 e 669 (Figura 3).

O agrupamento 670 compartilha um haplótipo com Rifaina (729) e São Sebastião do Paraíso (670), e que o mesmo, juntamente com o haplótipo de Jaboticabal (clado 151) são derivados do agrupamento 671. Já o haplótipo de São Sebastião do Paraíso, representado pelo agrupamento 669, derivou do agrupamento 668 (Figura 3).

Legenda:

Br – Brotas

Jab – Jaboticabal

Ri – Rifaina

Sc – São Carlos

SJC – São José dos Campos

SSP – São Sebastião do Paraíso

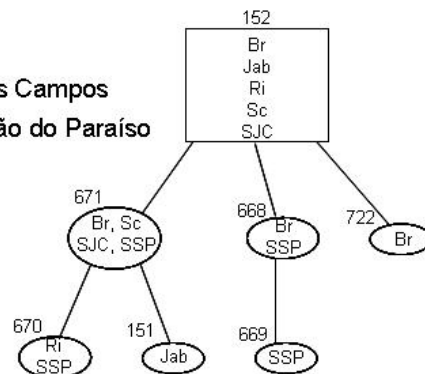


Figura 3. Rede haplotípica das sequências do gene 16S de populações de *C. externa* de diferentes localidades.

O programa “Network” 4.5 (BANDELT et al. 1999) revelou resultados semelhantes aos do TCS 1.21 (CLEMENT et al. 2000) em sua rede haplotípica. Entretanto o haplótipo ancestral foi diferente, sendo considerado o agrupamento de número 671, o qual é representado pelo haplótipo encontrado nas populações de São Sebastião do Paraíso, São Carlos, Brotas e São José dos Campos (Figura 4).

Isso pode ter ocorrido pelo fato do programa “Network” aumentar o peso de eventos mutacionais como a transversão e “indels” de bases nucleotídicas que ocorreram nas sequências do gene 16S.

Legenda:

- Brotas
- Jaboticabal
- ▣ Rifaina
- ▤ São Carlos
- São José dos Campos
- ▣ São Sebastião do Paraíso

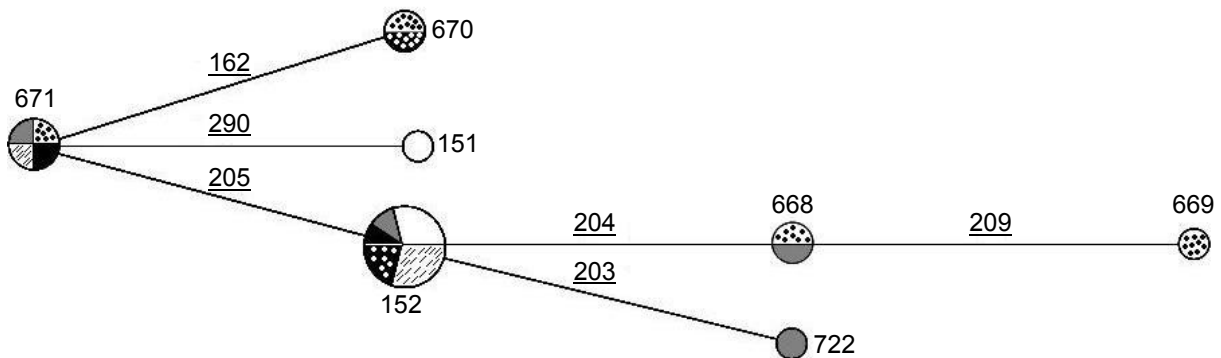


Figura 4. Rede haplotípica "Median Joining" das populações de *C. externa* de diferentes localidades para o gene 16S.

4.3. Ocupação geográfica dos haplótipos de *C. externa*

Não foi possível observar um padrão de distribuição dos haplótipos de *C. externa*. Entretanto, verificou-se o compartilhamento de haplótipos entre populações de *C. externa* (Figuras 2 e 4).

A população de *C. externa* de Jaboticabal apresentou apenas um haplótipo em comum com a de Brotas (Figuras 2 e 4), mesmo estando à distância de 111 Km, aproximadamente (Tabela 11). Talvez este número reduzido de haplótipos compartilhados possa ser explicado pelo fato de essas duas localidades apresentarem ambientes distintos. Jaboticabal é representada por ambiente misto, tendo áreas manipuladas pelo homem, como agroecossistemas; e também áreas de pastagem, mata ciliar e mata nativa. Já em Brotas encontra-se ambiente de pastagem e plantação de eucalipto.

Apesar da distância de 381 Km (Tabela 11) encontrada entre os municípios de Jaboticabal e São José dos Campos é importante salientar que suas populações apresentaram um haplótipo em comum (Figuras 2 e 4). Deve-se destacar o fato de São José dos Campos ser ambiente urbano e que mesmo os ambientes sendo diferentes a distância genética encontrada entre essas populações não foi significativa (Tabelas 8 e 10), demonstrando que possivelmente são a mesma população.

Quanto à comparação das populações de *C. externa* de Jaboticabal e São Sebastião do Paraíso, pode-se dizer que para o gene COI, tais populações tiveram três haplótipos compartilhados (Figura 2), ao passo que para o gene 16S não houve nenhum haplótipo em comum (Figura 4). Isto pode ter ocorrido pelo fato de, provavelmente, o gene COI informar eventos mutacionais mais recentes.

Além disso, tal compartilhamento haplotípico pode ter ocorrido porque ambas as localidades correspondem à ambientes manipulados. Em São Sebastião do Paraíso verifica-se a presença de pomar de figo. Outro aspecto importante a ser destacado é que essas duas populações encontram-se à distância de 381 Km (Tabela 11) e mesmo assim, não sofreram isolamento geográfico.

A população de *C. externa* de Jaboticabal também teve um haplótipo em comum com as populações de Rifaina e São Carlos (Figuras 2 e 4), à uma distância de aproximadamente, 152 Km de ambas as localidades (Tabela 11). Vale lembrar que o ambiente encontrado em Rifaina era de bordadura de mata e em São Carlos, pastagem.

Em Brotas foi possível constatar que sua população de *C. externa* compartilhou um haplótipo para o gene COI e dois haplótipos para o gene 16S com as populações de *C. externa* de São José dos Campos, São Sebastião do Paraíso e São Carlos (Figuras 3 e 6). Em relação à população de Rifaina, apenas um haplótipo foi encontrado em comum com a população de Brotas, para os dois genes (Figuras 2 e 4).

Quanto à população de *C. externa* de São José dos Campos pode-se dizer que a mesma apresentou um haplótipo em comum com as populações de *C. externa* de São Sebastião do Paraíso e Rifaina (Figuras 2 e 4). A distância entre tais municípios equivale a 349 Km e 392 Km, respectivamente (Tabela 11). Além disso, também teve

um haplótipo em comum com a população de *C. externa* de São Carlos para o gene COI (Figura 2) e dois haplótipos compartilhados para o gene 16S (Figura 4).

A população de *C. externa* de São Sebastião do Paraíso está à distância de 104 Km da população de *C. externa* de Rifaina (Tabela 11). Ambas apresentaram um haplótipo em comum (Figuras 2 e 4). Esse compartilhamento pode ser possível por se tratar de cidades próximas, com uma vegetação similar, pois nesta área em que elas estão presentes há intenso cultivo de café.

A população de *C. externa* São Sebastião do Paraíso também compartilha um haplótipo com a população de São Carlos (Figuras 2 e 4), mesmo estando à distância de 245 Km (Tabela 11) e apresentarem ambientes distintos.

Rifaina e São Carlos estão distantes em 222 Km (Tabela 11) e mesmo assim, suas populações de *C. externa* tiveram um haplótipo em comum (Figuras 2 e 4).

Por meio da análise do compartilhamento de haplótipos entre populações de *C. externa* é possível afirmar que todas as populações estudadas apresentaram pelo menos um haplótipo em comum. Isto pode ter ocorrido em função de vários aspectos, tais como a ação antrópica, o transporte de mudas, a formação de correntes de ar em virtude das rodovias criadas pelo homem e o fato desta espécie ser panmítica para as cidades estudadas.

Segundo AUSTIN et al. (2004) a distribuição espacial dos haplótipos do gênero *Reticulitermes* pode ser atribuída a origens antropogênicas. Então, o mesmo pode ocorrer com as populações de *C. externa*.

Desde o século XIX os estados de São Paulo e Minas Gerais apresentam grande produção de café (ANDRADE & JAFELICE, 2005), o que pode ter contribuído para a disseminação de ovos e larvas de *C. externa*, rompendo um possível isolamento geográfico existente. Tal distribuição, provavelmente, ocorre através do transporte de mudas de café.

Outra possibilidade de disseminação de larvas e ovos de *C. externa* que pode ocorrer é por meio do transporte de mudas de citros no país, visto que o Brasil é o maior produtor mundial de laranja (TOMASETTO et al. 2009).

As correntes de ar provocadas pelas rodovias construídas nesta região estudada também podem favorecer a migração de adultos de *C. externa*. A migração é um

fenômeno comum e ocorre, especialmente, durante os primeiros dias de vida de adultos de *C. carnea*, conforme mostrado por DUELLI (1980). Além disso, segundo o mesmo autor, um adulto é capaz de voar cerca de 40 Km em apenas uma noite.

Desta forma, é possível inferir que as populações de *C. externa* utilizadas neste estudo podem ser capazes de migrar para as regiões avaliadas, uma vez que a distância máxima encontrada foi de, aproximadamente, 400 Km. Então, em dez dias de migração seriam capazes de chegar à distância máxima.

Tal evento é factível, uma vez que a espécie *C. carnea* foi considerada um dos primeiros insetos colonizadores da ilha de Açores, que fica a aproximadamente, 1300 Km do continente europeu (VENTURA et al. 2007).

Por isso, talvez seja necessário estudar outras populações de *C. externa* oriundas de regiões com distâncias superiores às utilizadas neste trabalho para se verificar um padrão de distribuição haplotípica.

Os resultados encontrados foram positivos do ponto de vista do controle biológico. Isto porque caso essas populações de *C. externa* sejam a mesma população, o seu papel no controle de pragas não seria afetado negativamente.

Tabela 11. Distância linear aproximada, em quilômetros, entre cada uma das localidades utilizadas para o estudo de populações de *C. externa*.

Localidades	Jaboticabal	Brotas	São José dos Campos	São Sebastião do Paraíso	Rifaina	São Carlos
Jaboticabal	-----					
Brotas	111	-----				
São José dos Campos	381	327	-----			
São Sebastião do Paraíso	236	304	349	-----		
Rifaina	152	245	392	104	-----	
São Carlos	152	103	233	245	222	-----

5. CONCLUSÕES

- A caracterização genética das populações de *C. externa* de Jaboticabal (SP), Brotas (SP), Rifaina (SP), São Carlos (SP), São José dos Campos (SP) e São Sebastião do Paraíso (MG) mostrou que elas, provavelmente, são compatíveis geneticamente;
- As alterações genéticas encontradas nas sequências gênicas dessas populações de *C. externa* foram transições, transversões e “indels” nos genes estudados;
- Foi verificada alta diversidade haplotípica nas populações de *C. externa*;
- Não foi determinada a estrutura genética das populações de *C. externa*, uma vez que não houve padrão de distribuição dos haplótipos;
- A distância genética estabelecida entre as populações de *C. externa* não foi significativa;
- Não foi possível associar a ocorrência dos haplótipos com as localidades amostradas.

6. REFERÊNCIAS

- AHRENS, M. E.; ROSS, K. G.; SHOEMAKER, D. Phylogeographic structure of the fire ant *Solenopsis invicta* in its native South American range: roles of natural barriers and habitat connectivity. **Evolution**: international journal of organic evolution, Lancaster, v. 59, n. 8, p. 1733-1743, 2005.
- ALBUQUERQUE, G. S.; TAUBER, C. A.; TAUBER, M. J. *Chrysoperla externa* (Neuroptera: Chrysopidae): Life History and Potential for Biological Control in Central and South America. **Biological Control**, New York, v. 4, p. 8-13, 1994.

ANDRADE, A. S.; JAFELICE, R. S. M. A história do café no Brasil. **FAMAT**, Uberlândia, v. 1, n. 4, p. 241-253, 2005.

ARIAS, L.; BEJARANO, E. E.; MÁRQUEZ, E.; MONCADA, J.; VÉLEZ, I.; URIBE, S. Mitochondrial DNA divergence between wild and laboratory populations of *Anopheles albimanus* Wiedemann (Diptera: Culicidae). **Neotropical Entomology**, Londrina, v. 34, n. 3, p. 499-506, 2005.

ARIAS, M. C.; FRANCISCO, F. O.; SILVESTRE, D. O DNA mitocondrial em estudos populacionais e evolutivos de meliponíneos. In: MELO, G. A. R.; ALVES-DOS-SANTOS, I. **Apoidea neotropica**: homenagem aos 90 anos de Jesus Santiago Moure. Criciúma: Editora UNESC, 2003. p. 305- 309.

ARIAS, M. C.; INFANTE - MALACHIAS, M. E. RFLP: o emprego de enzimas de restrição para detecção de polimorfismos de ácidos no DNA. In: MATIOLI, S. R. (Ed.). **Biologia molecular e evolução**. Ribeirão Preto: Holos, 2001. p. 143-152.

AUSTIN, J. W.; SZALANSKI, A. L.; MESSENGER, M. T. Mitochondrial DNA variation and distribution of the subterranean termite genus *Reticulitermes* (Isoptera: Rhinotermitidae) in Arkansas and Louisiana. **Florida Entomologist**, Gainesville, v. 87, n. 4, p. 473 – 480, 2004.

BALLARD, J. W. O.; CHERNOFF, B.; JAMES, A. C. Divergence of mitochondrial DNA is not corroborated by nuclear DNA, morphology, or behavior in *Drosophila simulans*. **Evolution**: international journal of organic evolution, Lancaster, v. 56, n. 3, p. 527-545, 2002.

BANDELT, H. J.; FORSTER, P.; RÖHL, A. Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. **Molecular Biology and Evolution**, Chicago, v. 16, n. 1, p. 37-48, 1999.

BAVERSTOCK, P.R. & MORITZ, C. Project design. In: HILLIS, D. M; MORITZ, C.; MABLE, B. K. (Ed.). **Molecular systematics**. Sunderland: Sinauer, 1996. p. 17-28.

BELORTE, L. C. C.; RAMIRO, Z. A.; FARIA, A. M. Ocorrência de predadores em cinco cultivares de soja (*Glycine max* (L.) Merrill, 1917] no município de Araçatuba, SP. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 71, n. 1, p. 45-49, 2004.

BEZERRA, G. C. D.; SANTA-CECÍLIA, L. V. C.; CARVALHO, C. F.; SOUZA, B. Biological aspects of the adult stage of *Chrysoperla externa* (Hagen, 1861) (Neuroptera: Chrysopidae) originating from the larvae fed *Planococcus citri* (Risso, 1813) (Hemiptera: Pseudococcidae). **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 30, n. 4, p. 603-610, 2006.

BORTOLI, S. A.; CAETANO, A. C.; MURATA, A. T. & OLIVEIRA, J. E. M. Desenvolvimento e capacidade predatória de *Chrysoperla externa* (Hagen) (Neuroptera: Chrysopidae) em diferentes presas. **Revista de Biologia e Ciências da Terra**, Jaboticabal, v. 6, n. 1, p. 145-152, 2006.

BRITO, R. A.; MANFRIN, M. H.; SENE, F. M. Mitochondrial DNA phylogeography of Brazilian populations of *Drosophila buzzatii*. **Genetics and Molecular Biology**, São Paulo, v. 25, n. 2, p. 161-171, 2002.

BROOKS, S. J. A taxonomic review of the common green lacewing genus *Chrysoperla* (Neuroptera: Chrysopidae). **Bulletin of the British Museum of Natural History, Entomology Series**, Cambridge, v. 63, n. 2, p. 137-210, 1994.

CARDOSO, J. T.; LÁZZARI, S. M. N.; FREITAS, S.; IEDE, E. T. Ocorrência e flutuação populacional de Chrysopidae (Neuroptera) em áreas de plantio de *Pinus taeda* (L.) (Pinaceae) no sul do Paraná. **Revista Brasileira de Entomologia**, São Paulo, v. 47, n. 3, p. 473-475, 2003.

CARVALHO, G. A.; BEZERRA, D.; SOUZA, B.; CARVALHO, C. F. Efeitos de inseticidas usados na cultura do algodoeiro sobre *Chrysoperla externa* (Hagen) (Neuroptera: Chrysopidae). **Neotropical Entomology**, Londrina, v. 32, n. 4, p. 699-706, 2003.

CATERINO, M. S.; CHO, S.; SPERLING, F. A. H. The current state of insect molecular systematics: a thriving tower of babel. **Annual Reviews Entomology**, California, v. 45, n. 1, p. 1-54, 2000.

CLEMENT, M.; POSADA, D.; CRANDALL, K. A. TCS: a computer program to estimate gene genealogies. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 9, n. 10, p. 1657-1660, 2000.

CROUZEL, I. S.; BOTTO, E. N. Ciclo de vida de *Chrysopa lanata lanata* (Banks) y algunas observaciones biológicas en condiciones de laboratorio. **Revista de Investigaciones Agropecuarias INTA**, Buenos Aires, v. 13, n. 1, p. 1-14, 1976/77.

DUELLI, P. Preovipository migration flights in the green lacewing, *Chrysopa carnea* (Planipennia, Chrysopidae). **Behavioral Ecology and Sociobiology**, New York, v. 7, n. 3, p. 239-246, 1980.

FERREIRA, A. J.; CARVALHO, G. A.; BOTTON, M.; LASMAR, O. Seletividade de inseticidas usados na cultura da macieira a duas populações de *Chrysoperla externa* (Hagen, 1861) (Neuroptera: Chrysopidae). **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 36, n. 2, p. 378-384, 2006.

FIGUEIRA, L. K.; CARVALHO, C. F.; SOUZA, B. Biologia e exigências térmicas de *Chrysoperla externa* (Hagen, 1861) (Neuroptera: Chrysopidae) alimentada com ovos de *Alabama argillacea* (Hübner, 1818) (Lepidoptera: Noctuidae). **Ciências Agrotecnológicas**, Lavras, v. 24, n. 2, p. 319-326, 2000.

FIGUEIRA, L. K.; LARA, F. M. Relação predador: presa de *Chrysoperla externa* (Hagen) (Neuroptera: Chrysopidae) para o controle do pulgão-verde em genótipos de sorgo. **Neotropical Entomology**, Londrina, v. 33, n. 4, p. 447-450, 2004.

FONSECA, A. R.; CARVALHO, C. F.; SOUZA, B. Resposta funcional de *Chrysoperla externa* (Hagen) (Neuroptera: Chrysopidae) alimentada com *Schizaphis graminum* (Rondani) (Hemiptera: Aphididae). **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, Londrina, v. 29, n. 2, p. 309-317, 2000.

FREITAS, S. **O uso de crisopídeos no controle biológico de pragas.** Jaboticabal: Funep, 2001. 66p.

FREITAS, S.; PENNY, N. D. The green lacewings (Neuroptera: Chrysopidae) of Brazilian agro-ecosystems. **Proceedings of the California Academy of Sciences**, San Francisco, v. 52, n. 19, p. 245-395, 2001.

FU, Y-X; LI, W-H. Statistical Tests of Neutrality of Mutations. **Genetics**, Baltimore, v. 133, n. 3, p. 693-709, 1993.

HALL, T. A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucleic Acids Symposium Series**, Eynsham, v. 41, p. 95-98, 1999.

HEDRICK, P. W. Genetics of populations. 3a ed. In:_____. **General background and the diversity of genetic variation.** Massachusetts: Jones and Bartlett Publishers, Massachusetts, 2005. chap. 1, p. 1-60.

HOY, M. A. **Insect molecular genetics:** an introduction to principles and applications. 1st. ed. Florida: Academic Press, 1994. 546p.

JABLONKA, E.; LAMB, M. J. Evolution in four dimensions: genetic, epigenetic, behavioral, and symbolic variation in history of life. In: _____. **Genetic variation: blind, direct, interpretative?** London: The MIT Press, 2005. chap. 3, p. 79-107.

JUKES, T. H.; CANTOR, C. R. **Evolution of protein molecules.** New York: Academic Press, 1969. 540p.

KAMOUN, P.; LAVOINNE, A.; VERNEUIL, H. **Bioquímica e biologia molecular.** Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006. 420p.

KIMURA, M. A simple method for estimating evolutionary rate of base substitution through comparative studies of nucleotide sequences. **Journal of Molecular Evolution**, New York, v. 16, n. 2, p. 111-120, 1980.

LEVY, H. C.; GARCIA-MARUNIAK, A.; MARUNIAK, J. E. Strain identification of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) insects and cell line: PCR-RFLP of cytochrome oxidase C subunit I gene. **Florida Entomologist**, Gainesville, v. 85, n. 1, p. 186-190, 2002.

LOPES-DA-SILVA, M.; VIEIRA, L. G. E. Analysis of the genetic diversity in *Metopolophium dirhodum* (Walker) (Hemiptera, Aphididae) by RAPD markers. **Revista Brasileira de Entomologia**, São Paulo, v. 51, n. 1, p. 54-57, 2007.

LOURENÇO, P.; BRITO, C.; BACKELJAU, T.; THIERRY, D. & VENTURA, M. A. Molecular systematics of the *Chrysoperla carnea* group (Neuroptera: Chrysopidae) in Europe. **Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research**, Berlin, v. 44, n. 2, p. 180-184, 2006.

LOXDALE, H. D.; LUSHAI, G. Molecular markers in entomology. **Bulletin of Entomological Research**, Farnham Royal, v. 88, n. 6, p. 577-600, 1998.

MONTEIRO, F. A.; PÉREZ, R.; PANZERA, F.; DUJARDIN, J. P.; GALVÃO, C.; ROCHA, D.; NOIREAU, F.; SCHOFIELD, C.; BEARD, C. B. Mitochondrial DNA variation of *Triatoma infestans* populations and its implication on the specific status of *T. melanosoma*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 94, s. 1, p. 137-140, 1999.

MULLIS, K.B.; FALOONA, F.A. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalysed chain reaction. **Methods in Enzymology**, New York, v. 155, p. 335-350, 1987.

NUÑEZ, E. Ciclo biológico y crianza de *Chrysoperla externa* y *Ceraeochrysa cincta* (Neuroptera, Chrysopidae). **Revista Peruana de Entomología**, Lima, v. 31, n. 1, p. 76-82, 1988.

OLIVEIRA, C. M.; FUNGARO, M. H. P.; CAMARGO, L. E. A.; LOPES, J. R. S. Análise Comparativa da Estabilidade do DNA de *Dalbulus maidis* (DeLong & Wolcott) (Hemiptera: Cicadellidae) sob Diferentes Métodos de Preservação Para Uso em RAPD-PCR. **Neotropical Entomology**, Londrina, v. 31, n. 2, p. 225-231, 2002.

PEREIRA, J. O. P.; FREITAS, B. M.; JORGE, D. M. M.; TORRES, D. C.; SOARES, C. E. A.; GRANGEIRO, T. B. Genetic variability in *Melipona quinquefasciata* (Hymenoptera, Apidae, Meliponini) from northeastern Brazil determined using the first internal transcribed spacer (ITS1). **Genetics and Molecular Research**, Ribeirão Preto, v. 8, n. 2, p. 641-648, 2009.

RIBEIRO, A. E. L.; CASTELLANI, M. A.; DE FREITAS, S.; DE NOVAES, Q. S.; PÉREZ-MALUF, R.; MOREIRA, A. A.; SILVA, C. G. V. Análise faunística e ocorrência sazonal de crisopídeos (Neuroptera: Chrysopidae) em pomar comercial de manga (*Mangifera indica* L.), no Semi-Árido da Região Sudoeste da Bahia, Brasil. **Boletín de Sanidad Vegetal**, Plagas, v. 35, n. 1, p. 15-23, 2009.

ROZAS, J.; SÁNCHEZ-DELBARRIO, J. C.; MESSENGUER, X.; ROZAS, R. 2003. DnaSP, DNA polymorphism analyses by the coalescent and other methods. **Briefings in Bioinformatics**, London, v. 19, p. 2496-2497.

SILVA, R. A.; CARVALHO, G. A.; CARVALHO, C. F.; REIS, P. R.; SOUZA, B.; PEREIRA, A. M. A. R. Ação de produtos fitossanitários utilizados em cafeeiros sobre pupas e adultos de *Chrysoperla externa* (Hagen, 1861) (Neuroptera: Chrysopidae). **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 36, n. 1, p. 8-14, 2006.

SIMON, C.; FRATI, F.; BECKENBACH, A.; CRESPI, B.; LIU, H.; FLOOK, P. Evolution, weighing, and phylogenetic utility of mitochondrial gene sequences and a compilation of conserved polymerase chain reaction primers. **Annals of the Entomological Society of America**, Connecticut, v. 87, n. 6, p. 651–701, 1994.

SOUZA, B.; CARVALHO, C. F. Population dynamics and seasonal occurrence of adults of *Chrysoperla externa* (Hagen, 1861) (Neuroptera: Chrysopidae) in a citrus orchard in southern Brazil. **Acta Zoologica Academiae Scientiarum Hungaricae**, Budapest, v. 48, s. 2, p. 301–310, 2002.

TAJIMA, F. Statistical analysis of DNA polymorphism. **Japanese Journal Genetics**, Mishima, v. 68, n. 6, p. 567-595, 1993.

TAJIMA, F. Statistical methods for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. **Genetics**, Baltimore, v. 123, n. 3, p. 585-595, 1989.

TAMURA, K.; DUDLEY, J.; NEI, M.; KUMAR, S. 2007. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. **Molecular Biology and Evolution**, Chicago, v. 24, n. 8, p. 1596-1599.

TECHNELYSIUM PTY LTD. **Chromas lite version 2.01**. 2007. Disponível em: <http://www.technelysium.com.au/chromas_lite.html>. Acesso em: maio 2009.

TOMASETTO, F.; STUCHI, E. S.; MARTINS, A. B. G. Avaliação de cinco seleções de laranjeira ‘valência’ sobre dois porta-enxertos. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 31, n. 2, p. 480-486, 2009.

VENTURA, M. A.; THIERRY, D.; LOURENÇO, P.; CODERRE, D. Biogeographic origin of the common green lacewings (Neuroptera, Chrysopidae) of the Azores archipelago, through morphology analysis. **Arquipélago: life and marine sciences**, Açores, v. 1, n. 24, p. 23-31, 2007.

WEINBERG, J. R.; DAHLGREN, T. G.; TROWBRIDGE, N.; HALANYCH, K. M. Marine biological laboratory genetic differences within and between species of deep-sea crabs (Chaceon) from the North Atlantic Ocean. **Biological Bulletin**, Woods Hole, v. 204, n. 3, p. 318-326, 2003.

WINTERTON, S.; FREITAS, S. Molecular Phylogeny of green lacewings (Neuroptera: Chrysopidae). **Australian Journal of Entomology**, Australia, v. 45, n. 3, p. 235-243, 2006.

ZHANG, DE-XING; HEWITT, G. M. Insect mitochondrial control region: a review of its structure, evolution and usefulness in evolutionary studies. **Biochemical Systematics and Ecology**, Oxford, v. 25, n. 2, p. 99-120, 1997.

APÊNDICES

APÊNDICE A - SEQUÊNCIAS DO GENE COI

111 111 111 111 122 222 222 333 333 333 444 444 444 455 555 555 666 666 666 777 777 777 788 888 888 889 999 999 999
123 456 789 012 345 678 901 234 567 890 123 456 789 012 345 678 901 234 567 890 123 345 678 901 234 567 890 123 456 789
006 TTA CCT GGA TTT GGA ATA ATT AGT CAT ATT ATT GCT CAA GAA AGT GGT AAA AAG GAA ACC TTT GGA TCT TTA GGA ATA ATT TAT GCT ATA CTA GCT ATT
008
010
012
015
722
723
724
725
726
727
668
669
670
671
394
729
730
733
734
735

111 111 111 111 111 111 111 111 111 111 111 111 111 111 111 111 111 111 111 111 111 111 111 111 111 111 111 111 111
000 000 011 111 111 112 222 222 222 333 333 333 344 444 444 445 555 555 555 666 666 666 677 777 777 778 888 888 999 999
012 345 678 901 234 567 890 123 456 789 012 345 678 901 234 567 890 123 456 789 012 345 678 901 234 567 890 123 456 678
006 TTA TTA GGA TTT ATT GTT TGA GCT CAT CAT ATA TTT ACA GTC GGA ATA GAT GTT GAT ACT CGA GCT TAT TTT ACT TCA GCT ACT ATA ATT ATT GCT
008
010
012
015
722
723
724
725
726
727
668
669
670
671
394
729
730
733
734
735


```

333 444 444 444 444 444 444 444 444 444 444 444 444 444 444 444 444 444 444 444 444 444 444 444 444 444
999 000 000 000 011 111 111 112 222 222 222 222 333 333 333 333 344 444 444 445 555 555 555 555 555 555 555
789 012 345 678 901 234 567 890 123 456 789 012 345 678 901 234 567 890 123 456 789 012 345 567 890 123 456 789 012 345
006 GTT TTA TCA ATA GGT GCA GTT TTT GCA ATT ATA GCT GGA TTT GTT CAC TGA TTT CCT TTA TTT ACT GGT TTA ACA ATA AAT CCT TTT TGA TTA AAA ATT
008 .....
010 .....
012 .....
015 .....
722 .....
723 .....
724 .....
725 .....
726 .....
727 .....
668 .....
669 .....
670 .....
671 .....
394 .....
729 .....
730 .....
733 .....
734 .....
735 .....

444 455 555 555 555 555 555 555 555 555 555 555 555 555 555 555 555 555 555 555 555 555 555 555 555 555 555 555 555
999 900 000 000 000 011 111 111 222 222 222 222 233 333 333 333 344 444 444 444 555 555 555 555 555 555 555 555 555 555 555 555
678 901 234 567 890 123 456 789 012 345 678 901 234 567 890 123 456 789 012 345 678 901 234 567 890 123 456 789 012 345 678 901 234
006 CAA TTT ACA ACA ATA TTT ATT GGA GTT AAT TTA ACT TTC TTT CCA CAA CAT TTT TTA GGT TTA GCC GGG ATA CCT CGA CGT TAT TCT GAT TAT CCT GAT
008 .....
010 .....
012 .....
015 .....
722 .....
723 .....
724 .....
725 .....
726 .....
727 .....
668 .....
669 .....
670 .....
671 .....
394 .....
729 .....
730 .....
733 .....
734 .....
735 .....

```

555 556 666 666 666 666 666 666 666 666 666 666 666 666 666 666 666 666 666 666 666 666 666 666 666 666 666 666 666 666 666
 999 990 000 000 000 111 111 111 122 222 222 223 333 333 333 444 444 444 455 555 555 556 666 666 666 666 666 666 666 666 666 666 666 666
 567 890 123 456 789 012 345 678 901 234 567 890 123 456 789 012 345 678 901 234 567 890 123 456 678 901 234 567 890 123 456 678 901 234 567 890 123
 006 GCT TAT ACT ACA TGA AAT GTT ATT TCA TCA ATT GGA TCA TTA ATT TCT TTT ATA GCA GTA TTA TAT TTT TTC TTT ATT TTA TGA GAA AGA TTA GTT TCT
 008
 010
 012
 015
 722
 723
 724
 725
 726
 727
 668
 669
 670
 671
 394
 729G
 730
 733
 734
 735

666 666 777 777 777 777 777 777 777 777 777 777 777 777 777 777 777 777 777 777 777 777 777 777 777 777 777 777 777 777
 999 990 000 000 000 011 111 111 122 222 222 223 333 333 333 344 444 444 455 555 555 556 666 666 666 666 666 666 666 666 666 666 666 666 666
 456 789 012 345 678 901 234 567 890 123 456 789 012 345 678 901 234 567 890 123 456 789 012 345 678 901 234 567 890 123 456 678 89
 006 AAA CGA GCA ATT TTA TTT TCA ACT CAA TTA CCA ACT TCT ATT GAA TGA TTA CAA AAT TAT CCC CCC GCT GAA CAT AGT TAT TCT GA
 008
 010
 012
 015
 722
 723
 724
 725T
 726
 727
 668
 669
 670
 671
 394
 729
 730
 733
 734
 735

APÊNDICE B - SEQUÊNCIAS DO GENE 16S

```

111 111 111 122 222 222 333 333 333 444 444 444 455 555 555 666 666 777 777 777 788 888 888 889 999 999 999
123 456 789 012 345 678 901 234 567 890 123 456 789 012 345 678 901 234 567 890 123 345 678 901 234 567 890 123 456 789
CAG ATC ATG TAA AGA TTC AAA GGT CGA ACA GAC CTA AAC TCT AAA CTG CTA CAT CTA GAA ATA ACC TTT AAT TCA ACA TCG AGG TCG CAA TCT TTT TTA
151 .....
152 .....
153 .....
154 .....
722 .....
723 .....
724 .....
725 .....
726 .....
727 .....
668 .....
669 .....
670 .....
671 .....
728 .....
729 .....
730 .....
733 .....
734 .....
735 .....
736 .....

111 111 111 111 111 111 111 111 111 111 111 111 111 111 111 111 111 111 111 111 111 111 111 111 111 111 111 111 111 111
000 000 011 111 111 112 222 222 222 333 333 333 344 444 444 445 555 555 555 666 666 666 677 777 777 778 888 888 888 999 999
012 345 678 901 234 567 890 123 456 789 012 345 678 901 234 567 890 123 456 789 012 345 678 901 234 567 890 123 456 678
TCG ATA AGA ACT CTC TAA AAA AAT TAC GCT GTT ATC CCT AAG GTA ACT TAA TCT TAT AAT CAC TAA AAA TGG ATC AAT TAA TCA TAA ATC AAT GTT TAT
151 .....
152 .....
153 .....
154 .....
722 .....
723 .....
724 .....
725 .....
726 .....
727 .....
668 .....
669 .....
670 .....
671 .....
728 .....
729 .....
730 .....
733 .....
734 .....
735 .....
736 .....

```



```

333 444 444 444 444 444 444 444 444 444 444 444 444 444 444 444 444 444 444 444 444 444 444 444 444 444
999 000 000 000 011 111 111 112 222 222 222 222 333 333 333 333 344 444 444 445 555 555 555 666 666 677 777 777 778 888 888 888 999 999
789 012 345 678 901 234 567 890 123 456 789 012 345 678 901 234 567 890 123 456 789 012 345 678 901 234 567 890 123 456 789 012 345
151 ATT CAA CCA TTC ATT CCA GCC TTC AAT TAA GAG ACA AAT GAT TAT GCT ACC TTT GCA CAG TCA AAA TAC CGC GGC CCT TTA ATA ATT ATC AGT GGG CAG
152 ... ..
153 ... ..
154 ... ..
722 ... ..
723 ... ..
724 ... ..
725 ... ..
726 ... ..
727 ... ..
668 ... ..
669 ... ..
670 ... ..
671 ... ..
728 ... ..
729 ... ..
730 ... ..
733 ... ..
734 ... ..
735 ... ..
736 ... ..

```

```

444 455 555 555 555 555 555 555 555 555 555 555 555 555 555 555 555 555 555 555 555 555 555 555 555 555 555 555 555 555 555 555
999 900 000 000 001 111 111 112 222 222 222 222 111 111 222 222 222 222 222 222 222 222 222 222 222 222 222 222 222 222 222 222 222
678 901 234 567 890 123 456 789 012 345 678
151 GTT AGA CTT TAT ATT TTT AAC AAA AAG ACA TGT
152 ... ..
153 ... ..
154 ... ..
722 ... ..
723 ... ..
724 ... ..
725 ... ..
726 ... ..
727 ... ..
668 ... ..
669 ... ..
670 ... ..
671 ... ..
728 ... ..
729 ... ..
730 ... ..
733 ... ..
734 ... ..
735 ... ..
736 ... ..

```