

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CAMPUS DE JABOTICABAL**

**ESTUDO DO PADRÃO DE DISTRIBUIÇÃO GENÉTICO-
HAPLOTÍPICO DE *Chrysoperla externa* (NEUROPTERA:
CHRYSOPIDAE) EM ÁREAS DE CITROS NO ESTADO DE
SÃO PAULO**

Taís Carmona Lavagnini

Bióloga

JABOTICABAL – SÃO PAULO – BRASIL

Fevereiro de 2011

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CAMPUS DE JABOTICABAL**

**ESTUDO DO PADRÃO DE DISTRIBUIÇÃO GENÉTICO-
HAPLOTÍPICO DE *Chrysoperla externa* (NEUROPTERA:
CHRYSOPIDAE) EM ÁREAS DE CITROS NO ESTADO DE
SÃO PAULO**

Taís Carmona Lavagnini

**Orientador: Prof. Dr. Sérgio de Freitas
Co-orientadora: Profa. Dra. Adriana Coletto Morales**

Dissertação apresentada à
Faculdade de Ciências Agrárias e
Veterinárias – UNESP, Campus de
Jaboticabal, como parte das
exigências para a obtenção do título
de Mestre em Agronomia
(Entomologia Agrícola).

JABOTICABAL – SÃO PAULO – BRASIL

Fevereiro de 2011

DADOS CURRICULARES DA AUTORA

TAÍS CARMONA LAVAGNINI – Nascida em 17 de dezembro de 1986, na cidade de Sertãozinho, Estado de São Paulo, Brasil. É bióloga graduada pela Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, UNESP/Campus Jaboticabal – SP, em janeiro de 2009. Foi bolsista de iniciação científica da Fundação de Auxílio à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) no período de Agosto/06 a Julho/08. Em março de 2009 iniciou o curso de Mestrado em Agronomia, Área de Concentração em Entomologia Agrícola na mesma unidade, sendo bolsista do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) no período de Abril/09 a Março/11.

*"Quando eu leio, eu entendo
Quando eu vejo, eu relembro
Quando eu faço, eu aprendo"*

Provérbio chinês

Dedico

*À minha família e amigos,
pelo apoio e confiança.*

AGRADECIMENTOS

- Ao meu orientador Prof. Dr. Sérgio de Freitas e à minha co-orientadora Profa. Dra. Adriana Coletto Morales pela orientação e amizade durante a realização deste trabalho.
- Ao técnico do Laboratório de Biossistemática, Biologia e Ecologia Molecular de Neurópteros, André Maurício Múscari, pela excepcional dedicação e pela amizade incondicional.
- À minha família, especialmente aos meus pais, Carlos e Marli, pelo apoio, dedicação e confiança depositados em mim e nos meus sonhos.
- Ao José Henrique Pizzo pela compreensão e companheirismo durante todos esses anos.
- Aos amigos de graduação, Cíntia Cristina Isicawa Puga, Camila Linhares Taxini, Verônica Pereira Lebre e Caio Samuel Franciscati da Silva, pela amizade sincera e pelos momentos de desabafo e terapia em grupo que fizemos através do email.
- Aos amigos do Laboratório de Biossistemática, Biologia e Ecologia Molecular de Neurópteros, Francisco, Caleb, Ana Lígia, Éllen e Amália, pela amizade e pelos bons momentos durante o tão sagrado café da tarde.
- Aos funcionários do FUNDECITRUS que realizaram as coletas de crisopídeos em diversas propriedades rurais no Estado de São Paulo.
- À secretaria do Departamento de Fitossanidade, Lígia Dias Tostes Fiorezzi, e aos funcionários da Seção de Pós-graduação pelo auxílio com as questões burocráticas.
- Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão da bolsa de mestrado, processo nº131193/2009-0.

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE TABELAS.....	vii
LISTA DE FIGURAS.....	viii
RESUMO.....	ix
SUMMARY.....	x
I.INTRODUÇÃO.....	01
II.REVISÃO DE LITERATURA.....	03
A espécie <i>Chrysoperla externa</i> e sua utilização em programas de controle biológico.....	03
Estrutura populacional e Filogeografia.....	04
DNA Mitocondrial – Gene COI.....	07
III.MATERIAL E MÉTODOS.....	08
Amostras e Localidades.....	08
Preparação do DNA Mitocondrial.....	10
Análise dos Dados.....	12
IV.RESULTADOS.....	16
V.DISCOSSÃO.....	28
VI.CONCLUSÕES.....	34
VII.REFERÊNCIAS.....	35
APÊNDICE.....	46
APÊNDICE A – SEQUÊNCIAS DO GENE MITOCONDRIAL COI.....	47

LISTA DE TABELAS

Tabela		Página
1	Municípios, coordenadas geográficas e código de identificação (<i>voucher</i>) dos indivíduos de <i>Chrysoperla externa</i> amostrados no Estado de São Paulo.....	09
2	Distâncias genéticas entre as populações de <i>Chrysoperla externa</i> amostradas em municípios do Estado de São Paulo..	19
3	Distâncias geográficas medidas em quilômetros entre os municípios amostrados no Estado de São Paulo.....	19
4	Indivíduos de <i>Chrysoperla externa</i> agrupados nos centros detectados na rede haplotípica <i>Median-Joining</i>	21
5	Indivíduos de <i>Chrysoperla externa</i> agrupados em cada centro detectado na rede haplotípica gerada pelo programa TCS.....	24
6	Indivíduos de <i>Chrysoperla externa</i> que compartilham o mesmo haplótipo.....	24
7	Amostras das populações de <i>Chrysoperla externa</i> e os respectivos haplótipos do gene mitocondrial COI utilizados nas análises. N = número de indivíduos, S = número de sítios polimórficos, h = número de haplótipos, Hd = diversidade haplotípica, π = diversidade nucleotídica, k = número de diferenças nucleotídicas....	26
8	Amostras das populações de <i>Chrysoperla externa</i> em ambas as margens do Rio Tietê, Estado de São Paulo, e seus respectivos dados referentes à estatística descritiva para o gene mitocondrial COI. N = número de indivíduos, S = número de sítios polimórficos, h = número de haplótipos, Hd = diversidade haplotípica, π = diversidade nucleotídica, k = número de diferenças nucleotídicas....	28
9	Testes de neutralidade realizados com sequências parciais do gene mitocondrial COI para populações de <i>Chrysoperla externa</i> que ocorrem na margem esquerda e direita do Rio Tietê, Estado de São Paulo.....	28

LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1	Figura 1. A: Mapa Político do Brasil. B: Mapa do Estado de São Paulo mostrando os municípios amostrados. ITA: Itápolis; SER: Santa Ernestina; NEU: Nova Europa; BES: Boa Esperança do Sul; SCA: São Carlos; DES: Descalvado; BAR: Bariri; IAC: Iacanga; CAF: Cafelândia; PIR: Pirajuí; AGU: Agudos; LUC: Lucianópolis. Fonte: MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE (Disponível em < http://mapas.mma.gov.br/i3geo/aplicmap/geral.htm?cb94d492f4d525b0836597968cd461c1 >. Acesso em 21 de fevereiro de 2011).....	10
2	Representação gráfica das diferenças par a par das sequências (<i>Mismatch Distribution</i>) do gene mitocondrial COI para as populações de <i>Chrysoperla externa</i> amostradas no Estado de São Paulo.....	17
3	Árvore de similaridade genética <i>Neighbor-Joining</i> obtida a partir do cálculo das distâncias genéticas entre as populações de <i>Chrysoperla externa</i> amostradas em cada município analisado no Estado de São Paulo.....	18
4	Rede haplotípica <i>Median-Joining</i> construída com sequências parciais do gene mitocondrial COI de <i>Chrysoperla externa</i> . O tamanho da área do círculo é proporcional à frequência dos haplótipos. Cada cor representa um município e a proporção de cada cor dentro do círculo indica a frequência relativa do haplótipo. Vermelho: Cafelândia; Amarelo: Pirajuí; Verde claro: Iacanga; Azul claro: Bariri; Preto: Lucianópolis; Rosa: Itápolis; Branco: Nova Europa; Roxo: Boa Esperança do Sul; Cinza: Descalvado; Laranja: Santa Ernestina; Azul escuro: Agudos; Verde escuro: São Carlos.....	20
5	Rede haplotípica não enraizada gerada pelo programa TCS por meio de sequências parciais do gene mitocondrial COI de <i>Chrysoperla externa</i> . O tamanho da área do círculo é proporcional à frequência dos haplótipos. Cada linha da rede representa um passo mutacional. Haplótipos hipotéticos, não amostrados, são representados por pequenos círculos vazios.....	23

**ESTUDO DO PADRÃO DE DISTRIBUIÇÃO GENÉTICO-HAPLOTÍPICO DE
Chrysoperla externa (NEUROPTERA: CHRYSOPIDAE) EM ÁREAS DE
CITROS NO ESTADO DE SÃO PAULO**

RESUMO – Os crisopídeos são insetos com grande potencial para uso em programas de controle biológico de pragas agrícolas. Populações de *Chrysoperla externa* apresentam ampla distribuição geográfica, abrangendo desde o sul dos Estados Unidos até o sul da América do Sul, ocorrendo em diferentes ambientes. Contudo, há relativamente poucos estudos buscando compreender a estrutura genética de agentes de controle biológico, especialmente insetos predadores. Desta forma, os principais objetivos deste trabalho foram caracterizar geneticamente as populações de *C. externa* por meio de sequências do gene mitocondrial COI e compreender sua estrutura populacional nos municípios amostrados no Estado de São Paulo. Para tanto, indivíduos adultos foram coletados em pomares de citros, e da região torácica foi extraído o DNA total. O gene COI foi amplificado por meio da técnica de PCR e as amostras foram purificadas e sequenciadas. As populações de *C. externa* analisadas apresentaram elevada diversidade genética, bem distribuída entre os municípios amostrados. Esta homogeneização pode ser decorrência de fluxo gênico, ação antrópica, correntes de ar, proximidade das fazendas com matas nativas e elevado potencial reprodutivo de *C. externa*. A partir dos resultados obtidos é possível inferir que o agroecossistema, por ser um ambiente homogêneo, esteja contribuindo para a perda de estruturação que havia entre estas populações quando elas viviam em ecossistemas nativos, sendo assim, é fundamental que as populações de *C. externa* sejam estudadas neste ambiente, para que possam ser compreendidas em seu habitat de origem e sem a influência da ação antrópica.

Palavras-chave: controle biológico, crisopídeos, DNA mitocondrial, estrutura populacional, gene COI

**STUDY OF THE DISTRIBUTION PATTERN OF GENETIC-HAPLOTYPE OF
Chrysoperla externa (NEUROPTERA: CHRYSOPIDAE) IN CITRUS AREAS IN
THE STATE OF SÃO PAULO**

SUMMARY – The green lacewings are insects with great potential for use in programs of biological control of agricultural pests. Populations of *Chrysoperla externa* are widely distributed geographically, being found from the southern United States until the southern South America, occurring in different environments. However, there are relatively few studies trying to understand the genetic structure of biological control agents, especially predatory insects. Thus, the main objectives of this work were to characterize genetically the populations of *C. externa* through COI mitochondrial gene sequences and to understand its population structure in sampled municipalities in the State of São Paulo. For this purpose, adult individuals were collected in citrus orchards, and from its torax were extracted the total DNA. The COI gene was amplified by PCR and the samples were purified and sequenced. The populations showed high genetic diversity, well distributed among the municipalities. This homogenization may be due to gene flow, human action, action of winds, proximity of farms to native forests, and high reproductive potential of *C. externa*. From the results, is possible to infer that the agroecosystem, a homogeneous environment, may be contributing to the loss of structure that existed among the populations when they lived in native ecosystems, and therefore, the populations of *C. externa* must be studied in this environment, so they could be understood in its natural habitat and without the influence of the human action.

Keywords: biological control, COI gene, green lacewings, mitochondrial DNA, population structure.

I. INTRODUÇÃO

Os crisopídeos são insetos considerados agentes em potencial para programas de controle biológico de pragas agrícolas, especialmente a espécie *Chrysoperla externa* (Hagen, 1861) (Neuroptera: Chrysopidae). Suas larvas são vorazes predadoras sendo capazes de se alimentar de uma grande quantidade e variedade de artrópodes-praga (FREITAS, 2001; 2002) e podem ser facilmente criadas em laboratório (ALBUQUERQUE et al. 1994; FREITAS, 2002). As populações de *C. externa* tem ampla distribuição geográfica (ADAMS & PENNY, 1985); podem ser encontradas tanto em ambientes não perturbados (nativos) quanto em agroecossistemas (CANARD et al. 1984); Contudo, é de fundamental importância que os indivíduos liberados no campo sejam capazes de sobreviver, garantindo assim que o controle biológico ocorra de forma efetiva, para tanto, é preciso conhecer biológica e geneticamente as populações que estão sendo liberadas.

As populações de *C. externa* ocorrem em diferentes ambientes, sendo que alguns podem ser favoráveis à sua sobrevivência e reprodução e outros desfavoráveis, o que significa que elas estão inseridas em uma matriz de habitats (RICKLEFS, 2003). De certa forma, ao longo de sua história evolutiva, estas populações tem sido submetidas a diferentes pressões seletivas, que aliadas a outras forças de variação como mutação, fluxo gênico e deriva genética, podem ter contribuído para sua diferenciação populacional e adaptação.

Para conhecer como as populações de *C. externa* estão estruturadas e como sua variação genética está associada à sua distribuição geográfica, é necessária a utilização de um marcador molecular. O DNA mitocondrial tem sido amplamente utilizado e é preferível ao invés do DNA nuclear para tais estudos, pois é facilmente amplificado pela reação em cadeia da polimerase (PCR) e também porque é mais fácil purificar as mitocôndrias de uma célula do que um segmento específico do DNA nuclear (HOY, 2003). Ambos diferem em vários aspectos como, por exemplo, a herdabilidade, a ploidia, o grau de recombinação, número de íntrons, taxa de mutação e mecanismos de

reparo (BALLARD & WHITLOCK, 2004). O gene mitocondrial COI, é um marcador molecular muito usado em estudos populacionais (FREELAND et al. 2003; HUFBAUER et al. 2004; LEWTER et al. 2006; LI et al. 2006), filogenéticos (WINTERTON & FREITAS, 2006; BERGAMASCHI et al. 2007; HARUYAMA et al. 2008) e filogeográficos (FROHLICH et al. 1999; VANDEWOESTIJNE et al. 2004; VANDERGAST et al. 2007; AOKI et al. 2008). Entretanto, há relativamente poucos estudos sobre a estrutura genética de agentes de controle biológico, especialmente insetos predadores, apesar de sua importância ecológica e econômica (SCHREY et al. 2005).

Diante das questões apresentadas e visando a melhor compreensão da forma como as populações de *C. externa* estão estruturadas no campo, este trabalho teve como objetivos:

1. Obter sequências parciais de DNA para o gene mitocondrial COI na espécie *C. externa*;
2. Caracterizar geneticamente as populações de *C. externa* a partir do número de sítios polimórficos, número de haplótipos, diversidade haplotípica, diversidade nucleotídica e número médio de diferenças nucleotídicas;
3. Compreender a estruturação populacional de *C. externa* nas localidades amostradas no Estado de São Paulo;
4. Estabelecer a distância genética entre as populações de *C. externa* analisadas;
5. Verificar a associação geográfica entre os haplótipos do gene mitocondrial COI encontrados, entre as margens do Rio Tietê, e estabelecer uma hipótese filogeográfica.

II. REVISÃO DE LITERATURA

A espécie *Chrysoperla externa* e sua utilização em programas de controle biológico

Os crisopídeos são insetos pertencentes à família Chrysopidae, e estão incluídos na ordem Neuroptera. Dentro da família Chrysopidae estão agrupadas 1200 espécies e subespécies distribuídas entre 86 gêneros e subgêneros (BROOKS & BARNARD, 1990). O gênero *Chrysoperla* possui 36 espécies, sendo que quatro delas podem ser encontradas no Brasil: *C. externa* (Hagen, 1861), *C. defreitasi* (Brooks, 1994), *C. raimundoi* (Freitas & Penny, 2001) e *C. genanigra* (Freitas, 2003).

Populações de *C. externa* apresentam ampla distribuição geográfica, abrangendo desde o sul dos Estados Unidos até o sul da América do Sul (ADAMS & PENNY, 1985). Ao longo desta faixa de distribuição, esta espécie pode ser encontrada em diversos ambientes. Espécies pertencentes à família Chrysopidae tem se adaptado em diferentes graus de paisagem alterada, sendo que algumas ocorrem apenas em ecossistemas clímax originais (nativos), sem distúrbio ou pouquíssimo alterado pela ação antrópica, enquanto que outras podem ser encontradas em biótipos e ecossistemas alterados (CANARD et al. 1984). As espécies de crisopídeos mais comumente encontradas em agroecossistemas e vegetação baixa (gramíneas) são geralmente espécies com elevada capacidade de dispersão e generalistas quanto ao alimento utilizado, e podem ser consideradas como espécies pioneiras capazes de explorar habitats recentes ou temporários (CANARD et al. 1984). Levantamentos realizados em pomares de citros (Lavras, MG) mostraram que, dentre as espécies de crisopídeos, *C. externa* é a mais abundante e que durante o período avaliado, a densidade populacional foi maior durante as épocas mais secas (baixa precipitação, variando entre 0 a 400mm; e umidade relativa, variando entre 50 e 85%) e mais frias (baixas temperaturas, variando entre 10 e 20°C) (SOUZA & CARVALHO, 2002).

Diferentes hábitos alimentares são observados em adultos e larvas de *C. externa*. O adulto alimenta-se de “honeydew”, pólen e néctar, enquanto que a larva é

predadora. Esta característica das larvas tornam estes indivíduos importantes predadores de pragas agrícolas como, pulgões, cochonilhas, mosca-branca, ácaros, trips e ovos e pequenas larvas de Lepidoptera (FREITAS, 2002).

Além do hábito alimentar observado nas larvas, existem outras características que fazem dos crisopídeos agentes em potencial para programas de controle biológico de pragas agrícolas. Dentre elas destacam-se a boa mobilidade e voracidade das larvas, o fato de que são encontrados em ecossistemas naturais e implantados (agroecossistemas) e são facilmente criados em laboratório (ALBUQUERQUE et al. 1994; FREITAS, 2002).

Estrutura populacional e Filogeografia

Uma população pode ser definida como o conjunto de indivíduos da mesma espécie que habitam uma determinada área e atuam como parte de uma comunidade biótica (RICKLEFS, 2003; ODUM & BARRETT, 2007). Do ponto de vista da genética de populações, além destas características, a população também é constituída de membros que possuem um patrimônio gênico único. Desta forma a população atua como uma unidade maior da evolução, expressando diferentes combinações gênicas por meio da interação entre os patrimônios genéticos dos indivíduos que fazem parte dela (MAYR, 1977b).

A extensão da distribuição de uma população, ou seja, sua abrangência geográfica, é determinada pela presença ou ausência de habitats adequados. Extensas áreas uniformes e homogêneas são muito raras e, portanto, os diferentes ambientes formam um mosaico de manchas de habitat, podendo ou não serem adequados a sobrevivência de determinadas populações. A fragmentação destes habitats constitui um fator importante na estabilidade das populações influenciando a movimentação dos indivíduos entre as áreas (RICKLEFS, 2003). Assim, os organismos podem ocupar determinada mancha de habitat específico se puderem ter acesso a ela movimentando-se através de habitats menos favoráveis que o circundam. Desta forma, as populações estão divididas em subpopulações de indivíduos que ocorrem em manchas homogêneas de habitat adequado, estando separadas de outras subpopulações por

áreas de habitat desfavorável. A forma em que estas subpopulações estão organizadas e o grau de interação entre elas é o que define a estrutura da população (RICKLEFS, 2003).

A estrutura das populações pode ser determinada por meio do conhecimento do grau de diferenças entre populações vizinhas, a presença ou ausência de descontinuidades entre elas e as características das populações intermediárias entre aquelas fenotipicamente distintas. Assim, as populações podem constituir uma série de populações contíguas com mudança gradual, podem ser separadas geograficamente da área principal de distribuição da espécie e podem ser caracterizadas por áreas em que há variabilidade genética acentuada, limitados por grupos estáveis e bastante uniformes (MAYR, 1977a).

Os níveis de variação genética e as frequências alélicas que ocorrem entre as populações estão relacionadas com determinadas forças de variação como a mutação gênica, fluxo gênico, deriva genética e seleção natural (RIDLEY, 2006).

A mutação gênica é a principal fonte de variação e está envolvida em processos de inserção e/ou deleção de pares de bases nitrogenadas na sequência de DNA. As mutações que melhoram o *fitness* de um organismo são raras, a maioria delas ou é neutra ou promove efeitos deletérios (HUFBAUER & RODERICK, 2005). Devido aos eficientes mecanismos de reparo das sequências de DNA, as taxas de mutação são normalmente baixas, 10^{-9} nos eucariotos. Além das mutações gênicas, os eventos de recombinação também podem gerar parte da variação genética existente em um organismo (PAGE & HOLMES, 1998). Outro processo microevolutivo importante para o surgimento de variação genética nas populações é o fluxo gênico. Ele caracteriza-se pelo intercâmbio de genes entre populações, atuando na modificação da frequência alélica e promovendo sua homogeneização (PAGE & HOLMES, 1998).

A deriva genética pode ser definida como uma mudança na frequência alélica que ocorre de forma aleatória e tende a reduzir a variação genética nas populações, pois normalmente este evento está relacionado com seu tamanho efetivo, uma vez que populações menores são mais susceptíveis (PAGE & HOLMES, 1998). Por afetarem o

tamanho das populações, os gargalos populacionais e os efeitos do fundador, também podem estar associados à deriva genética (HUFBAUER & RODERICK, 2005).

A seleção natural é o ponto chave do processo evolutivo. Para que ela ocorra é necessário que quatro condições sejam satisfeitas: 1) os organismos devem ser capazes de se reproduzir; 2) deve haver hereditariedade dos caracteres dos progenitores para a prole; 3) é necessária variação genética entre as características nos organismos da população e 4) alguns organismos estarão mais aptos para a sobrevivência e reprodução. Se, qualquer uma destas condições não for satisfeita não haverá seleção natural (RIDLEY, 2006). Além de produzir mudanças evolutivas, a seleção também pode fazer com que uma população se mantenha constante, caso o ambiente também mantenha suas condições, não favorecendo assim o surgimento de outra forma na população. Assim, a seleção natural pode explicar tanto as mudanças evolutivas como a ausência de mudanças (RIDLEY, 2006).

Conhecer como estas forças de variação aliadas aos eventos demográficos, como vicariância e dispersão, modificaram as populações e as genealogias dos seus genes ao longo do tempo em sua distribuição geográfica é o principal enfoque da filogeografia (AVISE, 2000). A filogeografia tem como premissa teórica a Teoria da Coalescência, que consiste na investigação do processo genealógico de uma amostra de genes obtidos em uma população atual. Desta forma, são identificados possíveis eventos que possam ter ocorrido com esses genes desde o ancestral comum mais recente da amostra (KINGMAN, 1982; ROSENBERG & NORDBORG, 2002). O conhecimento da história filogeográfica de uma espécie também é importante para o entendimento dos processos que levaram à sua formação, permitindo a integração dos estudos micro e macroevolutivos (AVISE, 2000; 2009). Foi de fundamental importância para o desenvolvimento da filogeografia a utilização de DNA mitocondrial como marcador molecular, uma vez que esta molécula possui elevada variação na sequência de nucleotídeos – pré-requisito para análises filogeográficas (AVISE, 2009), e a utilização de modelos matemáticos para a Teoria da Coalescência (HICKERSON et al. 2010).

A NCPA (*Nested Clade Phylogeographic Analysis*) trata-se de uma forma de apoio estatístico para as inferências filogeográficas, baseando-se em uma rede haplotípica em que os clados são aninhados hierarquicamente e a distribuição espacial destes clados e haplótipos é testada estatisticamente (TEMPLETON et al. 1995; TEMPLETON, 2004; POSADA et al. 2006).

DNA Mitocondrial – Gene COI

O genoma mitocondrial é composto por apenas 37 genes, dispostos em uma molécula circular com aproximadamente 17 mil pares de nucleotídeos de comprimento. Dentre estes genes, 2 codificam RNAs ribossomais, 22 codificam moléculas de RNA transportadores e 13 codificam RNAs mensageiros especificando subunidades polipeptídicas de proteínas envolvidas no transporte de elétrons e na fosforilação oxidativa, que auxiliam na produção de energia celular. Esta molécula também possui uma região controle (*control region* – CR) onde a replicação do DNA mitocondrial (mtDNA) é iniciada (BALLARD & WHITLOCK, 2004; AVISE, 2009).

O mtDNA evolui mais rapidamente do que o DNA nuclear (nDNA) e esta característica pode ser explicada por diversos fatores: 1) as sequências de DNA acumulam mais substituições nucleotídicas; 2) a mitocôndria constitui um ambiente corrosivo rico em oxigênio e nela não há mecanismos de reparo de DNA tão eficientes; 3) há certa restrição funcional resultante do fato de que o mtDNA codifica apenas alguns tipos de polipeptídeos e não produz proteínas envolvidas diretamente na sua replicação, transcrição e tradução; e 4) o mtDNA é nu, não possui proteínas histonas como o nDNA, elas são extremamente conservadas e são responsáveis pela restrição nas taxas evolutivas do nDNA (AVISE, 2009).

Os genótipos de mtDNA são chamados de haplótipos, os quais diferem uns dos outros por determinadas mutações acumuladas ao longo do tempo. Devido ao elevado ritmo evolutivo do mtDNA, muitos haplótipos diferentes coexistem dentro de uma espécie e as sequências destes haplótipos podem ser utilizadas para estimar histórias matrilineas, pois a mitocôndria é herdada maternalmente, de indivíduos e populações (AVISE, 2009).

O marcador molecular utilizado neste estudo, gene mitocondrial COI, é responsável pela expressão da subunidade I da enzima citocromo oxidase, que atua na respiração celular (NELSON & COX, 2002). Este gene tem sido amplamente utilizado em diversos estudos populacionais (FREELAND et al. 2003; HUFBAUER et al. 2004; LEWTER et al. 2006; LI et al. 2006), filogenéticos (WINTERTON & FREITAS, 2006; BERGAMASCHI et al. 2007; HARUYAMA et al. 2008) e filogeográficos (FROHLICH et al. 1999; VANDEWOESTIJNE et al. 2004; VANDERGAST et al. 2007; AOKI et al. 2008).

III. MATERIAL E MÉTODOS

Amostras e Localidades

Os indivíduos de *C. externa* utilizados nesta pesquisa pertencem à coleção de insetos do Laboratório de Biossistemática, Biologia e Ecologia Molecular de Neurópteros no Departamento de Fitossanidade da UNESP – Campus Jaboticabal, SP (Brasil). Cabeças, asas e abdome foram armazenados em uma coleção de *vouchers* do mesmo laboratório.

Foram utilizados 116 indivíduos amostrados em municípios do Estado de São Paulo pertencentes às Regiões Administrativas de Bauru e Central (Figura 1), são eles São Carlos ($n=10$), Boa Esperança do Sul ($n=10$), Itápolis ($n=10$), Santa Ernestina ($n=10$), Nova Europa ($n=10$), Descalvado ($n=10$), Agudos ($n=06$), Lucianópolis ($n=10$), Jacanga ($n=10$), Pirajuí ($n=10$), Cafelândia ($n=10$), Bariri ($n=10$). Na Tabela 1 estão listadas suas respectivas coordenadas geográficas e os códigos de identificação (*voucher*) dos indivíduos que fazem parte de cada município amostrado.

Tabela 1. Municípios, coordenadas geográficas e código de identificação (*voucher*) dos indivíduos de *Chrysoperla externa* amostrados no Estado de São Paulo.

Municípios	Coordenadas geográficas	Código de identificação
Cafelândia	21°48'0,72"S; 49°36'53,70"O	1013 a 1022
Pirajuí	22°0'0,55"S; 49°27'6,82"O	1023 a 1032
Iacanga	21°53'38,08"S; 49°1'42,65"O	1033 a 1042
Bariri	22°4'27,78"S; 48°44'25,81"O	1043 a 1052
Lucianópolis	22°26'10,09"S; 49°31'9,87"O	1053 a 1062
Itápolis	21°35'46,07"S; 48°48'48,41"O	1063 a 1072
Nova Europa	21°46'41,87"S; 48°33'33,41"O	1073 a 1082
Boa Esperança do Sul	21°59'41,51"S; 48°23'29,53"O	1083 a 1092
Descalvado	21°54'14,26"S; 47°37'11,53"O	1093 a 1102
Santa Ernestina	21°28'1,73"S; 48°23'20,49"O	1103 a 1112
Agudos	22°28'8,91"S; 48°59'22,31"O	1113 a 1118
São Carlos	22°0'55,26"S; 47°53'28,02"O	1119 a 1128



Figura 1. A: Mapa Político do Brasil. **B:** Mapa do Estado de São Paulo mostrando os municípios amostrados. ITA: Itápolis; SER: Santa Ernestina; NEU: Nova Europa; BES: Boa Esperança do Sul; SCA: São Carlos; DES: Descalvado; BAR: Bariri; IAC: Iacanga; CAF: Cafelândia; PIR: Pirajuí; AGU: Agudos; LUC: Lucianópolis. Fonte: MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE (Disponível em <<http://mapas.mma.gov.br/i3geo/aplicmap/geral.htm?cb94d492f4d521b0836597968cd461c1>>. Acesso em 21 de fevereiro de 2011).

Preparação do DNA Mitocondrial

Extração do DNA Total – Para a extração do DNA total foi utilizado apenas o tórax de cada indivíduo, sendo o restante depositado em álcool absoluto e guardado na coleção de insetos. Os tórax foram macerados com o auxílio de um pistilo e a extração do DNA total foi realizada com o conjunto de reagentes *Wizard® Genomic DNA Purification Kit* (Promega). Em cada amostra foi acrescentada uma solução de lise de núcleo contendo EDTA 0,5 M, pH 8,0 (1:4) e Proteinase K e então elas foram incubadas à 55°C durante 3 horas em banho-maria. Após este período foi adicionada em cada

amostra a solução de precipitação de proteína e em seguida as amostras foram agitadas vigorosamente por 20 segundos e colocadas no gelo durante 5 minutos. Para que ocorresse a precipitação das proteínas as amostras foram centrifugadas a 14.000 rpm durante 4 minutos, formando um *pellet* no fundo do tubo. O sobrenadante que continha o DNA foi transferido para novos tubos enquanto que os outros contendo o *pellet* foram descartados. O DNA obtido passou por lavagens sucessivas primeiramente com isopropanol e em seguida com álcool 70%. A cada lavagem as amostras foram centrifugadas por 3 minutos a 14.000 rpm, descartando-se o sobrenadante e preservando o *pellet*. Ao final destes procedimentos o álcool foi evaporado, mantendo-se os tubos em uma placa aquecedora por trinta minutos à 40°C. Em seguida, acrescentou-se água mili-Q autoclavada e as amostras foram novamente incubadas em banho-maria por uma hora à 65°C, para hidratação do DNA, que foi armazenado a 8°C.

Amplificação do Gene Mitochondrial COI – Para a realização da PCR em termociclador foi utilizado 2,5 µl do DNA total extraído e o conjunto de reagentes *GoTaq® Colorless Master Mix* (Promega) que contém dNTPs, a enzima Taq DNA polimerase e o Tampão da reação. Os oligonucleotídeos (0,4µM) utilizados para amplificar e sequenciar o gene mitocondrial COI foram: C1-J-2183 5' CAACATTTATTTTGATTTTTTGG 3' (*forward*) e TL2-N-3014 5' TCCATTGCACTAATCTGCCATATTA 3' (*reverse*) (SIMON et al. 1994). As condições da PCR para este gene foram: 1º passo: 2' a 94°C, 2º passo: 40" a 94°C, 3º passo: 50" a 55°C, 4º passo: 1' a 72°C, 5º passo: 35 ciclos a partir do 2º passo, 6º passo: 10' a 72°C. Os produtos da reação de PCR foram checados através de eletroforese em gel de agarose 1% dissolvida em tampão TAE 1X (Tris-acetato 40mM e EDTA 1mM, pH 8,0). O gel foi corado com Brometo de Etídio diluído em tampão TAE 1X e visualizado e fotografado em luz ultravioleta.

Purificação do Fragmento de DNA Amplificado – As amostras foram purificadas com o conjunto de reagentes *Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System* (Promega). Foram adicionados volumes iguais de produto de PCR e *Membrane Binding Solution*

(MBS) em um mesmo tubo, ambos foram transferidos para uma coluna de purificação acoplada a um tubo coletor. O DNA liga-se ao MBS formando um complexo que fica retido no filtro da coluna, este foi submetido a sucessivas lavagens com *Membrane Wash Solution* (MWS) seguidas de centrifugações à 14.000 rpm. A última etapa consiste na lavagem do DNA com *Nuclease Free Water*, que desfaz a ligação do DNA com a membrana e, portanto, este deixa a coluna e passa para o tubo de microcentrífuga. Posteriormente, o tubo foi devidamente etiquetado e armazenado no freezer à -20°C.

Reação de Sequenciamento do DNA Mitocondrial – As amostras foram sequenciadas através do conjunto de reagentes *Big Dye™ Terminator* versão 3.1 (*Perkin-Elmer Applied Biosystems*) no sequenciador automático de DNA *ABI Prism 3100 Genetic Analyzer*, seguindo-se as instruções do fabricante. A reação foi submetida aos mesmos ciclos da reação de PCR do gene mitocondrial COI.

Reação de Precipitação do DNA – A reação de precipitação do DNA consistiu em várias lavagens do DNA. Primeiramente, foram adicionados aos tubos, contendo o DNA, 80 µL de isopropanol 75%. Os tubos foram agitados gentilmente e deixados em repouso por 15 minutos à temperatura ambiente. Este material foi centrifugado a 14.000 rpm por 30 minutos e o sobrenadante descartado. Posteriormente, os tubos receberam 250 µL de isopropanol 75% e foram novamente agitados e centrifugados a 14.000 rpm por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e os tubos colocados em estufa a 37°C, até a completa evaporação do álcool.

Análise dos Dados

Leitura das Sequências – A leitura das sequências de DNA obtidas foi realizada através do programa *Chromas v.2.01* Copyright© (1998-2005) Technelysium Pty Ltda e o alinhamento par a par para obtenção da sequência consenso de cada indivíduo e o alinhamento múltiplo foram realizados através do programa *BioEdit v. 7.0.9.0* (HALL, 1999).

Estatística Descritiva – Os parâmetros da estatística descritiva como número de sítios polimórficos (S), número de haplótipos (h), diversidade haplotípica (Hd), diversidade nucleotídica (π), número médio de diferenças nucleotídicas (k) e o número de migrantes (Nm) foram obtidos a partir do programa *DnaSP v.5* (LIBRADO & ROZAS, 2009). Os valores do parâmetro diversidade haplotípica podem variar entre 0 e 1, sendo que quanto mais próximo de 1, maior a diversidade entre os haplótipos analisados.

Testes de Neutralidade – Foram realizados os testes F_s de F_u e D de Tajima por meio do programa *Arlequin v.3.5* (EXCOFFIER & LISCHER, 2010). Os testes de neutralidade avaliam se os polimorfismos observados nas sequências seguem o modelo de variação neutra, entretanto os cálculos para cada teste são baseados em parâmetros distintos. O teste F_s de F_u é baseado na distribuição de frequência dos haplótipos em função de θ ($\theta=4N\mu$, em que N corresponde ao tamanho efetivo da população e μ à taxa de mutação por sequência por geração). Valores negativos e significativos para F_s são indicativos de expansão populacional (FU, 1997). O teste D de Tajima baseia-se nas diferenças entre o número de sítios segregantes (polimórficos) e o número de diferenças nucleotídicas. Valores negativos e significativos para o D de Tajima sugerem seleção purificadora, efeito carona ou expansão populacional; enquanto que os valores positivos são indicativos de seleção estabilizadora ou contração populacional (TAJIMA, 1989).

Mismatch Distribution – A *Mismatch Distribution*, realizada por meio do programa *DnaSP v.5* (LIBRADO & ROZAS, 2009), avalia a distribuição das diferenças nucleotídicas pareadas entre indivíduos, investigando a história demográfica das populações. Ela permite discriminar entre populações que permaneceram estáveis ao longo do tempo (curvas multimodais) e populações que sofreram expansão demográfica a partir de uma população fundadora pequena (curva unimodal) (ROGERS & HARPENDING, 1992; MOUSSET et al. 2004; LOPES, 2006; AOKI et al. 2008).

Distâncias Genéticas – A composição nucleotídica, a distância genética entre as populações e a análise de similaridade genética *Neighbor-Joining* foram obtidos com auxílio do programa *MEGA v.4* (TAMURA et al. 2007). A distância genética pode variar entre 0 e 1, sendo que quanto mais próximo de 1 mais distantes geneticamente são as populações analisadas. O método de análise de similaridade genética *Neighbor-Joining* tem como premissa encontrar pares de unidades taxonômicas operacionais (*operational taxonomic units* – OTU [=neighbors]) que minimizem o comprimento total do ramo em cada estágio do agrupamento das OTUs. Este método baseia-se na máxima parcimônia e o processo é iniciado com uma árvore em formato de estrela (SAITOU & NEI, 1987). Para a análise de similaridade genética *Neighbor-Joining* foi utilizado o modelo de correção Kimura-2-parâmetros (K2P), que considera que as transições são mais frequentes do que as transversões, fato que é especialmente verdadeiro para o DNA mitocondrial (PAGE & HOLMES, 1998).

Rede Haplotípica – A rede de haplótipos *Median-Joining* assim como a frequência dos haplótipos foram estimadas com o programa *Network v.4.5.1.6* Copyright © (2004-2009) Fluxus Technology Ltd. O algoritmo para construção da rede de haplótipos baseia-se no critério de redes com mínima abrangência (*minimum spanning network*) e utiliza *median vectors* (mv) para conectar dados de haplótipos através do método de máxima parcimônia. Os *median vectors* correspondem às sequências consenso que podem ser biologicamente interpretadas como possíveis sequências existentes e não amostradas ou como sequências de um ancestral extinto. Em ambas as interpretações os *median vectors* se fazem necessários para conectar dois haplótipos na rede por meio do método de máxima parcimônia (BANDELT et al. 1999).

Análise de Agrupamento de Clados não Enraizados – As inferências filogeográficas foram realizadas através da análise de Agrupamento de Clados não Enraizados (*Nested Clade Phylogeographic Analysis* – NCPA) (TEMPLETON et al. 1995), que propõe a investigação dos processos históricos que determinaram a

evolução e distribuição geográfica das espécies (PANCHAL, 2007). Inicialmente a rede haplotípica foi construída com o programa *TCS v.1.21* (CLEMENT et al. 2000) que baseia-se na parcimônia estatística (TEMPLETON et al. 1992). Os haplótipos são conectados uns aos outros por um passo mutacional, sendo que haplótipos não amostrados são representados por pequenos círculos vazios (POSADA & CRANDALL, 2001). O aninhamento dos clados foi realizado de acordo com a metodologia proposta por (TEMPLETON et al. 1987). Por meio do programa *GeoDis v.2.5* (POSADA et al. 2000) foram calculados os valores de Dc, Dn e I-T para os clados formados na rede haplotípica. A análise combinada dos índices Dc (distância do clado), que mede a amplitude da distribuição geográfica de um determinado haplótipo, e Dn (distância do clado agrupado), que mede a distância média de haplótipos do clado de interesse em relação ao centro geográfico de distribuição dos haplótipos do clado no nível superior da categoria aninhada/agrupada, possibilitam que seja testada a hipótese nula de não associação entre a distribuição geográfica da espécie e sua genealogia (TEMPLETON et al. 1995; TEMPLETON, 1998). Em cada categoria aninhada também é realizada a estatística interior-extremidade (*interior-tip*; I-T). Este contraste extremidade vs. interior corresponde ao contraste jovem vs. velho/antigo, e em alguns aspectos, raro vs. comum (POSADA et al. 2000). Nesta análise foi utilizado um número de permutações de 10.000. Ao final do processo, os índices calculados e sua significância foram testados na chave de inferência filogeográfica disponível no site GEODIS HOME PAGE (Disponível em <<http://darwin.uvigo.es/software/geodis.html>>. Acesso em 17 de fevereiro de 2011), para interpretação dos eventos e processos que determinaram a história da espécie.

Análise de Variância Molecular – A estruturação entre as populações foi analisada através da Análise de Variância Molecular (AMOVA) por meio do programa *Arlequin v.3.5* (EXCOFFIER & LISCHER, 2010). Esta análise estima a variabilidade intra e interespecífica de cada espécie, fornecendo valores de Φ , que refletem a correlação da diversidade haplotípica em diferentes níveis hierárquicos: Φ_{st} : covariância

entre indivíduos dentro de populações, Φ_{sc} : covariância entre populações dentro de um grupo e Φ_{ct} : covariância entre grupos.

Através do programa Google Earth Copyright© (2009) Google Inc. foram feitas medidas, em linha reta, em quilômetros entre os municípios amostrados.

IV. RESULTADOS

Da amostra total de 116 indivíduos foram obtidas 114 sequências parciais do gene mitocondrial COI, sendo que as sequências obtidas para os indivíduos 1094 (Descalvado) e 1025 (São Carlos) não foram incluídas nas análises porque não alinharam com as demais sequências. Foram obtidas sequências com 649 pares de bases nitrogenadas. Estas sequências estão disponíveis na base de dados do *GenBank* com números de acesso HQ425564-HQ425621 e HQ668468-HQ668523.

Estatística Descritiva – Nas sequências de DNA das populações analisadas foram detectados 35 sítios polimórficos e 36 haplótipos, que apresentaram diversidade haplotípica de 0,860. A diversidade nucleotídica (π) foi de 0,00350 e o número médio de diferenças nucleotídicas (k) foi de 2,271. A distância genética observada entre as populações de *C. externa* foi de 0,004, fato que evidencia que elas são muito próximas geneticamente. Quanto à composição nucleotídica das sequências de DNA destas populações observou-se, em média, 44,3% de timina (T), 12,8% de citosina (C), 28,4% de adenina (A) e 14,5% de guanina (G). É possível observar que a quantidade de bases nitrogenadas A-T é superior a de C-G, fato comum no genoma mitocondrial dos insetos (CROZIER & CROZIER, 1993; KIM et al. 2006; BERGAMASCHI et al. 2007). Também foi calculado o número de migrantes (N_m), estimado a partir do valor de F_{st} , -0,00384, (HUDSON et al. 1992), assim o valor obtido de N_m foi -130,56. Este valor negativo de

N_m ($N_m < 1$) é indicativo de que o efeito diversificador da deriva genética se sobrepõe à influência homogeneizadora do fluxo gênico (AVISE, 2000).

Testes de Neutralidade – Ambos os testes de neutralidade realizados para as populações de *C. externa* apresentaram resultados significativos. O valor obtido para o D de Tajima foi de $-1,74098$ ($p=0,007$) ($*p<0,05$) e para o F_s de F_u o valor obtido foi significativamente negativo, $-26,79560$ ($p=0,0$) ($*p<0,05$). Assim como o teste D de Tajima, o valor obtido para o teste F_s de F_u é um indicativo de expansão populacional.

Mismatch Distribution – A *Mismatch Distribution* não corrobora os resultados obtidos com os testes de neutralidade D de Tajima e F_s de F_u , que indicam expansão populacional. O gráfico obtido a partir do número médio de diferenças nucleotídicas (k) apresentou distribuição bimodal (Figura 2), sendo indício de que as populações de *C. externa* analisadas permaneceram estáveis ao longo do tempo. Além do gráfico, o valor do coeficiente de variação da média das diferenças par a par (CV) também corrobora este resultado, pois para populações estáveis ao longo do tempo o valor do CV é alto (ROGERS & HARPENDING, 1992), e para as populações analisadas ele foi de 0,8081.

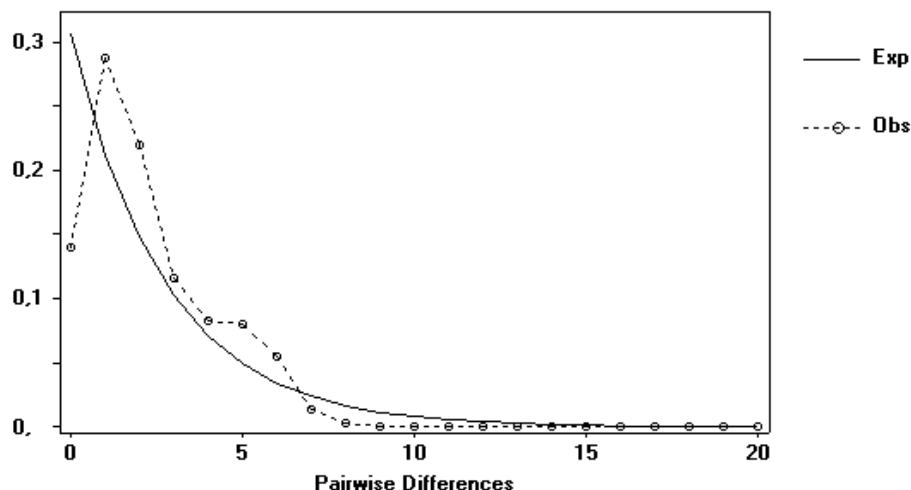


Figura 2. Representação gráfica das diferenças par a par das sequências (*Mismatch Distribution*) do gene mitocondrial COI para as populações de *Chrysoperla externa* amostradas no Estado de São Paulo.

Similaridade Genética – A árvore de similaridade genética *Neighbor-Joining* (Figura 3) foi construída a partir das distâncias genéticas entre os indivíduos de *C. externa* de cada município amostrado (Tabela 2). Na Tabela 3 estão registradas as distâncias geográficas entre os municípios amostrados, sendo que a menor distância observada foi de 27,4 km e a maior distância observada foi de 205,7 km. A topologia da árvore (Figura 3) evidencia que a maioria dos agrupamentos obtidos envolvem municípios/populações que estão próximos geograficamente. Desta forma, é possível inferir que, na maioria dos casos, há um padrão de similaridade geográfica que é refletida geneticamente, ou seja, quanto mais próximas geograficamente, maior a similaridade genética entre estas populações. Este fato pode ser observado entre os agrupamentos Cafelândia e Pirajuí, em que a distância entre os municípios é de 27,4 km; Bariri e Nova Europa, cuja distância é de 37,3 km; Nova Europa e Itápolis, cuja distância é de 33,2 km; Boa Esperança do Sul e Itápolis, cuja distância é de 61,9 km. Apenas em alguns casos houve agrupamento entre municípios/populações que estão mais distantes geograficamente, como no caso de Lucianópolis e Santa Ernestina, em que a distância entre os municípios é de 158,2 km e entre Descalvado e Agudos, cuja distância é de 154,5 km.

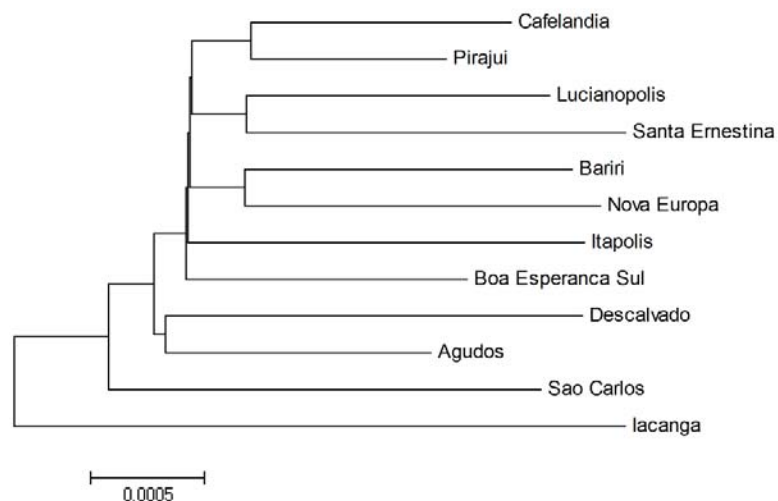


Figura 3. Árvore de similaridade genética *Neighbor-Joining* obtida a partir do cálculo das distâncias genéticas entre as populações de *Chrysoperla externa* amostradas em cada município analisado no Estado de São Paulo.

[illegible]

Tabela 3. Distâncias geográficas medidas em quilômetros entre os municípios amostrados no Estado de São Paulo.

[illegible]

Rede Haplotípica e Filogeografia – O resultado obtido com a rede haplotípica *Median-Joining* (Figura 4), apresentou dois centros denominados 1022 e 1023, em que se concentram os dois haplótipos de maior frequência e de maior distribuição geográfica. Os números dos centros observados na rede haplotípica *Median-Joining* correspondem ao código de identificação dos indivíduos (*voucher*) (Tabela 1). Na Tabela 4 é possível observar os indivíduos de *C. externa* que compartilham o mesmo haplótipo no centro em que foram agrupados na rede haplotípica; não foram listados os centros em que havia um único indivíduo.

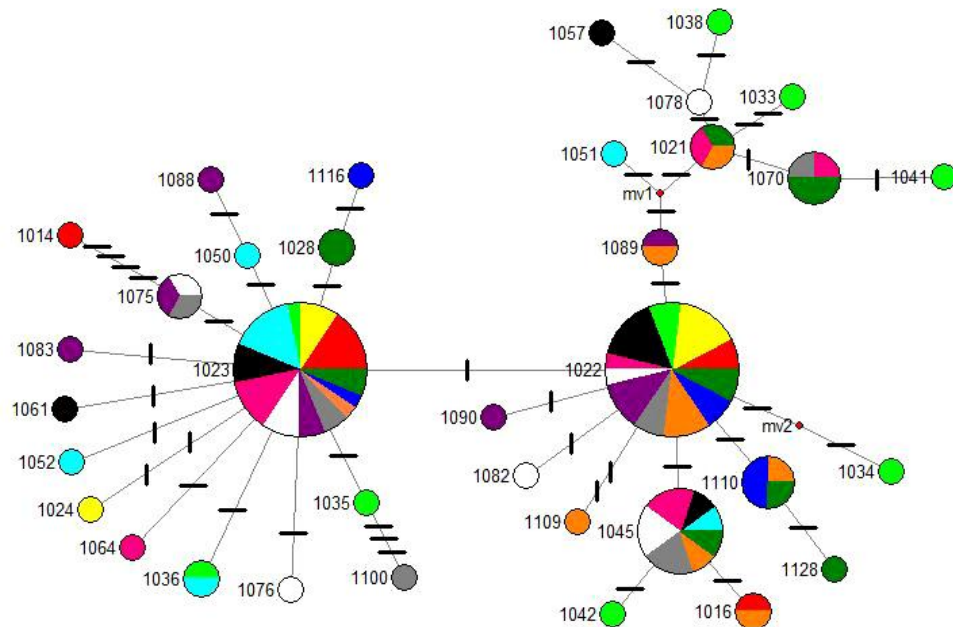


Figura 4. Rede haplotípica *Median-Joining* construída com sequências parciais do gene mitocondrial COI de *Chrysoperla externa*. O tamanho da área do círculo é proporcional à frequência dos haplótipos. Cada cor representa um município e a proporção de cada cor dentro do círculo indica a frequência relativa do haplótipo. Vermelho: Cafelândia; Amarelo: Pirajuí; Verde claro: Iacanga; Azul claro: Bariri; Preto: Lucianópolis; Rosa: Itápolis; Branco: Nova Europa; Roxo: Boa Esperança do Sul; Cinza: Descalvado; Laranja: Santa Ernestina; Azul escuro: Agudos; Verde escuro: São Carlos.

Tabela 4. Indivíduos de *Chrysoperla externa* agrupados nos centros detectados na rede haplotípica *Median-Joining*.

Centros	Indivíduos agrupados em cada centro da rede haplotípica
1016	1016, 1106
1021	1021, 1068, 1107
1022	1022, 1019, 1025, 1030, 1031, 1032, 1037, 1039, 1053, 1054, 1055, 1060, 1071, 1079, 1084, 1085, 1091, 1093, 1099, 1103, 1104, 1111, 1115, 1118, 1119, 1123
1023	1013, 1015, 1017, 1018, 1020, 1023, 1026, 1027, 1040, 1043, 1046, 1047, 1048, 1049, 1056, 1059, 1062, 1063, 1066, 1069, 1072, 1074, 1077, 1081, 1086, 1092, 1095, 1101, 1112, 1117, 1121, 1122
1028	1028, 1029
1036	1036, 1044
1045	1045, 1058, 1065, 1067, 1073, 1080, 1096, 1097, 1108, 1127
1070	1070, 1102, 1120, 1124
1075	1075, 1087, 1098
1089	1089, 1105
1110	1110, 1113, 1114, 1126

Os centros denominados 1022 e 1023 possuem os dois haplótipos de maior frequência e maior distribuição geográfica, devido ao fato de que o haplótipo compartilhado no centro 1022 ocorre em onze dos doze municípios, não sendo encontrado apenas no município de Iacanga, enquanto que no centro 1023, o haplótipo compartilhado está distribuído em todos os municípios amostrados. Na rede haplotípica há outros centros com haplótipos compartilhados, mas com distribuição geográfica mais restrita com relação aos centros 1022 e 1023. No centro 1045 o haplótipo compartilhado ocorre em sete municípios, sendo eles Itápolis, Lucianópolis, Iacanga, São Carlos, Santa Ernestina, Descalvado e Nova Europa. Em alguns centros o haplótipo compartilhado está distribuído em três municípios, no centro 1021 o haplótipo ocorre em Itápolis, Santa Ernestina e São Carlos; no centro 1070 o haplótipo ocorre em São Carlos, Itápolis e Descalvado; no centro 1075 o haplótipo ocorre em Nova Europa, Descalvado e Boa Esperança do Sul; no centro 1110 o haplótipo ocorre em Santa Ernestina, São Carlos e Agudos. Na rede haplotípica há dois centros, 1036 e 1089, em que o haplótipo compartilhado ocorre em apenas dois municípios, Iacanga e Bariri, e Santa Ernestina e Boa Esperança do Sul, respectivamente.

Para investigar a associação entre a distribuição geográfica e a genealogia de DNA mitocondrial obtida, foi utilizada a rede haplotípica gerada pelo programa TCS

(Figura 5). Na Tabela 5 é possível observar os indivíduos de *C. externa* que compartilham o mesmo haplótipo no centro em que foram agrupados na rede haplotípica gerada pelo programa TCS; não foram listados os centros em que havia um único indivíduo. Apenas em um clado da rede haplotípica (Figura 5) foi encontrada associação geográfica significativa. Para os demais clados não foram observados resultados significativos e, portanto, a hipótese nula não pode ser rejeitada, indicando que os clados/haplotipos estão distribuídos aleatoriamente nas localidades, sem associação geográfica. O valor significativamente pequeno para D_n foi observado para o clado 1-16, que abrange as doze localidades amostradas. O resultado da Chave de Inferência (GEODIS HOME PAGE. Disponível em <<http://darwin.uvigo.es/software/geodis.html>>. Acesso em 17 de fevereiro de 2011) mostrou que neste clado há fluxo gênico restrito por distância.

Na Tabela 6 há uma correspondência entre os códigos de identificação dos indivíduos de *C. externa* e os haplotipos encontrados. A Tabela 7 possui informações referentes aos dados haplotípicos para os indivíduos dentro de cada população/município amostrado. O número de haplotipos detectados em cada município foi alto, assim como sua diversidade haplotípica, este parâmetro variou de 0,75556 a 0,97778 entre as populações. Os indivíduos dentro de cada população também se mostraram muito próximos geneticamente, os valores estiveram entre 0,002 e 0,006. Os municípios com maior e menor número de haplotipos foram, respectivamente, Iacanga e Pirajuí. Na Tabela 7 estão listados quais os indivíduos que compartilham o mesmo haplótipo.

Análise de Variância Molecular – A estruturação das populações avaliada pela AMOVA evidenciou que os indivíduos dentro das populações analisadas possuem elevada diferenciação genética ($\Phi_{st}=0,5$; $p=1,0$). Entretanto, a covariância entre as populações dentro de um grupo e entre os grupos mostraram que há pequena diferenciação genética, $\Phi_{sc}=0,0$ ($p=1,0$) e $\Phi_{ct}=-0,00353$ ($p=0,80841$); respectivamente. Não foi observada significância estatística nos parâmetros avaliados, considerando-se valores de $p<0,05$.

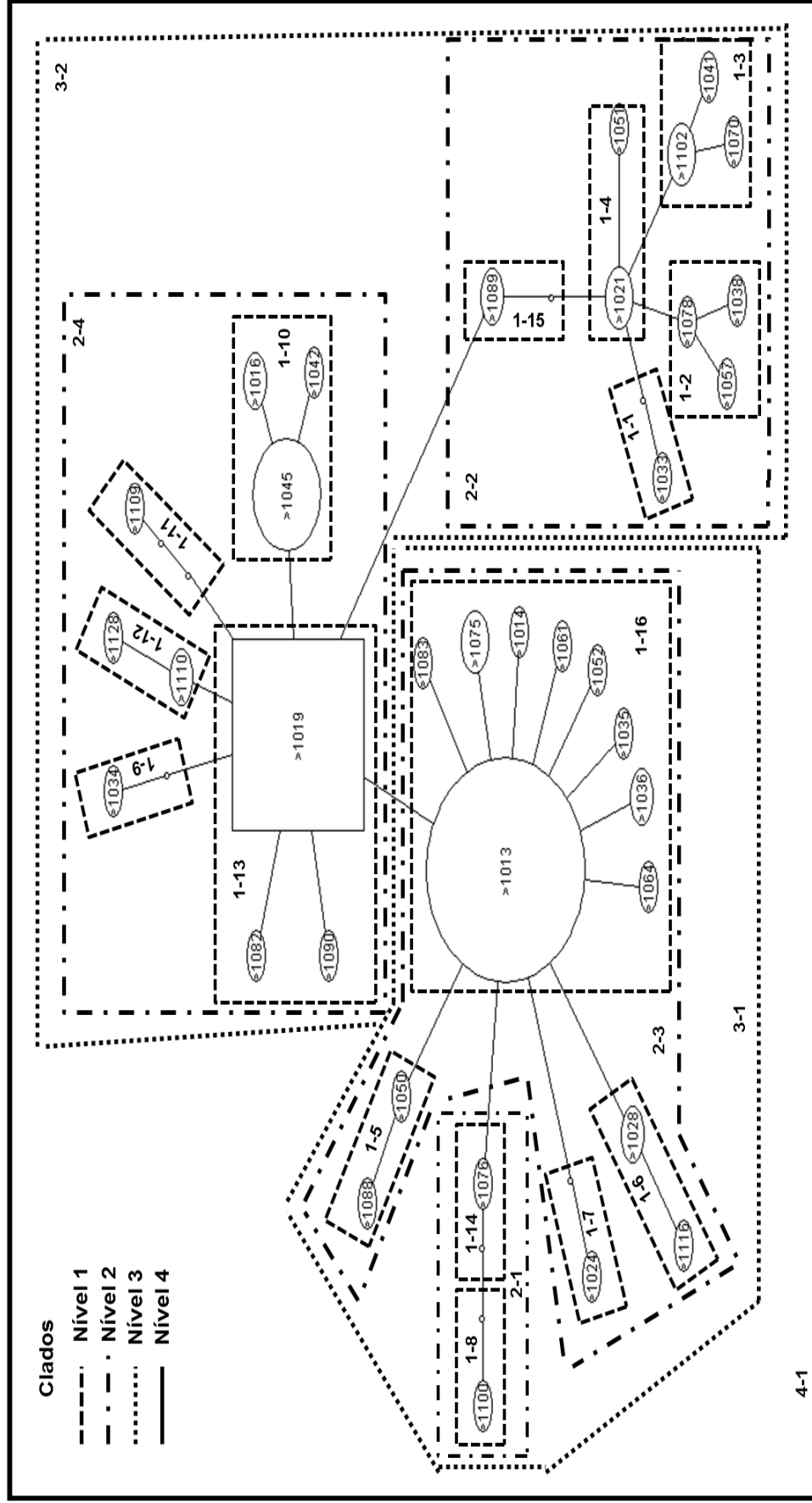


Figura 5. Rede haplotípica não enraizada gerada pelo programa TCS por meio de sequências parciais do gene mitocondrial COI de *Chrysoperla externa*. O tamanho da área do círculo é proporcional à frequência dos haplótipos. Cada linha da rede representa um passo mutacional. Haplótipos hipotéticos, não amostrados, são representados por pequenos círculos vazios.

Tabela 5. Indivíduos de *Chrysoperla externa* agrupados em cada centro detectado na rede haplotípica gerada pelo programa TCS.

Centros	Indivíduos agrupados em cada centro da rede haplotípica
1013	1013, 1015, 1017, 1018, 1020, 1023, 1026, 1027, 1040, 1043, 1046, 1047, 1048, 1049, 1056, 1059, 1062, 1063, 1066, 1069, 1072, 1074, 1077, 1081, 1086, 1092, 1095, 1101, 1112, 1117, 1121, 1122
1016	1016, 1106
1019	1019, 1022, 1025, 1030, 1031, 1032, 1037, 1039, 1053, 1054, 1055, 1060, 1071, 1079, 1084, 1085, 1091, 1093, 1099, 1103, 1104, 1111, 1115, 1118, 1119, 1123
1021	1021, 1068, 1107
1036	1036, 1044
1045	1045, 1058, 1065, 1067, 1073, 1080, 1096, 1097, 1108, 1113, 1114, 1127
1075	1075, 1087, 1098
1088	1088, 1050
1110	1110, 1126
1102	1102, 1120, 1124

Tabela 6. Indivíduos de *Chrysoperla externa* que compartilham o mesmo haplótipo.

Haplótipo	Indivíduos que compartilham o mesmo haplótipo
01	1013, 1015, 1017, 1018, 1020, 1023, 1026, 1027, 1040, 1043, 1046, 1047, 1048, 1049, 1056, 1059, 1062, 1063, 1066, 1069, 1072, 1074, 1077, 1081, 1086, 1092, 1095, 1101, 1112, 1117, 1121, 1122
02	1014
03	1016 1106
04	1019, 1022, 1025, 1030, 1031, 1032, 1037, 1039, 1053, 1054, 1055, 1060, 1071, 1079, 1084, 1085, 1091, 1093, 1099, 1103, 1104, 1111, 1115, 1118, 1119, 1123
05	1021, 1068, 1107
06	1024
07	1028, 1029
08	1033
09	1034
10	1035

Tabela 6. Continuação.

11	1036, 1044
12	1038
13	1041
14	1042
15	1045, 1058, 1065, 1067, 1073, 1080, 1096, 1097, 1108, 1113, 1114, 1127
16	1050
17	1051
18	1052
19	1057
20	1061
21	1064
22	1070
23	1075, 1087, 1098
24	1076
25	1078
26	1082
27	1083
28	1088
29	1089, 1105
30	1090
31	1100
32	1102, 1120, 1124
33	1109
34	1110, 1126
35	1116
36	1128

Tabela 7. Amostras das populações de *Chrysoperla externa* e os respectivos haplótipos do gene mitocondrial COI utilizados nas análises. N = número de indivíduos, S = número de sítios polimórficos, h = número de haplótipos, Hd = diversidade haplotípica, π = diversidade nucleotídica, k = número de diferenças nucleotídicas.

Município	N	S	Haplótipos	h	Hd	π	k	Distância genética
Cafelândia	10	7	5x 01; 1x 02; 1x 03; 2x 04; 1x 05	5	0,75556	0,00267	1,73333	0,003
Pirajuí	10	4	3x 01; 4x 04; 1x 06; 2x 07	4	0,77778	0,00199	1,28889	0,002
Iacanga	10	15	1x 01; 2x 04; 1x 08; 1x 09; 1x 10; 1x 11; 1x 12; 1x 13; 1x 14;	9	0,97778	0,00637	4,13333	0,006
Bairi	10	9	5x 01; 1x 11; 1x 15; 1x 16; 1x 17; 1x 18	6	0,77778	0,00301	1,95556	0,003
Lucianópolis	10	8	3x 01; 4x 04; 1x 15; 1x 19; 1x 20	5	0,80000	0,00298	1,93333	0,003
Agudos	06	4	1x 01; 2x 04; 2x 15; 1x 35	4	0,86667	0,00267	1,73333	0,003
Itápolis	10	8	4x 01; 1x 4; 1x 05; 2x 15; 1x 21; 1x 22;	6	0,84444	0,00397	2,57778	0,004
Nova Europa	10	8	3x 01; 1x 04; 2x 15; 1x 23; 1x 24; 1x 25; 1x 26	7	0,91111	0,00349	2,26667	0,004
Boa Esperança do Sul	10	6	2x 01; 3x 04; 1x 23; 1x 27; 1x 28; 1x 29; 1x 30	7	0,91111	0,00264	1,71111	0,003
Descalvado	09	10	2x 01; 2x 04; 2x 15; 1x 23; 1x 31; 1x 32	6	0,91667	0,00447	2,88889	0,004
Santa Ernestina	10	10	1x 01; 1x 03; 3x 04; 1x 05; 1x 15; 1x 29; 1x 33; 1x 34	8	0,93333	0,00356	2,31111	0,004
São Carlos	09	7	2x 01; 2x 04; 2x 07; 1x 15; 2x 32; 1x 34; 1x 36	6	0,91667	0,00394	2,55556	0,004

Quando há mais do que um indivíduo com o mesmo haplótipo, ele é representado da seguinte maneira: 5x 01 = 5 indivíduos que possuem o haplótipo 01.

O Rio Tietê como Barreira Geográfica – Para verificar se o Rio Tietê, Estado de São Paulo, atua como barreira geográfica entre as populações de *C. externa* foram realizadas análises considerando-se dois grupos distintos, um de cada lado/margem do rio. Na margem esquerda do Rio Tietê estão os municípios de Agudos, Lucianópolis, Iacanga, Pirajuí e Cafelândia; enquanto que na margem direita estão os municípios de São Carlos, Boa Esperança do Sul, Itápolis, Santa Ernestina, Nova Europa, Bariri e Descalvado.

Por meio dos dados relativos à estatística descritiva é possível observar que as populações da margem direita do Rio Tietê são ligeiramente mais diversas do que as populações da margem esquerda, elas possuem maior número de sítios polimórficos e de haplótipos (Tabela 8). As populações da margem esquerda são muito próximas geneticamente, 0,003; o mesmo ocorre com as populações da margem direita em que a distância genética é de 0,004.

Quanto aos testes de neutralidade realizados foi observada a mesma situação tanto para a margem esquerda do Rio Tietê quanto para a margem direita (Tabela 9). Em ambos os casos, tanto o teste D de Tajima quanto o teste F_s de Fu foram significativos, fato que é indício de eventos de expansão populacional.

A análise de estruturação entre as populações de cada margem do Rio Tietê, mostrou que há pequena divergência genética entre elas, $\Phi_{ct}=0,00099$ ($p=0,06549$). Isto pode ser indicativo de que há fluxo gênico entre as populações localizadas em cada margem do rio. Este fluxo gênico pode ser promovido e/ou potencializado pela ação antrópica. As populações dentro de cada grupo considerado, margens do Rio Tietê, apresentaram diferenciação genética moderada, $\Phi_{sc}=0,06709$ ($p=0,0$), enquanto que os indivíduos dentro de cada população (município) apresentaram elevada diferenciação genética, com $\Phi_{st}=0,43235$ ($p=0,0$). Foi observada significância estatística apenas para os parâmetros Φ_{sc} e Φ_{st} , o valor obtido para Φ_{ct} mostrou não significativo estatisticamente; considerando-se valores de $p<0,05$.

Tabela 8. Amostras das populações de *Chrysoperla externa* em ambas as margens do Rio Tietê, Estado de São Paulo, e seus respectivos dados referentes à estatística descritiva para o gene mitocondrial COI. N = número de indivíduos, S = número de sítios polimórficos, h = número de haplótipos, Hd = diversidade haplotípica, π = diversidade nucleotídica, k = número de diferenças nucleotídicas.

	N	S	h	Hd	π	k	Distância genética
Margem esquerda	46	21	18	0,833	0,00343	2,223	0,003
Margem direita	68	25	24	0,876	0,00356	2,311	0,004

Tabela 9. Testes de neutralidade realizados com sequências parciais do gene mitocondrial COI para populações de *Chrysoperla externa* que ocorrem na margem esquerda e direita do Rio Tietê, Estado de São Paulo.

	Fs de Fu	D de Tajima
Margem esquerda	-26,91039 (p=0,0)*	-1,73795 (p=0,01900)*
Margem direita	-26,96567 (p=0,0)*	-1,74443 (p=0,01500)*

*Resultados significativos com $p < 0,05$

V. DISCUSSÃO

As populações de *C. externa* analisadas demonstraram elevada diversidade genética, observada pelo número de sítios polimórficos, número de haplótipos e diversidade haplotípica. Esta elevada diversidade genética também foi observada para populações de *C. externa* coletadas no município de Jaboticabal, SP (MORALES & FREITAS, 2010). A variabilidade parece estar bem distribuída entre as populações, fato que é corroborado pela medida de distância genética e pelas redes haplotípicas (Figuras 4 e 5), sendo que nesta última análise é possível observar dois haplótipos que se encontram presentes nos doze municípios amostrados.

A árvore de similaridade genética *Neighbor-Joining* (Figura 3) também mostra que as populações analisadas são homogêneas, uma vez que populações coletadas em municípios distantes geograficamente foram agrupadas como sendo próximas

geneticamente, dentro da amplitude amostrada. Algumas populações agrupadas estão bem distantes geograficamente, em alguns casos as populações estão separadas pelo Rio Tietê, como é o caso das populações de Lucianópolis e Santa Ernestina, distantes 158,2 km, e Agudos e Descalvado, distantes 154,5 km (Tabela 3). Desta forma, esta análise corrobora que a elevada variabilidade genética está bem distribuída entre estas populações, podendo ser consideradas homogêneas. Isto explicaria o fato de que municípios tão distantes, e alguns até mesmo separados pelo Rio Tietê, tenham sido considerados geneticamente próximos pela análise. Esta observação pode ser corroborada também pelos baixos valores de distanciamento genético entre as populações dos municípios (Tabela 2).

A elevada variabilidade genética e sua ampla distribuição nas populações de *C. externa* analisadas, podem ter mascarado o resultado da *Mismatch Distribution*, uma vez que os testes de neutralidade detectaram eventos de expansão populacional. Para tanto, é possível inferir que a elevada variabilidade genética não permite que o tamanho das populações de *C. externa* seja reduzido em função da pressão seletiva exercida pela citricultura. Desta forma, quando a população sofre um processo de expansão praticamente toda a sua variabilidade genética é levada com os indivíduos e, portanto, não há perda de variabilidade, como seria esperado pelo efeito de deriva genética. Uma vez que a *Mismatch Distribution* baseia-se na distribuição de diferenças nucleotídicas pareadas entre indivíduos para detectar eventos demográficos, a expansão populacional pode não ter sido observada porque a variabilidade genética tem se mantido constante.

A possibilidade de que tenham ocorrido eventos de expansão populacional é comprovada pelos resultados dos testes de neutralidade D de Tajima e F_s de Fu, que apresentam suporte estatístico mais consistente do que a análise *Mismatch Distribution* para detectar eventos demográficos, especialmente o teste F_s de Fu (RAMOS-ONSINS & ROZAS, 2002).

A homogeneização entre as populações pode existir graças ao fluxo gênico e há fortes evidências de que ele ocorra. Os valores obtidos para os parâmetros Φ_{sc} e Φ_{ct} na AMOVA evidenciam que as populações estão estruturadas de forma que ocorra

fluxo gênico. A elevada divergência genética detectada nos indivíduos dentro das populações (Φ_{st}) pode ser em decorrência da variabilidade genética observada e não pela ausência de fluxo gênico, pois se ocorre fluxo gênico entre as populações é provável que ele também aconteça entre os indivíduos da mesma população.

Outro indício de fluxo gênico é o resultado da análise filogeográfica, em que a hipótese nula não pôde ser rejeitada, portanto, os clados/haplótipos estão distribuídos aleatoriamente nas localidades, sem associação geográfica. Apenas o clado 1-16 detectado na rede haplotípica (Figura 5) teve um resultado distinto. Para os indivíduos/haplótipos aninhados neste clado foi detectado fluxo gênico restrito por distância. Contudo, o clado 1-16 está agrupado com outros clados que não apresentam associação geográfica entre seus haplótipos e as localidades amostradas. Desta forma, pode-se inferir duas hipóteses na tentativa de explicar este fato, a primeira seria de que as populações analisadas podem estar apresentando um início de estruturação, em que apenas alguns indivíduos tem fluxo gênico restrito por distância, a segunda hipótese, e que parece mais provável devido aos demais resultados obtidos, seria de que o agroecossistema (citros) e suas práticas culturais, aliados à influência antrópica, estão apagando a estruturação que havia entre estas populações antes do surgimento da agricultura, contribuindo para sua homogeneização.

Com relação a análise considerando as populações em cada margem do Rio Tietê, a AMOVA também mostrou evidências de fluxo gênico, pois os valores de Φ_{sc} e Φ_{ct} são indícios de baixa divergência genética, enquanto que o valor de Φ_{st} indicou grande diferenciação genética. Este último resultado provavelmente é o reflexo da variabilidade genética observada e não devido à ausência de fluxo gênico, como já discutido anteriormente. Assim, o Rio Tietê, enquanto barreira geográfica, pode não ter sido relevante para a colonização desta área e para o estabelecimento deste padrão entre as populações analisadas.

Além da evidência de fluxo gênico entre as populações, há ainda outras possibilidades que poderiam explicar tal proximidade genética entre as populações amostradas, como a ação antrópica, as correntes de ar, a proximidade das fazendas com matas nativas e o elevado potencial reprodutivo de *C. externa*.

A influência da ação antrópica na homogeneização das populações poderia ocorrer no intercâmbio de mudas de citros. Tanto entre os viveiros produtores de mudas e as fazendas e até mesmo entre as fazendas, pois nas mudas podem haver ovos, larvas e pupas de crisopídeos que são levados de um local para outro. A influência dos efeitos da dispersão antropogênica já foram observados e verificados em outros organismos como para *Ephestia kuehniella* (Lepidoptera: Pyralidae), praga de grãos de armazenados (RYNE & BENSCH, 2008), e para alguns insetos fitófagos (OLIVER, 2006; ALVAREZ et al. 2007).

Quanto à influência das correntes de ar na dispersão, os ventos tendem a exercer efeitos locais, exceto em tempestades violentas, durante as quais os organismos podem ser amplamente disseminados. Mesmos os mecanismos passivos de dispersão não são necessariamente ao acaso ou aleatórios. Invertebrados aéreos, por exemplo, ocupam diferentes estratos, assim é comum que apresentem diferentes tendências quanto à dispersão pelos ventos (BROWN & LOMOLINO, 2006). Estudos sobre a atividade de vôo com *Chrysoperla carnea* (Stephens, 1836) mostraram que em determinadas altitudes a velocidade dos ventos é superior ao potencial de vôo, assim, a direção do vôo é a favor das correntes de ar independentemente do curso de vôo do indivíduo. Portanto, a distância do vôo é em função da velocidade dos ventos, ângulo entre a direção dos ventos e o curso de vôo e duração do vôo (DUELLI, 1986). Desta forma, os indivíduos de *C. externa* também poderiam ser levados de um local para outro através das correntes de ar contribuindo assim para a homogeneização das populações, desde que se fixem no novo local.

O mosaico de habitats ao redor do agroecossistema pode ser importante para a dinâmica das populações de inimigos naturais afetando-as de diversas formas, entretanto a magnitude destes efeitos está relacionada à habilidade de dispersão e comportamento das espécies. Na ausência de artrópodes-praga (alimento) no agroecossistema os inimigos naturais poderiam migrar para outros ambientes, na busca por recursos essenciais para sua sobrevivência e reprodução (ELLIOTT et al. 2002). Desta forma, as matas nativas próximas às fazendas podem ser consideradas como reservatório de diversidade genética para *C. externa*, atuando como refúgio para as

populações. Neste local os indivíduos que não são capazes de sobreviver sob as condições impostas pelas práticas culturais no citros poderiam se estabelecer. Além disso, na falta de alimento disponível no agroecossistema os indivíduos poderiam retornar e sobreviver na mata nativa enquanto as condições de normalidade não são restabelecidas. A influência do mosaico de habitats pode estar presente no resultado obtido como inferência filogeográfica para o clado 1-16, em que foi observado que há fluxo gênico restrito por distância entre os indivíduos/haplótipos aninhados neste clado. Os haplótipos aninhados neste clado estão distribuídos em todos os municípios amostrados, e o fluxo gênico entre estas populações pode ser restrito devido à presença de habitats menos favoráveis à sua sobrevivência.

Os insetos são geneticamente capazes de se adaptar e evoluir dentro de um contexto ecológico, de forma que as mudanças podem acontecer muito rapidamente, em alguns casos podem aparecer em poucas gerações. Isto é possível, pois, com relação à outros grupos animais, os insetos possuem elevadas taxas de reprodução (LOXDALE, 2010). A capacidade reprodutiva de *C. externa* já foi verificada por meio de diversos estudos. Fêmeas cujas fases imaturas foram alimentadas com *Planococcus citri* (Risso, 1813) (Hemiptera: Pseudococcidae) foram capazes de ovipositar aproximadamente 293 ovos em 40 dias de oviposição com 82% de viabilidade (BEZERRA et al. 2006). Entretanto, fêmeas cujas fases imaturas foram alimentadas com ovos de *Sitotroga cerealella* (Oliver, 1819) (Lepidoptera: Gelechiidae), ovipositaram em média 372 ovos em aproximadamente 26 dias de oviposição (ANGELINI & FREITAS, 2004). Tais resultados evidenciam que a capacidade reprodutiva da espécie é elevada e eficiente. Fazendo-se estimativa de que dos 372 ovos ovipositados apenas 50% deles cheguem a fase adulta e que 50% dos adultos sejam fêmeas, teremos 93 fêmeas ovipositando em média 372 ovos cada uma. Desta forma, pode-se inferir que, mesmo que as populações de *C. externa* modifiquem-se geneticamente de forma rápida, qualquer alteração na frequência gênica pode ser rapidamente observada na prole em função do número elevado de ovos colocados. Portanto, as populações são capazes de se homogeneizarem rapidamente.

Apesar do efeito homogeneizador do fluxo gênico ter sido detectado por várias análises, um parâmetro em específico parece trazer à tona também o efeito diversificador da deriva genética: o número de migrantes (N_m). O valor de N_m é interpretado com uma média por geração estimada do número absoluto de migrantes trocados entre populações. Valores de N_m menores que 1 são indicativos de que o efeito diversificador da deriva genética se sobrepõe à influência homogeneizadora do fluxo gênico (AVISE, 2000), e o N_m observado para as populações analisadas foi de -130,56.

A partir deste resultado é possível inferir que este efeito diversificador remete ao período em que estas populações habitavam ecossistemas nativos, antes do estabelecimento e expansão da agricultura. O ecossistema nativo é um ambiente heterogêneo, onde havia barreiras entre estas populações reduzindo suas chances de homogeneização. Com a agricultura, este ambiente heterogêneo foi substituído por um ambiente totalmente homogêneo, como a citricultura aqui discutida, que possibilitou o contato entre as populações. Assim, o grande número de haplótipos observados pode ser explicado por esta condição em que havia segregação/estruturação, e atualmente todos os indivíduos/haplótipos podem conviver em uma mesma área.

A manutenção do tamanho efetivo da população é garantida pela grande quantidade de alimento (artrópodes-praga) disponível no citros, e isto contribui para que ocorram eventos de expansão populacional, detectados pelos testes de neutralidade. Desta forma é possível inferir que a citricultura favorece a sobrevivência de *C. externa*, enquanto que no ecossistema nativo, o ambiente é heterogêneo e o alimento disponível não é tão abundante quanto no citros.

Quanto à estruturação destas populações, a hipótese mais provável é a que considera que o agroecossistema (citros), suas práticas culturais e a ação antrópica podem estar apagando a estruturação que havia entre estas populações antes do surgimento da agricultura. A citricultura consiste em um ambiente homogêneo, ocupando extensas áreas permitindo a dispersão destes indivíduos e promovendo o fluxo gênico entre as populações; as pressões seletivas exercidas pela citricultura provavelmente são semelhantes em todas as fazendas, favorecendo assim a

homogeneização destas populações. Desta forma, é de fundamental importância que as populações de *C. externa* sejam estudadas em ecossistemas nativos, para que se possa compreender a dinâmica genética desta espécie em seu habitat de origem e sem a influência da ação antrópica.

VI. CONCLUSÕES

- As populações de *C. externa* analisadas apresentam elevada variabilidade genética amplamente distribuída entre as populações;
- Há fluxo gênico entre as populações de *C. externa* analisadas e entre as populações de cada lado da margem do Rio Tietê, portanto este não constitui barreira geográfica;
- É possível que a estruturação observada entre as populações de *C. externa* analisadas seja um resquício do que havia entre elas quando habitavam ecossistemas nativos, pois com a agricultura, o ambiente heterogêneo foi substituído por um ambiente homogêneo em que há menos barreiras impedindo o contato entre estas populações, permitindo assim sua homogeneização;
- É de fundamental importância realizar estudos envolvendo populações de *C. externa* coletadas em ecossistemas nativos para que elas possam ser compreendidas em seu habitat de origem e sem a influência da ação antrópica;
- De acordo com as informações obtidas por meio de sequências do gene mitocondrial COI, caso sejam necessárias liberações de indivíduos de *C. externa* para controle biológico de pragas agrícolas, as fazendas de citros localizadas nos municípios amostrados poderiam compartilhar liberações da mesma população. Contudo, é imprescindível que sejam realizados estudos considerando-se outros genes assim como certas características biológicas, tais como, capacidade de busca, preferência alimentar e capacidade de predação.

VII. REFERÊNCIAS

ADAMS, P. A.; PENNY, N. D. Neuroptera of the Amazon Basin - Introduction and Chrysopini. **Acta Amazonica**, Manaus, v. 15, n. 3-4 p. 413-479, 1985.

ALBUQUERQUE, G. S.; TAUBER, C. A.; TAUBER, M. J. *Chrysoperla externa* (Neuroptera: Chrysopidae): life history and potencial for biological control in Central and South América. **Biological Control**, Orlando, v. 4, n. 1, p. 8-13, 1994.

ALVAREZ, N., HOSSAERT-MCKEY, M.; RESTOUX, G.; DELGADO-SALINAS, A.; BENREY, B. Anthropogenic effects on population genetics of phytophagous insects associated with domesticated plants. **Evolution**, Lancaster, v. 61, n. 12, p. 2986-2996, 2007.

ANGELINI, M. R.; FREITAS, S. Desenvolvimento pós-embrionário e potencial reprodutivo de *Chrysoperla externa* (Hagen) (Neuroptera: Chrysopidae), alimentada com diferentes quantidades de ovos de *Sitotroga cerealella* (Lepidoptera: Gelechiidae). **Acta Scientiarum Agronomy**, Maringá, v. 26, p. 395-399, 2004.

AOKI, K.; KATO, M.; MURAKAMI, N. Glacial bottleneck and postglacial recolonization of a seed parasitic weevil, *Curculio hilgendorfi*, inferred from mitochondrial DNA variation. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 17, n. 14, p. 3276-3289, 2008.

AVISE, J. C. Phylogeography: retrospect and prospect. **Journal of Biogeography**, Oxford, v. 36, p. 3-15, 2009.

AVISE, J. C. **Phylogeography**: The history and formation of species. Cambridge: Harvard University Press, 2000. 447 p.

BALLARD, J. W. O.; WHITLOCK, M. C. The incomplete natural history of mitochondria. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 13, n. 4, p. 729-744, 2004.

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.

BERGAMASCHI, S.; DAWES-GROMADZKI, T. Z.; LUCHETTI, A.; MARINI, M.; MANTOVANI, B. Molecular taxonomy and phylogenetic relationships among Australian *Nasutitermes* and *Tumulitermes* genera (Isoptera, Nasutitermitinae) inferred from mitochondrial COII and 16S sequences. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, Orlando, v. 45, p. 813–821, 2007.

BEZERRA, G. C. D.; SANTA-CECÍLIA, L. V. C.; CARVALHO, C. F.; SOUZA, B. Aspectos biológicos da fase adulta de *Chrysoperla externa* (Hagen, 1861) (Neuroptera: Chrysopidae) oriunda de larvas alimentadas com *Planococcus citri* (Risso, 1813) (Hemiptera: Pseudococcidae). **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 30, n. 4, p. 603-610, 2006.

BROOKS, S. J.; BARNARD, P. C. The green lacewings of the world: a generic review (Neuroptera: Chrysopidae). **Bulletin British Museum Natural History (Entomology)**, London, v. 59, p. 117-286, 1990.

BROWN, J. H.; LOMOLINO, M. V. **Biogeografia**. Ribeirão Preto: FUNPEC, 2006. 691 p.

CANARD, M.; SÉMÉRIA, Y.; NEW, T. R. **Biology of Chrysopidae**. The Hague: Dr W. Junk Publishers, 1984. 294 p.

CLEMENT, M.; POSADA, D.; CRANDALL, K. A. TCS: a computer program to estimate gene genealogies. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 9, n. 10, p. 1657-1659, 2000.

CROZIER, R. H.; CROZIER, Y. C. The mitochondrial genome of the honeybee *Apis mellifera*: complete sequence and genome organization. **Genetics**, Austin, v. 133, p. 97-117, 1993.

DUELLI, P. Flight activity patterns in lacewings (Planipennia: Chrysopidae). In: GEPP, J.; ASPÖCK, H.; HÖLZEL, H. **Recent Research in Neuropterology**. Áustria, 1986. p. 165 – 170.

ELLIOTT, N. C.; KIECKHEFER, R. W.; MICHELS, JR. G. J.; GILES, K. L. Predator abundance in alfalfa fields in relation to aphids, within-field vegetation, and landscape matrix. **Environmental Entomology**, College Park, v. 31, n. 2, p. 253-260, 2002.

EXCOFFIER, L.; LISCHER, E. H. E. L. Arlequin suite ver 3.5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. **Molecular Ecology Resources**, Oxford, v. 10, n. 3, p. 564-567, 2010.

FREELAND, J. R.; MAY, M.; LODGE, R.; CONRAD, K. F. Genetic diversity and widespread haplotypes in a migratory dragonfly, the common green darner *Anax junius*. **Ecological Entomology**, London, v. 28, p. 413-421, 2003.

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

FREITAS, S. O uso de crisopídeos no controle biológico de pragas. In: PARRA, J. R. P.; BOTELHO, P. S. M.; CORRÊA-FERREIRA, B. S.; BENTO, J. M. S. **Controle biológico no Brasil: parasitóides e predadores**. São Paulo: Editora Manole, 2002. p. 209-224.

FROHLICH, D. R.; TORRES-JEREZ, I.; BEDFORD, I. D.; MARKHAM, P. G.; BROWN, J. K. A phylogeographical analysis of the *Bemisia tabaci* species complex based on mitochondrial DNA markers. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 8, p. 1683-1691, 1999.

FU, Y. X. Statistical tests of neutrality of mutations against population growth, hitchhiking and background selection. **Genetics**, Austin, v. 147, n. 2, p. 915-925, 1997.

GEODIS HOME PAGE. Disponível em <<http://darwin.uvigo.es/software/geodis.html>>. Acesso em 17 de fevereiro de 2011.

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

HARUYAMA, N.; NAKA, H.; MOCHIZUKI, A.; NOMURA, M. Mitochondrial phylogeny of cryptic species of the lacewing *Chrysoperla nipponensis* (Neuroptera: Chrysopidae) in

Japan. **Annals of the Entomological Society of America**, College Park, v. 101, n. 6, p. 971-977, 2008.

HICKERSON, M. J.; CARSTENS, B. C.; CAVENDER-BARES, J.; CRANDALL, K. A.; GRAHAM, C. H.; JOHNSON, J. B.; RISSLER, L.; VICTORIANO, P. F.; YODER, A. D. Phylogeography's past, present, and future: 10 years after Avise, 2000. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, Orlando, v. 54, p. 291-301, 2010.

HOY, M. A. Nuclear and extranuclear DNA in insects. In: _____. **Insect Molecular Genetics: An Introduction to Principles and Applications**. San Diego: Elsevier Science, 2003. p. 50-76.

HUDSON, R. R.; SLATKIN, M.; MADDISON, W. P. Estimation of levels of gene flow from DNA sequence data. **Genetics**, Austin, v. 132, n. 2, p. 583-589, 1992.

HUFBAUER, R. A.; BOGDANOWICZ, S. M.; HARRISON, R. G. The population genetics of a biological control introduction: mitochondrial DNA and microsatellite variation in native and introduced populations of *Aphidius ervi*, a parasitoid wasp. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 13, p. 337-348, 2004.

HUFBAUER, R. A.; RODERICK, G. K. Microevolution in biological control: Mechanisms, patterns, and processes. **Biological Control**, Orlando, v. 35, p. 227-239, 2005.

KIM, I.; LEE, E. M.; SEOL, K. Y.; YUN, E. Y.; LEE, Y. B.; HWANG, J. S.; JIN, B. R. The mitochondrial genome of the Korean hairstreak, *Coreana raphaelis* (Lepidoptera: Lycaenidae). **Insect Molecular Biology**, Oxford, v. 15, n. 2, p. 217-225, 2006.

KINGMAN, J. F. C. The coalescent. **Stochastic Processes and their Applications**, Amsterdam, v. 13, p. 235-248, 1982.

LEWTER, J. A.; SZALANSKI, A. L.; NAGOSHI, R. N.; MEAGHER, R. L.; OWENS, C. B.; LUTTRELL, R. G. Genetic variation within and between strains of the fall armyworm, *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). **Florida Entomologist**, Gainesville, v. 89, n. 1, p. 63-68, 2006.

LI, J.; ZHAO, F.; CHOI, Y. S.; KIM, I.; SOHN, H. D.; JIN, B. R. Genetic variation in the diamondback moth, *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Yponomeutidae) in China inferred from mitochondrial COI gene sequence. **European Journal of Entomology**, Branisovska, v. 103, p. 605-611, 2006.

LIBRADO, P.; ROZAS, J. DnaSP v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. **Bioinformatics**, Oxford, v. 25, p. 1451-1452, 2009.

LOPES, I. F. **Variabilidade genética em populações de *Jabiru mycteria* (Lichtenstein, 1819) e *Mycteria americana* (Linnaeus, 1758) (Aves, Ciconiidae): fluxo gênico e filogeografia**. 2006. 106 f. Tese (Doutorado em Genética e Evolução) - Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2006.

LOXDALE, H. D. Rapid genetic changes in natural insect populations. **Ecological Entomology**, London, v. 35, p. 155-164, 2010.

MAYR, E. A estrutura populacional da espécie. In: _____. **Populações, espécies e evolução**. São Paulo: Editora Nacional, 1977a. p. 229-250.

MAYR, E. Variação e genética da população. In: _____. **Populações, espécies e evolução**. São Paulo: Editora Nacional, 1977b. p. 87-111.

MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE. Disponível em <<http://mapas.mma.gov.br/i3geo/aplicmap/geral.htm?cb94d492f4d521b0836597968cd446c1>>. Acesso em 21 de fevereiro de 2011.

MORALES, A. C.; FREITAS, S. Haplotype characterization of the COI mitochondrial gene in *Chrysoperla externa* (Neuroptera: Chrysopidae) from different environments in Jaboticabal, state of São Paulo, southeastern Brazil. **Brazilian Journal of Biology**, São Carlos, v. 70, n. 4, p. 1115-1121, 2010.

MOUSSET, S.; DEROME, N.; VEUILLE, M. A test of neutrality and constant population size based on the Mismatch Distribution. **Molecular Biology and Evolution**, Chicago, v. 21, n. 4, p. 724-731, 2004.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Lehninger**: Princípios de Bioquímica. 3. ed. New York: W. H. Freeman and Company, 2002. 1009 p.

ODUM, E. P.; BARRETT, G. W. Ecologia de Populações. In: _____. **Fundamentos de Ecologia**. São Paulo: Thomson, 2007. p. 224-281.

OLIVER, J. C. Population genetic effects of human-mediated plant range expansions on native phytophagous insects. **Oikos**, Copenhagen, v. 112, n. 2, p. 456-463, 2006.

PAGE, R. D. M.; HOLMES, E. C. **Molecular Evolution**: A phylogenetic approach. Oxford: Blackwell Science, 1998. 352 p.

PANCHAL, M. The automation of Nested Clade Phylogeographic Analysis. **Bioinformatics**, Oxford, v. 23, n. 4, p. 509-510, 2007.

POSADA, D.; CRANDALL, K. A. Intraspecific gene genealogies: trees grafting into networks. **Trends in Ecology and Evolution**, Amsterdam, v. 16, n. 1, p. 37-45, 2001.

POSADA, D.; CRANDALL, K. A.; TEMPLETON, A. R. GeoDis: a program for the cladistic nested analysis of the geographical distribution of genetic haplotypes. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 9, n. 4, p. 487-488, 2000.

POSADA, D.; CRANDALL, K. A.; TEMPLETON, A. R. Nested clade analysis statistics. **Molecular Ecology Notes**, Oxford, v. 6, p. 590-593, 2006.

RAMOS-ONSINS, S. E.; ROZAS, J. Statistical Properties of new neutrality tests against population growth. **Molecular Biology and Evolution**, Chicago, v. 19, n. 12, p. 2092-2100, 2002.

RICKLEFS, R. E. Estruturas Populacionais. In: _____. **A Economia da Natureza**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2003. p. 235-249.

RIDLEY, M. Seleção Natural e Variação. In: _____. **Evolução**. Porto Alegre: Artmed, 2006. p. 101-121.

ROGERS, A. R.; HARPENDING, H. Population growth makes waves in the distribution of pairwise genetic differences. **Molecular Biology and Evolution**, Chicago, v. 9, n. 3, p. 552-569, 1992.

ROSENBERG, N. A.; NORDBORG, M. Genealogical trees, coalescent theory and the analysis of genetic polymorphisms. **Nature Reviews Genetics**, London, v. 3, n. 5, p. 380-390, 2002.

RYNE, C.; BENSCH, S. Do anthropogenic transports facilitate stored-product pest moth dispersal? A molecular approach. **Naturwissenschaften**, Berlin, v. 95, n. 2, p. 155-159, 2008.

SAITOU, N.; NEI, M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. **Molecular Biology and Evolution**, Chicago, v. 4, n. 4, p. 406-425, 1987.

SCHREY, N. M.; REEVE, J. D.; ANDERSON, F. E. Mitochondrial DNA analysis of the bark beetle predator *Thanasimus dubius* F. (Coleoptera: Cleridae) reveals regional genetic differentiation. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 14, p. 3317-3324, 2005.

SIMON, C.; FRATI, F.; BECKENBACH, A.; CRESPI, B.; LIU, H.; FLOOK, P. Evolution, weighting, and phylogenetic utility of mitochondrial gene sequences and a compilation of conserved Polymerase Chain Reaction primers. **Annals of the Entomological Society of America**, College Park, 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, suppl. 2, p. 301-310, 2002.

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

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

TEMPLETON, A. R. Nested clade analyses of phylogeographic data: testing hypotheses about gene flow and population history. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 7, n. 4, p. 381-397, 1998.

TEMPLETON, A. R. Statistical phylogeography: methods of evaluating and minimizing inference errors. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 13, p. 789-809, 2004.

TEMPLETON, A. R.; BOERWINKLE, E.; SING, C. F. A Cladistic analysis of phenotypic associations with haplotypes inferred from restriction endonuclease mapping. I. Basic theory and an analysis of alcohol dehydrogenase activity in *Drosophila*. **Genetics**, Austin, v. 117, n. 2, p. 343-351, 1987.

TEMPLETON, A. R.; CRANDALL, K. A.; SING, C. F. A Cladistic analysis of phenotypic associations with haplotypes inferred from restriction endonuclease mapping and DNA sequence data. III. Cladogram estimation. **Genetics**, Austin, v. 132, n. 2, p. 619-633, 1992.

TEMPLETON, A. R.; ROUTMAN, E.; PHILLIPS, C. A. Separating population structure from population history: A cladistic analysis of the geographical distribution of mitochondrial DNA haplotypes in the tiger salamander, *Ambystoma tigrinum*. **Genetics**, Austin, v. 140, n. 2, p. 767-782, 1995.

VANDERGAST, A. G.; BOHONAK, A. J.; WEISSMAN, D. B.; FISHER, R. N. Understanding the genetic effects of recent habitat fragmentation in the context of

evolutionary history: phylogeography and landscape genetics of a southern California endemic Jerusalem cricket (Orthoptera: Stenopelmatidae: *Stenopelmatus*). **Molecular Ecology**, Oxford, v. 16, n. 5, p. 977-992, 2007.

VANDEWOESTIJNE, S.; BAGUETTE, M.; BRAKEFIELD, P. M.; SACCHERI, I. J. Phylogeography of *Aglaia urticae* (Lepidoptera) based on DNA sequences of the mitochondrial COI gene and control region. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, Orlando, v. 31, n. 2, p. 630-646, 2004.

WINTERTON, S.; FREITAS, S. Molecular phylogeny of the green lacewings (Neuroptera: Chrysopidae). **Australian Journal of Entomology**, Canberra, v. 45, p. 235-243, 2006.

APÊNDICE

APÊNDICE A – SEQUÊNCIAS DO GENE MITOCONDRIAL COI

[illegible]

1107	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	C..	...	...	...
1108	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	C..	...	...	...
1109	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	C..	...	...	...
1110	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	C..	...	...	...
1111	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	C..	...	...	...
1112	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	C..	...	...	...
1113	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	C..	...	...	...
1114	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	C..	...	...	...
1115	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	C..	...	...	...
1116	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
1117	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	C..	...	...	...
1118	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	C..	...	...	...
1119	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	C..	...	...	...
1120	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	C..	...	...	...
1121	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
1122	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	C..	...	...	...
1123	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	C..	...	...	...
1124	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	C..	...	...	...
1126	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	C..	...	...	...
1127	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	C..	...	...	...
1128	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	C..	...	...	...
1107	111	111	111	111	111	111	111	111	111	111	111	111	111	111	111	111	111	111	111	111
1108	000	000	011	111	111	112	222	222	333	333	344	444	444	444	555	555	666	666	677	777
1109	012	345	678	901	234	567	890	123	456	789	012	345	678	901	234	567	890	123	456	789
1110	AGC	TTA	TTT	TAC	TTC	AGC	TAC	TAT	AAT	TAT	TGC	TGT	GCC	TAC	TGG	AAT	TAA	GGT	ATT	TAG
1013	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
1014	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
1015	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
1016	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
1017	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
1018	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
1019	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
1020	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
1021	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	C..	...	...	C..
1022	...	...	...																	


```
1090 ... .. C..
1091 ... ..
1092 ... ..
1093 ... ..
1095 ... ..
1096 ... ..
1097 ... ..
1098 ... ..
1099 ... ..
1100 ... ..
1101 ... ..
1102 ... .. C..
1103 ... ..
1104 ... ..
1105 ... ..
1106 ... ..
1107 ... .. C..
1108 ... ..
1109 ... ..
1110 ... ..
1111 ... ..
1112 ... ..
1113 ... ..
1114 ... ..
1115 ... ..
1116 ... ..
1117 ... ..
1118 ... ..
1119 ... ..
1120 ... .. C..
1121 ... ..
1122 ... ..
1123 ... ..
1124 ... .. C..
1126 ... ..
1127 ... ..
1128 ... ..

122 222 222 222 222 222 222 222 222 222 222 222 222 222 222 222 222 222 222 222 222 222 222 222
900 000 000 001 111 111 111 222 222 222 233 333 333 444 444 444 555 555 566 666 666 667 777 777 777 888 888 888 899 999
901 234 567 890 123 456 789 012 345 678 901 234 567 890 123 456 789 012 345 678 901 234 567 890 123 456 789 012 345 678 901 234 567
ACC AGC TTT ATT ATG AAG TTT AGG ATT TGT ATT TTT ATT TAC TGG TGG ATT AAC AGG AGT TGT ATT AGC TAA TTC ATC AAT TGA TAT TAT TCT TCA
1013
1014
1015
1016
1017
1018
1019
1020
1021
1022
```


1110
1111
1112
1113
1114
1115
1116
1117
1118
1119
1120
1121
1122
1123
1124
1126
1127
1128

1013
1014
1015
1016
1017
1018
1019
1020
1021
1022
1023
1024
1025
1026
1027
1028
1029
1030
1031
1032
1033
1034
1035
1036
1037
1038
1039

[illegible]

[illegible]

[illegible]

[illegible]