

SYSTEMATICS, MORPHOLOGY AND PHYSIOLOGY

Caracterização Molecular de Populações de *Euseius citrifolius* Denmark & Muma e *Euseius concordis* (Chant) (Acari: Phytoseiidae) Utilizando o Sequenciamento das Regiões ITS1 e ITS2

ALOYSÉIA C.S. NORONHA¹, ADILSON MOTA², GILBERTO J. MORAES³ E LUIZ L. COUTINHO⁴

¹Embrapa Mandioca e Fruticultura, C. postal 007, 44380-000, Cruz das Almas, BA

²Embrapa Gado de Leite, Rua Eugênio do Nascimento, 610, 36038-330, Juiz de Fora, MG

³Pesquisador do CNPq, Depto. Entomol., Fitopatol. Zool. Agrícola, ⁴ Depto. Produção Animal. ESALQ/USP, C. postal 9, 13418-900, Piracicaba, SP

Neotropical Entomology 32(4):591-596 (2003)

Molecular Characterization of Mite Populations of *Euseius citrifolius* Denmark & Muma and *Euseius concordis* (Chant) (Acari: Phytoseiidae) Using Sequences of the ITS1 and ITS2 Regions

ABSTRACT - Mites have usually been identified by their morphological characteristics. However, morphological evidences are not always sufficient to distinguish between closely related species, leading taxonomists to consider additional ecological, biological and, more recently, molecular characteristics in this process. The molecular characterization of populations of *Euseius citrifolius* Denmark & Muma and *Euseius concordis* (Chant) was done by sequencing the internal transcribed spacers ITS1 and ITS2 using the P1 (5'-AGAGGAAGTAAAAGTCGTAACAAG-3') and P2 (5'-ATATGCTTAAATTCAGGGGG-3') primers, located in 18S and 28S regions of the ribosomal DNA. The following populations were characterized: *E. citrifolius*: Arroio do Meio-RS, Campinas-SP and Petrolina-PE; *E. concordis*: Arroio do Meio, Jaguariúna-SP, Pontes e Lacerda-MT, Petrolina and Viçosa-MG. The sequencing of ITS1 and ITS2 allowed the discrimination between the group of populations of *E. citrifolius* from *E. concordis*. The similarity between the sequences was more than 94%. Most of the variation between populations was observed more in ITS1 than in ITS2. The sequencing of ITS region helps the identification of phytoseiid species when the populations show cytoplasmatic incompatibility and need additional information.

KEY WORDS: Biological control, DNA, phytoseiid, predator

RESUMO - A identificação dos ácaros geralmente é feita com base nas características morfológicas. Entretanto, as evidências morfológicas nem sempre são suficientes para a distinção de espécies muito próximas, levando o taxonomista a considerar aspectos ecológicos, biológicos e, mais recentemente, as características moleculares. A caracterização molecular de populações de *Euseius citrifolius* Denmark & Muma e *E. concordis* (Chant) foi realizada com o sequenciamento da região dos espaçadores internos transcritos ITS1 e ITS2 utilizando-se os *primers* P1 (5'-AGAGGAAGTAAAAGTCGTAACAAG-3') e P2 (5'-ATATGCTTAAATTCAGGGGG-3'), localizados nas regiões 18S e 28S do DNA ribossomal, respectivamente. Foram caracterizadas as seguintes populações: *E. citrifolius*: Arroio do Meio-RS, Campinas-SP e Petrolina-PE; *E. concordis*: Arroio do Meio, Jaguariúna-SP, Pontes e Lacerda-MT, Petrolina e Viçosa-MG. O sequenciamento dos ITS1 e ITS2 permitiu separar os grupos de populações de *E. citrifolius* e de *E. concordis*. A similaridade entre as seqüências das duas espécies foi superior a 94%. Maior variação entre as populações foi observada no espaçador ITS1 que no espaçador ITS2. O sequenciamento da região ITS auxilia na identificação de fitoseídeos especialmente em casos de populações que apresentam incompatibilidade citoplasmática e que requeiram informações adicionais.

PALAVRAS-CHAVE: Controle biológico, DNA, fitoseídeo, predador

Ácaros da família Phytoseiidae são eficientes inimigos naturais de ácaros fitófagos e vêm sendo utilizados em condições de campo e de casa de vegetação, no controle de ácaros-praga (Rasmy & Ellaithy 1988, McMurtry 1992,

Bellotti *et al.* 1999). Moraes (1987) citou que a taxonomia é o ponto de partida para a introdução, conservação e incremento de agentes de controle biológico. A identificação de fitoseídeos é usualmente feita com base em características

morfológicas, entretanto, muitas vezes somente essas evidências não são suficientes para a distinção segura entre espécies semelhantes. Para o esclarecimento de possíveis dúvidas, aspectos ecológicos, biológicos e, mais recentemente, a caracterização molecular vêm sendo usados em complemento aos aspectos morfológicos para diferentes grupos de organismos. Alguns trabalhos na área da caracterização molecular vêm sendo realizados com ácaros (Navajas et al. 1992, 1994, 1997).

Um trabalho preliminar com fitoseídeos foi realizado por Navajas et al. (1999), para verificar o nível de variação nas seqüências da região dos espaçadores internos transcritos – ITS1 e ITS2 (do inglês, “Internal Transcribed Spacer”) do DNA ribossomal. As espécies estudadas foram *Neoseiulus californicus* (McGregor), *Neoseiulus fallaxis* (Garman), *Euseius concordis* (Chant), *Galendromus occidentalis* (Nesbitt), *Typhlodromus pyri* Scheuten e *Phytoseiulus persimilis* Athias-Henriot. Os autores verificaram que a região do espaçador ITS1 apresentou maior comprimento (303-404 pares de bases) e maior variação na seqüência de nucleotídeos que o espaçador ITS2 (80-89 pares de bases), sugerindo que a seqüência do espaçador ITS1 pode ser usada para identificação de espécies. Regiões espaçadoras evoluem rapidamente e de forma diferenciada entre populações, e podem ser usadas para diferenciar espécies ou populações de uma mesma espécie. Essas regiões vêm sendo seqüenciadas em diversos organismos (Torres et al. 1990; Hoy 1994; Navajas et al. 1994, 1997; Ciociola Junior et al. 2001).

Apesar das variações encontradas por Noronha & Moraes (2002a), não foi possível estabelecer uma diferenciação morfológica segura entre três populações de *Euseius citrifolius* Denmark & Muma e cinco populações de *E. concordis*. Entretanto, permitiu a diferenciação das populações de *E. citrifolius* de Petrolina e de *E. concordis* de Jaguariúna das demais populações estudadas correspondentes. Resultados de testes de cruzamentos realizados Noronha (2002) e Noronha & Moraes (2002b) mostraram certo grau de incompatibilidade reprodutiva entre populações de *E. citrifolius*, e a ocorrência de incompatibilidade reprodutiva parcial ou total entre algumas populações de *E. concordis*. Para uma conclusão nesse aspecto, um estudo em nível molecular pode fornecer importantes subsídios para o conhecimento das variações moleculares nestas populações.

Neste trabalho o conhecimento das variações moleculares em populações de *E. citrifolius* e *E. concordis* foi realizado envolvendo a amplificação e o seqüenciamento dos espaçadores internos transcritos (ITS1 e ITS2) do DNA ribossomal.

Material e Métodos

Foram estudadas duas espécies de fitoseídeos com espécimes procedentes das seguintes populações: *E. citrifolius* coletados em Arroio do Meio-RS, Campinas-SP e Petrolina-PE; *E. concordis* coletados em Arroio do Meio, Jaguariúna-SP, Pontes e Lacerda-MT, Petrolina e Viçosa-MG.

Fêmeas de cada população foram individualizadas em tubos de microcentrífuga (0,5 ml) e conservadas a -80°C. A

extração de DNA foi realizada seguindo o protocolo descrito por Navajas et al. (1999), com pequenas modificações. Fêmeas individualizadas no interior de tubos de microcentrífuga (1,5 ml) foram maceradas a seco. Cada tubo recebeu 200 µl do tampão de extração (2% CTAB, 1,4 M NaCl, 0,2% 2-β mercaptoetanol, 20 mM EDTA, 100 mM Tris-HCl pH 8,0) e foi mantido em banho-maria a 60°C por 20 min. Em cada amostra, foram adicionados 200 µl da mistura clorofórmio e álcool isoamílico (24:1), sendo o material centrifugado por 15 min. a 11.000 g à temperatura ambiente. O sobrenadante foi transferido para novo tubo, com o DNA precipitado pela adição de igual volume de isopropanol gelado e incubado a -20°C por 1h. Em seguida, o material foi centrifugado por 10 min. a 11.000 g e o sobrenadante descartado. O precipitado foi lavado com 500 µl de etanol 75%, centrifugado por 15 min. a 11.000 g, seco ao ar e ressuspenso em 20 µl de água Milli Q.

Na reação para amplificação das regiões ITS1 e ITS2 foram usados os primers citados por Navajas et al. (1999), P1 (5'-AGAGGAAGTAAAAGTCGTAACAAG-3') e P2 (5'-ATATGCTTAAATTCAGGGGG-3'), localizados nas regiões 18S e 28S do DNAr, respectivamente. Cada reação foi feita num volume total de 50 µl, com 5 µl de amostra de DNA e 45 µl da mistura [5 µl do tampão de PCR 10X, 1 µl de dNTP (10 mM), 5 µl de cada “primer” (5 mM), 5 µl de MgCl₂ (2,5 mM), 0,5 µl de *Taq* polimerase (5U/ml) e 23,5 µl de água Milli Q autoclavada]. As amplificações foram realizadas em termociclador PCT-100 (M. J. Research), com programação consistindo de um ciclo de 1 min. a 94°C, 30 ciclos de 1 min. a 93°C, 1 min. a 50°C e 1 min. de 72°C, com um ciclo final de 5 min. a 72°C. Foram realizadas quatro reações de amplificação para cada amostra de DNA, constituída de 20 µl. O produto de cada reação de PCR foi analisado por eletroforese em gel de agarose a 1% corado com brometo de etídeo (10 mg/ml), e os géis visualizados sob luz UV.

Os produtos de PCR foram purificados utilizando o “Wizard® PCR Preps DNA Purification System”. No preparo das amostras para a purificação, foram usados cerca de 190 µl do produto de PCR de cada amostra de DNA, correspondentes às quatro reações de amplificação.

Os produtos de PCR purificados foram seqüenciados com o “DYEnamic™ ET Terminator Cycle Sequencing Kit” usando os mesmos primers utilizados nas reações de amplificação. Foram seqüenciadas três amostras de cada população para cada “primer”. Cada reação de seqüenciamento foi feita num volume total de 10 µl, correspondente a 4 µl do produto de PCR purificado (400 ng de DNA), 2 µl da mistura de reagentes do kit, 1,0 µl do “primer” e 3 µl de água Milli Q autoclavada. A reação foi conduzida em termociclador PCT-100, com a programação consistindo de 30 ciclos de 20 s a 95°C, 15 s a 50°C e 1 min. a 60°C, e um ciclo final de 5 min. a 4°C.

Após a reação, o DNA foi precipitado pela adição de 1 ml do tampão acetato de sódio/EDTA (acetato de sódio 1,5M, pH > 8, 250 mM EDTA) e 40 µl de etanol 95%. O material foi homogeneizado e centrifugado a 12.000 g por 15 min. Após a retirada do álcool foram adicionados 250 µl de etanol 70%, centrifugando-se a amostra a 12.000 g por 5 min. e retirando-se posteriormente o álcool. O precipitado foi ressuspenso em 4 µl de tampão de formamida. As amostras foram submetidas à

eletroforese em gel de acrilamida 5% por 10h no seqüenciador automático de DNA ABI 377 (Applied Biosystems).

No alinhamento de todas as seqüências obtidas para cada “primer”, foram utilizados os programas Phred/Phrap/Consed (University of Washington). As seqüências obtidas para cada população foram comparadas com seqüências de fitoseideos disponíveis no banco de dados do “National Center for Biotechnology Information – NCBI” (GenBank) (www.ncbi.nlm.nih.gov) através do programa BLAST (Basic Local Alignment Search Tool).

Resultados

Com o alinhamento das seqüências obtidas para cada reação de seqüenciamento, verificou-se a formação de dois conjuntos de alinhamentos distintos, um conjunto formado pelas seqüências dos indivíduos das populações de *E. citrifolius* e outro formado pelas populações de *E. concordis*. A similaridade entre as seqüências das duas espécies foi superior a 94%. A região do espaçador ITS1 apresentou maior comprimento (282 a 305 pares de bases) na seqüência de nucleotídeos que o espaçador ITS2 (83 pares de bases). As

diferenças mais marcantes foram encontradas no espaçador ITS1. Comparando-se as seqüências do ITS1 das populações de *E. citrifolius* de Arroio do Meio e Campinas, e de *E. concordis* de Arroio do Meio, Jaguariúna, Pontes e Lacerda e Viçosa foram encontrados 11 polimorfismos. Maior variação no ITS1 foi verificada comparando-se as seqüências de *E. citrifolius* de Arroio do Meio e Campinas e *E. concordis* de Petrolina, com 14 polimorfismos. Como esperado, as seqüências do gene 5,8S apresentaram 100% de similaridade entre todas as populações das duas espécies. Poucas variações entre as seqüências das duas espécies foram encontradas no espaçador ITS2, com um polimorfismo e similaridade de 98% entre as seqüências. Os polimorfismos foram detectados em seqüências que não apresentaram diferenças nas reações de seqüenciamento, com bases de alta qualidade tratando-se provavelmente de variações dentro de uma mesma espécie.

Comparando-se as seqüências das populações de *E. citrifolius*, verifica-se que a população de Petrolina apresenta a ocorrência de quatro variações no espaçador ITS1 e uma variação no espaçador ITS2 em relação às demais populações (Fig. 1).

		ITS1							
		10	20	30	40	50	60	70	80
R		ACCTGCGGAA	GGATCATTAC	TGATTGAAAA	TCCATTCACT	ACCCCGTTAG	GGGCGAATGG	TGCGTGTATG	ATGCTCTATC
S		***.....
P		*****	*****	**.....
R		TTAGACTCCT	GCAGACCGGC	GAATCGCTGG	GAACTCGCTG	TCTTCGAGAG	GCATGTCAA	AACTTGTATT	TGATACGTAG
S	
P	
R		TGCGGTTTAC	TTGCGCTGTG	GCACGCTGCT	CAATTGCGGC	GTTACCCTTC	ACAGACGCGG	TGATGCGTGA	GTCGGTACAC
S	
P	T.....C.....
R		ATCCCGACAA	TACCTTTACT	TCGTTACGAA	GTCGTTTTGT	GCTATCGAGA	AGAAAAAAC	CAAGACTCAA	TATGGGGGAT
S	
P	C.....T.....
R		CACTTAGTCC	TTAAATCGAT	GAAAAACATA	GTAATTTGTG	GAAATTGATG	TGAGTTGTGA	AATTTTGTGA	GCATTGTGTT
S	
P	
R		TTTGAATGAA	AATTTAGCA	CGGACACTTC	TGTATCTGTG	CTACATTTGT	TTCAGTATAT	AAACCGAATC	ATAAGTATTT
S	
P	
		ITS2							
		490	500	510	520	530	540	550	560
R		ACCTTTGCTG	CAGCCCTTGT	CGGCACGCTA	TGCAATGGTA	TAAATTCTCA	TTGGTCACGA	GAGTGATACC	AACCCAACCA
S	
P	C.....
		28S							
		570	580						
R		TTATGACGTG	TATCTGAAA						
S							
P							

Figura 1. Alinhamento das seqüências das regiões ITS1, 5,8S e ITS2 do DNA ribossomal de populações de *E. citrifolius* procedentes de Arroio do Meio-RS (R), Campinas-SP (S) e Petrolina-PE (P) (*) trecho não seqüenciado, (.) caracteres idênticos com a primeira seqüência

Comparando-se as seqüências das populações de *E. concordis*, verifica-se que a região espaçadora ITS apresenta baixo nível de polimorfismo (Fig. 2). Foram encontradas três variações na população de Petrolina em relação às outras populações, duas constituídas por substituições de

nucleotídeos localizadas na região do espaçador ITS1 e uma pela introdução também nessa região de um espaço. Encontrou-se uma variação na região do espaçador ITS2 da população de Jaguariúna em relação às demais populações, correspondente à introdução de um espaço na seqüência

		ITS1							
		10	20	30	40	50	60	70	80
Y18270	R	ACCTGCGGAA	A---TTTTAC	TGATTAATAA	TCCATTCACT	ACCCATTAG	GG-CGAATGG	TGCGTGTATG	ATGCTCTATC
	S	ACCTGCGGAA	AGATCATTAC	TGATTAATAA	TCCATTCACT	ACCCATTAG	GGGCGAATGG	TGCGTGTATG	ATGTTCTATC
	M
	P
	V
		90	100	110	120	130	140	150	160
Y18270	R	TTAGACTCCT	GCAGACCGGC	GAATCGCTGG	GAACTCGCTG	TCTTCGAGAG	GCATGTTCAA	A-CTTGTATT	TGATACGTAG
	S	TTAGACTCCT	GCAGACCGGC	GAATCGCTGG	GAACTCGCTG	TCTTCGAGAG	GCATGTTCAA	AACCTTGTATT	TGATACGTAG
	M
	P
	V
		170	180	190	200	210	220	230	240
Y18270	R	TGCGGTTTAC	TTGCGTTTGTG	GCACGCTGCT	TAATTGCAGC	-TTACCGTCC	ACAGACGCG-	TGATGC-TGA	GTCGGTACAC
	S	TGCGGTTTAC	TTGCGTTTGTG	GCACGCTGCT	CAATTGCAGC	GTTACCGTCC	ACAGACGCGG	TGATGCCTGA	GTCGGTACAC
	M
	P	T.
	V
		250	260	270	280	290	300	310	320
Y18270	R	ATCC-GACAC	CATCTTTACT	TCGTCATGA-	GTCGTTT-GT	GCTATCGAGA	-GAAAAA--C	CAAGACTCAA	TATGGG--AT
	S	ATCCCGACAC	CACCTTTACT	TCGTCATGAA	GTCGTTTGT	GCTATCGAGA	AGAAAAAAAC	CAAGACTCAA	TATGGGGGAT
	M
	P	T.
	V
		330	340	350	360	370	380	390	400
Y18270	R	CACTTAGTCC	TTAAATCGAT	GAAAA-CATA	GTAATTGTG	GAAATTGATG	TGAGTTGTGA	AATTTTGTGA	GCATTGTGTT
	S	CACTTAGTCC	TTAAATCGAT	GAAAAACATA	GTAATTGTG	GAAATTGATG	TGAGTTGTGA	AATTTTGTGA	GCATTGTGTT
	M
	P
	V
		410	420	430	440	450	460	470	480
Y18270	R	TTTGAATGAA	AATTTTCAGCA	CGGACACTTC	TGTATCTGTG	CTACATTTGT	TTCAGTATAT	AAACCGAATC	ATAAGTATTT
	S	TTTGAATGAA	AATTTTCAGCA	CGGACACTTC	TGTATCTGTG	CTACATTTGT	TTCAGTATAT	AAACCGAATC	ATAAGTATTT
	M
	P
	V
		490	500	510	520	530	540	550	560
Y18270	R	ACCTTTGCTG	CAGCCCTCGT	CGGCACGCTA	TGCAATGGTA	TAAATTCTCA	TTGGTCACGA	GAGTGATACC	AACCCAACC-
	S	ACCTTTGCTG	CAGCCCTCGT	CGGCACGCTA	TGCAATGGTA	TAAATTCTCA	TTGGTCACGA	GAGTGATACC	AACCCAACCA
	M
	P
	V
		570	580						
Y18270	R	TTATGACGTG	TATCTGAAA						
	S	TTATGACGTG	TATCTGAAA						
	M	*****						
	P						
	V						

Figura 2. Alinhamento das seqüências das regiões ITS1, 5,8S e ITS2 do DNA ribossomal de populações de *Euseius concordis* procedentes de Arroio do Meio-RS (R), Jaguariúna-SP (S), Pontes e Lacerda-MT (M), Petrolina-PE (P) e Viçosa-MG (V).

Y18270 – Acesso ao GenBank para seqüência de *E. concordis* de Petrolina-PE, depositada por Navajas et al. (1999).

(.) caracteres idênticos com a segunda seqüência, (-) inserção/deleção, (*) trecho não seqüenciado

daquela população. Essas constatações concordam com os resultados de caracterização morfológica verificados por Noronha & Moraes (2002a), que mostram uma distinção das populações de Petrolina e, especialmente de Jaguariúna em relação às outras populações quando apenas as médias das medições de diferentes estruturas são consideradas. Estas constatações são também compatíveis com os resultados obtidos por Noronha (2002) em testes de cruzamentos, que mostram níveis maiores de incompatibilidade reprodutiva da população de Petrolina em relação às outras populações (ausência de progênie ou progênie constituída somente de machos) e de Jaguariúna, em relação a Pontes e Lacerda e Viçosa (progênie somente de machos em alguns cruzamentos).

Os polimorfismos e espaço verificados na sequência de bases dos espaçadores ITS1 e ITS2 da população de Petrolina estudada neste trabalho também são encontrados na sequência depositada por Navajas *et al.* (1999) e a similaridade entre essas duas sequências foi de 97% (Fig. 2). A similaridade entre a sequência depositada por Navajas *et al.* (1999) e as sequências das populações de *E. concordis* relatadas neste trabalho foi superior a 95%. As sequências do espaçador ITS1 obtidas neste trabalho e a sequência de *E. concordis* depositada por Navajas *et al.* (1999) apresentaram similaridade superior a 94%. Já o espaçador ITS2 apresentou similaridade superior a 96% com aquela sequência.

Discussão

A formação de dois conjuntos de alinhamentos distintos separando *E. citrifolius* de *E. concordis* através das sequências dos espaçadores ITS corroboram as sugestões de diferentes autores de que os espaçadores internos ITS1 e ITS2 são apropriados para discriminar espécies relacionadas ou até mesmo variações dentro da mesma espécie (Gotoh *et al.* 1998, Navajas *et al.* 1999, Silva *et al.* 1999).

Os resultados dos seqüenciamentos realizados não permitem a identificação das espécies, considerando-se o reduzido número de seqüências disponíveis no GenBank para ácaros fitoseídeos. Entretanto, este estudo forneceu informações para um melhor entendimento sobre as incompatibilidades e o isolamento reprodutivo verificados em alguns cruzamentos (Noronha 2002, Noronha & Moraes 2002b).

Outros estudos devem ser conduzidos para o entendimento dessas variações, envolvendo inclusive a região do gene Citocromo Oxidase subunidade I (COI) do DNA mitocondrial (DNAm). Esta região vem sendo utilizada no estudo de relações filogenéticas, no estudo de diversidade e na identificação de espécies de ácaros tetraniquídeos (Navajas *et al.* 1994, 1996, 1997, 1998).

Em *E. concordis*, os dois polimorfismos simples de nucleotídeos verificados na população de Petrolina, confirmam os resultados obtidos por Navajas *et al.* (1999) para indivíduos procedentes dessa localidade em relação aos indivíduos de Jaguariúna. A inserção/deleção verificada na população de Petrolina, foi também citada por Navajas *et al.* (1999).

Navajas *et al.* (1999) verificaram completa homologia nos espaçadores ITS1 e ITS2 em espécimes de *N. californicus* de áreas geográficas distantes entre si. Entretanto, baixo nível de polimorfismo nestas regiões foi verificado pelos mesmos

autores em espécimes de *E. concordis* e de *E. fallacis*, com a substituição de dois nucleotídeos. Navajas *et al.* (1994) verificaram a incompatibilidade reprodutiva parcial entre populações de *Mononychellus progressivus* Doreste do Brasil e do Congo. Estas mesmas populações apresentaram também diferenças nas seqüências do espaçador ITS2 e do gene COI. No alinhamento das seqüências do espaçador ITS2, os autores verificaram um espaço (inserção/deleção) de quatro pares de bases e duas mutações simples, enquanto sete mutações foram encontradas no gene COI da população do Brasil em relação à população do Congo. A combinação desses resultados levou os autores a sugerir que a incompatibilidade reprodutiva observada pudesse estar ligada às diferenças genéticas entre aquelas populações.

Conclui-se que a caracterização molecular, particularmente o seqüenciamento da região do espaçador ITS, auxilia na identificação de ácaros especialmente em casos de populações que apresentam incompatibilidade citoplasmática e que requeiram informações adicionais.

Agradecimentos

Ao PRONEX pelo suporte financeiro e ao Departamento de Produção Animal, ESALQ/USP, onde o trabalho foi conduzido.

Literatura Citada

- Bellotti, A.C., L. Smith & S.L. Lapointe. 1999.** Recent advances in cassava pest management. *Annu. Rev. Entomol.* 44: 343-370.
- Ciociola Jr., A.I., R.A. Zucchi & R. Stouthamer. 2001.** Molecular key to seven brazilian species of *Trichogramma* (Hymenoptera: Trichogrammatidae) using sequences of the ITS2 region and restriction analysis. *Neotrop. Entomol.* 30: 259-262.
- Gotoh, T., J. Gutierrez & M. Navajas. 1998.** Molecular comparison of the sibling species *Tetranychus pueraricola* Ehara et Gotoh and *T. urticae* Koch (Acari: Tetranychidae). *Entomol. Sci.* 1: 55-57.
- Hoy, M.A. 1994.** Insect molecular genetics. An introduction to principles and applications. San Diego, Academic Press, 546p.
- McMurtry, J.A. 1992.** Dynamics and potential impact of 'generalist' phytoseiids in agroecosystems and possibilities for establishment of exotic species. *Exp. Appl. Acarol.* 14: 371-382.
- Moraes, G.J. 1987.** Importance of taxonomy in biological control. *Insect Sci. Appl.* 8: 841-844.
- Navajas, M., D. Cotton, S. Kreiter & J. Gutierrez. 1992.** Molecular approach in spider mites (Acari: Tetranychidae): preliminary data on ribosomal DNA sequences. *Exp. Appl. Acarol.* 15: 211-218.

- Navajas, M., J. Gutierrez & J. Lagnel. 1996.** Mitochondrial cytochrome oxidase I in tetranychid mites: a comparison between molecular phylogeny and changes of morphological and life history traits. *Bull. Entomol. Res.* 86: 407-417.
- Navajas, M., J. Gutierrez, O. Bonato, H.R. Bolland & S. Mapangou-Divassa. 1994.** Intraspecific diversity of the cassava green mite *Mononychellus progressivus* (Acari: Tetranychidae) using comparisons of mitochondrial and nuclear ribosomal DNA sequences and cross-breeding. *Exp. Appl. Acarol.* 18: 351-360.
- Navajas, M., J. Gutierrez & T. Gotoh. 1997.** Convergence of molecular and morphological data reveals phylogenetic information on *Tetranychus* species and allows the restoration of the genus *Amphitetanychus* (Acari: Tetranychidae). *Bull. Entomol. Res.* 87: 283-288.
- Navajas, M., J. Lagnel, G. Fauvel & G. de Moraes. 1999.** Sequence variation of ribosomal internal transcribed spacers (ITS) in commercially important Phytoseiidae mites. *Exp. Appl. Acarol.* 23: 851-859.
- Navajas, M., J. Lagnel, J. Gutierrez & P. Boursot. 1998.** Species-wide homogeneity of nuclear ribosomal ITS2 sequences in the spider mite *Tetranychus urticae* contrasts with extensive mitochondrial COI polymorphism. *Heredity* 80: 742-752.
- Noronha, A.C.S. 2002.** Caracterização morfológica e molecular de ácaros predadores do gênero *Euseius* (Acari, Phytoseiidae). Tese de doutorado, Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", USP, Piracicaba, 110p.
- Noronha, A.C.S. & G.J. Moraes. 2002a.** Variações morfológicas intra e interpopulacionais de *Euseius citrifolius* Denmark & Muma e *Euseius concordis* (Chant) (Acari, Phytoseiidae). *Revta. Bras. Zool.* 19: 1111-1122.
- Noronha, A.C.S. & G.J. Moraes. 2002b.** Compatibilidade reprodutiva entre populações de *Euseius citrifolius* Denmark & Muma (Acari: Phytoseiidae). *Neotrop. Entomol.* 31: 531-536.
- Rasmy, A.H. & A.Y. Ellaithy. 1988.** Introduction of *Phytoseiulus persimilis* for twospotted spider mite control in greenhouses in Egypt (Acari: Phytoseiidae, Tetranychidae). *Entomophaga* 33: 435-438.
- Silva, I.M.M.S., J. Honda, F. van Kan, J. Hu, L. Neto, B. Pintureau & R. Stouthamer. 1999.** Molecular differentiation of five *Trichogramma* species occurring in Portugal. *Biol. Control* 16: 177-184.
- Torres, R.A., M. Ganal & V. Hemleben. 1990.** GC balance in the internal transcribed spacers ITS 1 and ITS 2 of nuclear ribosomal RNA genes. *J. Mol. Evol.* 30: 170-181.

Received 25/11/02. Accepted 23/09/03.
