

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**CARACTERIZAÇÃO E COMPARAÇÃO DE *Cotesia flavipes*
(HYMENOPTERA: BRACONIDAE) EM SITUAÇÃO DE
CRIAÇÃO MASSAL UTILIZANDO MICROSSATÉLITES E
MORFOLOGIA**

Fabiana Cristina de Freitas

Bióloga

2016

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**CARACTERIZAÇÃO E COMPARAÇÃO DE *Cotesia flavipes*
(HYMENOPTERA: BRACONIDAE) EM SITUAÇÃO DE
CRIAÇÃO MASSAL UTILIZANDO MICROSSATÉLITES E
MORFOLOGIA**

Fabiana Cristina de Freitas

Orientador: Prof. Dr. Odair Aparecido Fernandes

Coorientadora: Profa. Dra. Adriana Coletto Morales Corrêa e Castro

Tese apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – UNESP, Câmpus de Jaboticabal, como parte das exigências para obtenção do título de Doutor em Agronomia (Entomologia Agrícola)

2016

F862c Freitas, Fabiana Cristina de
Caracterização e comparação de *Cotesia flavipes* (Hymenoptera: Braconidae) em situação de criação massal utilizando microssatélites e morfologia. / Fabiana Cristina de Freitas. -- Jaboticabal, 2016
iii, 37 p. ; 28 cm

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2016

Orientador: Odair Aparecido Fernandes

Coorientadora: Adriana Coletto Morales Corrêa e Castro

Banca examinadora: Arlindo Leal Boiça Júnior, Fábio Santos do Nascimento, Jackson Antônio Marcondes de Souza, Sônia Marli Zingaretti

Bibliografia

1. Controle biológico. 2. Criação massal. 3. Diversidade genética.
I. Título. II. Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 595.79:632.9

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

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA TESE: CARACTERIZAÇÃO E COMPARAÇÃO DE *Cotesia flavipes* (HYMENOPTERA: BRACONIDAE) EM SITUAÇÃO DE CRIAÇÃO MASSAL UTILIZANDO MICROSSATÉLITES E MORFOLOGIA

AUTORA: FABIANA CRISTINA DE FREITAS

ORIENTADOR: ODAIR APARECIDO FERNANDES

CO-ORIENTADORA: ADRIANA COLETTO MORALES CORRÊA E CASTRO

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Doutora em AGRONOMIA (ENTOMOLOGIA AGRÍCOLA), pela Comissão Examinadora:



Profa. Dra. ADRIANA COLETTO MORALES CORRÊA E CASTRO
Departamento de Biologia Aplicada à Agropecuária / FCAV / UNESP - Jaboticabal



Prof. Dr. ARLINDO LEAL BOIÇA JUNIOR
Departamento de Fitossanidade / FCAV / UNESP - Jaboticabal



Profa. Dra. SONIA MARLI ZINGARETTI
Departamento de Biologia Molecular / UNAERP - Ribeirão Preto/SP



Prof. Dr. JACKSON ANTONIO MARCONDES DE SOUZA
Departamento de Biologia Aplicada à Agropecuária / FCAV / UNESP - Jaboticabal



Prof. Dr. FABIO SANTOS DO NASCIMENTO
Departamento de Biologia / USP - Ribeirão Preto/SP

Jaboticabal, 15 de abril de 2016

DADOS CURRICULARES DA AUTORA

Fabiana Cristina de Freitas, nascida em São Paulo, SP em 05 de setembro de 1977. Graduada em Licenciatura em Ciências Biológicas pela Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Câmpus de São José do Rio Preto, SP em 05 de fevereiro de 1999. Foi estagiária/voluntária do Laboratório de Citogenética orientada pela Profa. Dra. Marlene Kiyoni Hosaki Kobayashi, tendo bolsa oferecida pelo CNPq entre 1997 a 1998. Mestre em Ciências com Área de Concentração de Entomologia pela Universidade de São Paulo, Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Campus de Ribeirão Preto, SP em 16 de abril de 2001, com orientação do Prof. Dr. Odair aparecido Fernandes e coorientação do Prof. Dr. José Roberto Postali Parra. Trabalhou em diversas escolas particulares de ensino fundamental II e ensino médio durante os anos de 2000 a 2008. Esteve como docente e coordenadora do curso técnico Ambiental do SENAC – Bebedouro, SP durante o ano de 2008. Em 2009 ingressou, via concurso público, no Instituto Federal de São Paulo, Campus de Sertãozinho, onde atua no cargo de professor de ensino básico, técnico e tecnológico, com regime de exclusividade. Em março de 2012, ingressou no curso de Doutorado do programa de Pós-Graduação em Agronomia (Entomologia Agrícola), na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP-FCAV), no qual permaneceu até abril de 2016.

“Por vezes sentimos que aquilo que fazemos não é senão uma gota de água no mar. Mas o mar seria menor se lhe faltasse uma gota”.

(Madre Teresa de Calcutá)

Dedico este trabalho aos meus orientadores
pela incansável disponibilidade, caminhos traçados,
rumos norteados e conhecimentos adquiridos.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Odair Aparecido Fernandes, que me aceitou e encorajou nesta tarefa que considerava quase impossível.

À Profa. Dra. Adriana Coletto Morales Corrêa e Castro, por também me aceitar e me receber com um calor humano inigualável, me orientando, ensinando e incentivando.

À Profa. Dra. Janete Aparecida Desidério e ao Prof. Dr. Manoel Victor Franco Lemos, por cederem o Laboratório de Genética de Bactérias e Biotecnologia Aplicada, para a realização principalmente das PCRs e corridas de géis.

À Profa. Dra. Eliana Gertrudes Macedo Lemos e ao técnico João Carlos Campanharo, do Departamento de Tecnologia, pelo empréstimo do espaço e materiais necessários para o aprendizado e para corrida dos géis de acrilamida.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Agronomia (Entomologia Agrícola) – FCAV/UNESP, pelos ensinamentos e conhecimentos adquiridos.

Ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia (Entomologia Agrícola) e à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – FCAV/UNESP, pela oportunidade e por toda a estrutura disponibilizada para a realização desde trabalho.

Agradeço muito a Deus, por me dar paciência, perseverança e discernimento para a escolha dos caminhos a serem trilhados.

Ao Rodrigo Bruno Kehdy, pela paciência, ajuda, incentivo, encorajamento nos momentos sempre delicados e difíceis que passamos.

À minha amiga de laboratório Nara Cristina Chiarini Pena Barbosa pelos ensinamentos, ajuda, encorajamento e disponibilidade.

À minha amiga Daniele da Silva pelos momentos incansáveis nos laboratórios, ajuda, paciência, encorajamento, apoio, incentivo e companheirismo.

Aos funcionários da FCAV/UNESP e a todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho e que eu não tenha citado, por mero esquecimento.

SUMÁRIO

	Página
RESUMO.....	ii
ABSTRACT	iii
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	5
2.1. O parasitóide <i>C. flavípes</i> , a broca da cana-de-açúcar <i>D. sacharalis</i> e o controle biológico.....	5
2.2. Caracterização genética e uso de microssatélites	7
2.3. A genética de populações.....	9
3. MATERIAL E MÉTODOS	13
3.1. Material biológico	13
3.2. Análise morfológica	13
3.3. Análise molecular.....	14
3.3.1. Obtenção do DNA total.....	15
3.3.2. Amplificação da região gênica de interesse por PCR e géis.....	15
3.4. Parâmetros Moleculares e Análises Estatísticas.....	16
4. RESULTADOS.....	17
5. DISCUSSÃO.....	26
6. CONCLUSÃO.....	30
7. REFERÊNCIAS.....	31

CARACTERIZAÇÃO E COMPARAÇÃO DE *Cotesia flavipes* (HYMENOPTERA: BRACONIDAE) EM SITUAÇÃO DE CRIAÇÃO MASSAL UTILIZANDO MICROSSATÉLITES E MORFOLOGIA

RESUMO - O parasitoide larval *Cotesia flavipes* (Cameron) (Hymenoptera: Braconidae) é um importante agente de controle biológico da broca-do-colmo, *Diatraea saccharalis* (Fabricius) (Lepidoptera: Crambidae), na cultura da cana-de-açúcar. Este parasitoide é criado em biofábricas para liberação no campo; porém indicadores de parasitismo e capacidade de vôo sugerem que este parasitoide não está apresentando os mesmos níveis de controle que foram observados logo após a sua introdução. Insetos criados em laboratórios ou de campo são introduzidos na criação, porém sem estudos básicos ou critério. Insetos de oito biofabricas de 6 estados brasileiros (São Paulo, Minas Gerais, Paraná, Goiás, Maranhão e Alagoas) foram caracterizados e comparados com a utilização de microsatélites. Análise de quatro *loci* utilizando pelo menos 22 fêmeas de cada localidade foi realizada. A tíbia posterior direita de cada fêmea utilizada na extração de DNA também foi medida. Os resultados mostraram que o tamanho da tíbia dos insetos do Paraná foi significativamente maior do que o das demais regiões e, dessa forma, dando indicação de mais vigorosos. Com a análise molecular verificou-se que os quatro *loci* foram polimórficos. As frequências alélicas de três *loci* estavam de acordo com o Equilíbrio de Hardy-Weinberg para todas as populações de todas as regiões. Foi observada a presença de cinco alelos exclusivos em apenas dois *loci*. Os maiores valores de H_o e H_e foram encontrados para os indivíduos da biofábrica no estado de São Paulo ($H_o= 0,6055$ e $H_e=0,4342$). A porcentagem de variação entre e dentro das populações foi 24,65% e 75,34%, respectivamente. A estimativa de compartilhamento de genótipos entre os indivíduos de *C. flavipes* mostrou $K = 2$ como número de grupos genéticos mais provável que tenha originado a variação atual e alto compartilhamento de genótipos entre eles. Levando em consideração todos os *loci* analisados, a diferenciação genética foi moderada ($F_{st} = 0,1656$; $IC=95\%$). Ainda é proposta uma mistura de materiais biológicos levando em consideração as distâncias genéticas e o grau de estruturação apresentado.

Palavras-chave: controle biológico, criação massal, diversidade genética, polimorfismo

**CHARACTERIZATION AND COMPARISON OF *Cotesia flavipes*
(HYMENOPTERA: BRACONIDAE) IN SITUATION THE MASS REARED USING
MICROSATELLITE AND MORPHOLOGY**

ABSTRACT - The larval parasitoid *Cotesia flavipes* (Cameron) (Hymenoptera: Braconidae) is an important biological control agent of the sugarcane borer, *Diatraea saccharalis* (Fabricius) (Lepidoptera: Crambidae), in the cultivation of sugar cane. This parasitoid is mass reared for field release; however, parasitism indicators and flying capacity suggest that this parasitoid is no longer able to keep similar control levels to those observed after its introduction. Insects are exchanged between labs or introduced from field, but without basic studies or criteria. Insects from six Brazilian States (São Paulo, Minas Gerais, Paraná, Goiás, Maranhão e Alagoas) have been characterized and compared with the utilization of microsatellite. Analysis of four *loci* using at least 22 females of each location was performed. The right hind tibia of each female utilized in the extraction of the DNA was also measured. The results indicated that the insects from Parana state were significantly larger than the other insects and, therefore, more vigorous. The molecular analysis allowed verifying that 4 out of the 5 *loci* were polymorphic. The allele frequencies of three *loci* were in agreement with the Hardy-Weinberg Equilibrium for all insects of all regions. It was also observed that five alleles were exclusively presented in only two loci. The greater values of H_o and H_e were found in the one biofactory in São Paulo state ($H_o=0.6055$ and $H_e=0.4342$). The variation among and within populations was 24.65% and 75.34%, respectively. The estimate shared genotypes between the *C. flavipes* individuals showed that $K=2$ was as the most probable number of genetic groups that has caused the current variation and high shared of genotypes between them. Considering all the analyzed loci, the genetic differentiation was at moderate level ($F_{st} = 0.1656$; $CI=95\%$). We suggest possible mixture of biological materials based on genetic distances and degree of structuring displayed.

Keywords: biological control, mass rearing, genetic diversity, polymorphism.

1.INTRODUÇÃO

A cana de açúcar está amplamente distribuída pelo país sendo que os estados de São Paulo, Goiás, Minas Gerais, Mato Grosso do Sul, Paraná, Alagoas, Pernambuco e Mato Grosso são responsáveis por quase 95% da produção nacional. O Brasil deverá produzir 663,11 milhões de toneladas de cana-de-açúcar na safra 2015/16 em cerca de 9,06 milhões de hectares (73.214 kg/ha), tendo um aumento de 4,5% em relação à safra passada (70.495 kg/ha). O Estado de São Paulo possui 51,3% (4.648,2 mil hectares) da área cultivada, sendo o maior produtor de açúcar e etanol (CONAB, 2015).

Devido às áreas extensas e localizadas em diversas regiões, a cana-de-açúcar se apresenta com um grande potencial para desenvolvimento de pragas, como cigarrinha-da-raiz, *Mahanarva fimbriolata* (Stål, 1854) (Hemiptera: Cercopidae); broca-peluda, *Hyponeuma taltula* (Schaus, 1904) (Lepidoptera: Noctuidae); cupins, sendo *Heterotermes tenuis* (Hagen, 1858) (Isoptera: Rhinotermitidae) um dos mais comuns; lagarta elasma, *Elasmopalpus lignosellus* (Zeller, 1848) (Lepidoptera: Pyralidae); broca gigante, *Telchin licus* (Drury, 1773) (Lepidoptera: Castniidae); formigas cortadeiras, *Atta* spp. e *Acromyrmex* spp. (Hymenoptera: Formicidae); além de nematoides tais como *Meloidogyne javanica* (Treub) Chitwood, 1949 e *M. incognita* (Kofoid & White) Chitwood, 1949 (Nematoda: Heteroderidae). Além desses, um inseto de grande importância nesta cultura é *Diatraea saccharalis* (Fabricius, 1794) (Lepidoptera: Crambidae) devido aos prejuízos que suas larvas (broca-da-cana ou broca do colmo) causam aos colmos da cana-de-açúcar, afetando direta e indiretamente a produtividade agrícola e industrial. Considera-se que para cada 1% de índice de intensidade de infestação (~ internódios atacados), ocorre uma redução de 0,42% de açúcar, 0,21% de álcool e 1,14% na produção de matéria prima (SALVATORE et al., 2010). Não obstante, o ataque afeta a qualidade do açúcar produzido, aumentando ainda mais os prejuízos causados (ROSSATO, 2012). Esses prejuízos causados à cultura canavieira tem impulsionado o desenvolvimento de diferentes estratégias para o controle desta praga.

No Brasil, o controle biológico realizado pelo parasitoide larval *Cotesia flavipes* (Cameron, 1891) (Hymenoptera: Braconidae) é um método amplamente utilizado no controle da broca-da-cana (BOTELHO & MACEDO, 2002; PINTO, 2006). Estes parasitoides são originários da região asiática e foram introduzidos em várias partes do mundo. No Brasil foi introduzida primeiramente no Estado de São Paulo, em 1971, pela ESALQ/USP e Copersucar, porém sem apresentar eficiência. Já em 1978 novas linhagens de *C. flavipes* originárias da Índia e do Paquistão foram trazidas para o Brasil apresentando sucesso no controle na broca-da-cana (NAVA et al., 2009).

Mendonça (1996) afirmou que a introdução do parasitoide *C. flavipes* dinamizou o controle biológico da broca no Brasil. A fácil adaptação deste parasitoide e o desenvolvimento de uma fácil tecnologia para sua produção em larga escala possibilitaram a montagem de laboratórios tanto em unidades industriais como em associações de plantadores de cana. Após o estabelecimento desse parasitoide para a realização do controle biológico da broca, os laboratórios de criação e a liberação no campo tornaram-se práticas bastante difundidas e usadas nas usinas de cana-de-açúcar do Brasil (PARRA, 2000). As biofábricas, em geral, não realizam introdução de organismos selvagens e algumas vezes fazem a troca de material com outros laboratórios também de criações massais, para reduzir o risco de contaminação com entomopatógenos vindos do campo. Visto a relevância deste parasitoide para o controle da broca-da-cana (desde sua eficiência quanto sua facilidade de criação) e os prejuízos causados por essa praga, o estudo molecular auxilia no conhecimento da variabilidade genética destes parasitoides e pode direcionar o melhoramento desta variabilidade incrementando a atividade deste inseto no campo.

Porém, as pressões de seleção encontradas em laboratório, como pouco espaço, acasalamentos não casuais, ausência de variações climáticas bruscas, facilidade de oviposição, são mais significativas, em muitos casos, do que as encontradas no meio ambiente. Ao longo das gerações produzidas em laboratórios de criação massal deste parasitoide as mudanças morfológicas e genéticas pela deriva genética podem causar o efeito fundador, ou seja, o estabelecimento de uma

população por um pequeno número de indivíduos, na qual o conjunto gênico dos indivíduos atuais é o resultado dos poucos genes fundadores (FUTUYMA, 2009).

Quando há excesso de homozigose na população, a heterozigose observada na população é menor que o valor esperado. Esse déficit de heterozigotos em populações diploides pode ser causado por diversos fatores. Uma das causas de déficit é a endogamia sendo que também outros fatores podem ser observados como o efeito fundador e o efeito gargalo. Este gargalo, também denominado de afunilamento ou “bottlenecks” são flutuações no tamanho populacional de populações que tiveram seu tamanho efetivo reduzido e será ainda mais reduzido caso os descendentes possam se acasalar com seus pais. Sob essas condições as frequências alélicas dos fundadores ou sobreviventes nem sempre correspondem à população original (FUTUYMA, 2009). Como consequência pode-se ter menor viabilidade deste organismo no campo.

Diversas mudanças podem ocorrer em populações de laboratório, como serem mantidas em ambientes com fatores abióticos estáveis e bióticos constantes. Não havendo seleção, não há competição interespecífica. Dessa forma, o genótipo médio acaba sendo favorecido pelas condições de laboratório, sendo algumas vezes aqueles mais pobres, resultando num possível decréscimo na variabilidade genética (VAN LENTEREN, 2003). Outro fator a ser considerado é a não introdução de indivíduos selvagens na criação massal podendo determinar combinações cromossômicas letais que podem diminuir a eficiência deste parasitoide no campo.

Sabendo que técnicas moleculares são extremamente eficazes para estudos comparativos, a utilização de microssatélites é uma ferramenta confiável para estudos genéticos de populações. Os microssatélite ou *SSR* (*Simple Sequence Repeats*) são sequências de uma a seis bases de comprimento repetidas em tandem e são raros em regiões codificadoras. Também se destaca que as interrupções nas sequências repetitivas parecem conferir estabilidade aos microssatélites, porque reduzem a quantidade de erro por deslizamento da DNA polimerase durante a replicação. Além disso, são distribuídos aleatoriamente pelo genoma, possuem expressão codominante, são multialélicos e apresentam alto grau de polimorfismo genético (FERREIRA & GRATTAPAGLIA, 1998). Portanto os microssatélites são os mais indicados para o estudo em comparações de amostras,

devido às suas características de multialelismo e codominância, além um elevado conteúdo de informação genética por loco. A codominância deste marcador faz com que as diferentes contribuições parentais nas progênes sejam detectadas (PADILHA et al., 2003).

Trabalhos já mostraram a importância de se conhecer as variações genéticas ao longo das gerações em diversas espécies e outros tantos trabalhos mostraram que características biológicas são importantes na detecção da qualidade de parasitoides. Assim, este trabalho teve por objetivos:

1. Estimar a variabilidade genética por meio do marcador nuclear de microssatélites em amostras de bio-fábricas brasileiras;
2. Comparar as amostras de forma a obter a distância genética entre elas;
3. Obter o comprimento da tíbia como forma de inferência ao vigor do inseto;
4. Relacionar a variabilidade genética com o comprimento da tíbia;
5. Propor troca de material biológico entre as amostras de biofábricas mediante valores de distância e morfologia.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. O parasitoide *C. flavipes*, a broca da cana-de-açúcar *D. saccharalis* e o controle biológico

O parasitoide *C. flavipes* é um inseto de 2 a 3 mm de comprimento, com coloração escura (preta), gregário, endoparasítico, coinobionte e seu ciclo de vida se completa aproximadamente em 20 dias (PINTO et al., 2006). Este inseto de origem do Sudeste Asiático foi trazido para o Brasil em 1971 pela ESALQ/USP e Copersucar para implementação de um programa de controle biológico, porém sem grandes sucessos. Em 1974, o Programa Nacional de Controle Integrado da Broca da Cana-de-açúcar foi implantado pelo Planalsucar e passou a se destacar como um dos maiores programas de controle biológico do mundo. Mas foi em 1978, que novas linhagens de *C. flavipes*, oriundas da Índia e do Paquistão, mais adaptadas às regiões mais frias e úmidas, foram introduzidas em São Paulo, obtendo-se, dessa vez, índices de parasitismo elevados (BOTELHO & MACEDO, 2002) e sucesso no controle na broca-da-cana (NAVA et. al., 2009). Conforme relatado por Mendonça et al. (1977), a criação massal de *C. flavipes* no Brasil foi iniciada a partir de 200 pupários trazidos de Trinidad Tobago que por sua vez foram trazidos da Índia. Insetos produzidos no Brasil, em criações massais, foram também utilizados para colonização em Cuba entre os anos de 1999 e 2000 (BARROSO et al., 2003). Conforme apontado por Mendonça (1996), a introdução do parasitoide *C. flavipes* dinamizou o controle biológico da broca no Brasil. Esses parasitoides realizam reprodução por partenogênese arrenótoca, isto é, os machos são produzidos de ovos não fertilizados e as fêmeas a partir de ovos fertilizados. Ainda, nessa espécie de parasitoide as fêmeas possuem antenas menores que os machos, sendo que sua procura por hospedeiros seja realizada com a ajuda também de seu ovipositor para encontrá-los dentro do colmo (BOTELHO & MACEDO, 2002). As fêmeas do parasitoide têm preferência por lagarta de *D. saccharalis* a partir do 3º. ínstar. Após localizar o hospedeiro, o parasitoide introduz o ovipositor e deposita de 60 a 65 ovos (MACEDO, 2000). Esses ovos são depositados no hemocele do hospedeiro e após

três a quatro dias ocorre a eclosão das larvas. O desenvolvimento das larvas se completa em doze dias, após passarem por três ínstaes (PARRA, 2000), quando perfuram o tegumento da lagarta, matando-a (MACEDO & ARAÚJO, 2000). Finalizando o ciclo, as larvas empupam próximas à lagarta de *D. saccharalis*. Os casulos pupais possuem coloração branca (PINTO et al., 2006). Os adultos têm em média de três a quatro milímetros e se alimentados vivem aproximadamente 34 horas a uma temperatura média de 25°C (SANTOS, 2009). Este ciclo é mantido em laboratórios de criação massal (bio-fábricas) sob condições controladas de temperatura e adotando-se dieta artificial para alimentação do hospedeiro.

Em condições de campo as lagartas de *D. saccharalis* alimentam-se dos tecidos foliares nos primeiros ínstaes e no terceiro ínstar adentra o colmo da cana promovendo injúria direta como a perda de peso e morte das gemas, tombamento da planta pelo vento, secamento dos ponteiros em plantas novas (conhecido como coração morto), enraizamento aéreo e brotação lateral (PINTO et al., 2006). Os orifícios deixados pela broca na abertura das galerias favorecem a entrada de microrganismos como *Fusarium moniliforme* e *Colletotrichum falcatum*, que causam o sintoma da podridão vermelha do colmo (HAYASHIDA et al., 2012), inversão de sacarose e diminuição da pureza do caldo, prejudicando o rendimento agrícola e industrial da cultura (GARCIA; BOTELHO; MACEDO, 2009; VISWANATHAN, 2001). Maiores ataques de broca resultam em aumento nos teores de fibra e de açúcares redutores além de redução na pureza (DINARDO-MIRANDA et al., 2012).

Baseando-se em alcance médio, Dinardo-Miranda et al. (2011) estimaram o levantamento populacional da broca-do-colmo que deveria ser realizado em seis pontos para representar adequadamente a área. Estudos realizados com *D. saccharalis* mostraram que fatores climáticos como a temperatura, umidade relativa, velocidade do vento e precipitação não interferem na captura de machos que foram liberados no campo e dos machos do campo. Porém a direção do vento mostrou ter um papel fundamental na dispersão de *D. saccharalis*, uma vez que a maioria dos insetos voa a favor do vento (CAIXETA, 2010).

Observações de campo têm sido corroboradas por trabalhos recentes e indicam que a capacidade de voo destes parasitoides diminuiu em cerca de 50% em relação ao observado nas liberações iniciais na década de 1970 (VOLPE, 2009).

Além disso, Pomari et al. (2008) relataram que apesar destes parasitoides se dispersarem até 40 m de distância, a capacidade de parasitismo se limita a 18 m. Com isso, para uma liberação eficiente no controle da broca-do-colmo se faz necessária a utilização de 6.000 insetos, em quatro ou oito pontos/ha (MASSON et al., 2012).

Estudos posteriores mostraram que o parasitismo de *C. flavipes* variou de 13,2% a 42,8% e que larvas parasitadas se distribuem ao acaso sendo que em algumas áreas a distribuição foi agregada, com alcance de 15 a 25 m. Levando em conta que o sucesso do parasitismo está diretamente ligado à dispersão do parasitoide, foi sugerido que os pontos de liberação estejam distantes entre si 30 m e que o raio de dispersão poderia ser de 15 m (DINARDO-MIRANDA et al., 2014). Assim, verifica-se que tem havido redução na capacidade de voo, a qual pode estar relacionada ao fato do parasitoide estar sendo mantido em criação massal há várias décadas.

2.2. Caracterização genética e uso de microssatélites

A diversidade genética na forma de alelos múltiplos para vários locos existe na maioria das populações naturais; porém, vários fenômenos podem mascarar a segregação de genótipos. Em populações que realizam reprodução sexuada não é esperado que dois indivíduos possuam o mesmo genótipo para todos os locos. Assim, torna-se importante descrever como os alelos estão organizados em genótipos para determinar se os alelos são distribuídos aleatoriamente (HARTL & CLARK, 1997).

De acordo com o princípio de Hardy-Weinberg, nas populações infinitamente grandes e panmíticas, ao longo do tempo, as frequências gênicas não se alteram e as proporções genotípicas atingem um equilíbrio mantendo uma relação constante entre si. O desvio desse equilíbrio pode ser demonstrado pelo cálculo de heterozigotos esperados para uma população.

Mayr (1970) esclareceu que a heterozigose pode ser interpretada como uma medida da diversidade genética. Quando há excesso de homozigose na população,

a heterozigose observada na população é menor que o valor esperado. Esse déficit de heterozigotos em populações diploides pode ser causado por diversos fatores. Uma das causas de déficit é a endogamia na qual um indivíduo é homozigoto para determinado loco por haver herdado duas cópias idênticas de um alelo por ancestralidade devido ao cruzamento entre aparentados (MAYR, 1970). Outra causa é a deriva genética que ocorre quando populações são isoladas em pequenos grupos e pode levar a fixação ou eliminação de alelos por variação aleatória das suas frequências ao longo das gerações, independentemente do valor adaptativo dos alelos (FUTUYMA, 2009).

Outros fatores causadores de baixa heterozigose são o efeito fundador e o efeito gargalo (que são casos especiais de deriva genética). No caso do efeito gargalo as frequências alélicas dos fundadores ou sobreviventes nem sempre correspondem à população original. Assim, a população se expande a partir de um número limitado de indivíduos e pode mostrar uma composição genética diferente daquela exibida pela população original. Ainda pode ser destacado o efeito Walund em que o isolamento de populações em grandes grupos, entre os quais o fluxo gênico é restrito, produz aumento do número de homozigotos, efeito resultante dos cruzamentos parcialmente aleatórios (FUTUYMA, 2009).

Muitos marcadores moleculares estão sendo usados em estudos entomológicos, tanto os marcadores de DNA como os de proteínas têm revolucionado as ciências biológicas e têm reforçado muitos campos de estudo. Os marcadores de DNA, por exemplo, costumam ser mais baratos, muitas vezes com técnicas mais rápidas para isolar e desenvolver, mesmo a partir de insetos bem pequenos (pulgões, tripes, vespas parasitas, etc.) e é fácil de usar. Exibem padrões de bandas simples ou multilocus, com natureza mendeliana de fácil interpretação, e com análises estatísticas bem estabelecidas. Também são adequados para utilização com pequenas quantidades de material de insetos e pode ser usado com as amostras armazenadas a seco ou mesmo antigos. Eles têm uma gama crescente de aplicações, muitas envolvendo discriminações intra e interespecíficas (LOXDALE, 1998).

Muitos avanços na genética molecular, na década de 1990, aumentaram o impacto da genética populacional na biologia como o advento dos loci de

microssatélites hipervariáveis (SUNNUCKS, 2000). Os microssatélites ou *SSR* (*Simple Sequence Repeats*) são sequências de uma a seis bases de comprimento repetidas em *tandem* raras em regiões codificadoras. Também se destaca que as interrupções nas sequências repetitivas parecem conferir estabilidade aos microssatélites, porque reduzem a quantidade de erro por deslizamento da DNA polimerase durante a replicação. Além disso, são distribuídos aleatoriamente pelo genoma, possuem expressão codominante, são multialélicos e apresentam alto grau de polimorfismo genético (FERREIRA & GRATTAPAGLIA, 1998). Por possuírem tais características e relativa facilidade de execução técnica, os microssatélites têm sido considerados os marcadores ideais para os estudos genéticos de populações (LEHMANN et al., 1996). Portanto, os microssatélites são importantes ferramentas no estudo genético, devido às suas características de multialelismo e codominância, além um elevado conteúdo de informação genética por loco. A codominância deste marcador faz com que as diferentes contribuições parentais nas progênie sejam detectadas (PADILHA, 2003).

2.3. A genética de populações

O termo população pode ser caracterizado por um grupo de indivíduos que estejam organizados de tal forma que qualquer um deles tem a probabilidade de se cruzarem e produzir descendentes, levando em consideração que tenham que ser sexualmente maduros e de sexo oposto. A população é uma unidade panmítica (com cruzamento ao acaso). É nela que os genes se encontram em numerosas combinações, experimentando novos genes e novas combinações desses genes. Porém todos os indivíduos dentro de uma população local tem um patrimônio genético único. O fluxo gênico e a recombinação são os principais agentes de variação em uma população, além da mutação. A quantidade específica e um tipo muito definido de variação genética podem provocar a adaptação e a adaptabilidade de uma população (MAYR, 1970).

A grande maioria das espécies está dividida em populações locais, discretas ou não, grandes ou pequenas. Entre essas populações pode ocorrer pouco ou muito fluxo gênico (intercruzamento entre indivíduos da população local com imigrantes de

outras populações) e, além disso, podem ser panmíticas ou endogâmicas (tendência a cruzamentos entre parentes). Populações são consideradas endogâmicas quando a probabilidade da progênie de herdar duas cópias gênicas, que são idênticas por descendência, for maior do que esperado se o cruzamento fosse aleatório. O endocruzamento em grandes populações não altera as frequências alélicas e sim aumenta as de homozigotos e diminui a proporção de heterozigotos. A frequência dos heterozigotos, nos quais ocorre recombinação, é reduzida sob endocruzamento. O fenômeno de depressão endogâmica pode levar a uma redução drástica da viabilidade e fecundidade em populações endogâmicas de laboratório (FUTUYMA, 2009).

Cabe ressaltar que a deriva genética aleatória é uma flutuação na frequência de alelos, que pode levar à fixação ou perda do alelo. Ela ocorre em populações finitas, mas é mais rápida quanto menor for a população, possuindo consequências evolutivas como a perda da variação genética dentro das populações e divergência genética entre elas, inteiramente ao acaso (FUTUYMA, 2009).

Trabalhos moleculares utilizando espécies introduzidas com importância no controle biológico vindo sendo realizados. Indivíduos de *Aphidius ervi* Haliday (Hymenoptera: Braconidae), um parasitoide introduzido na América do Norte e da Europa Ocidental em 1959, para o controle de afídeos de ervilha, foram estudados por Hufbauer et al. (2004). Para examinar a estrutura da população e avaliar se ocorreu “gargalo” após a introdução na América do Norte, foram utilizados cinco *loci* de microssatélites em 62 indivíduos de duas populações nativas e 230 indivíduos de seis populações introduzidas. Estes pesquisadores perceberam que as amostras introduzidas tiveram número menor de alelos raros do que amostras nativas, porém a heterozigosidade não diferiu, sugerindo que houve um afinamento (gargalo) suave. A diferenciação genética destas amostras foi significativa mostrando que essas alterações genéticas poderiam estar relacionadas com o efeito fundador.

Estudos moleculares utilizando microssatélites também foram realizados com a vespa, *Diaeretiella rapae* (M'Intosh) (Hymenoptera: Aphidiidae), parasitoide de afídeos. Sugere-se que a vespa foi introduzida na Austrália Ocidental há cerca de 100 anos. Análises com marcadores microssatélites foram utilizadas para detectar a deriva genética em populações de insetos originais e colonizadoras. Foram

utilizados quatro *loci* para as análises. A partir deste estudo, inferiu-se que o número de fundadores de *D. rapae*, originalmente introduzido na Austrália Ocidental, foi pequeno além de demonstrar que a diversidade genética foi reduzida em comparação com amostras populacionais do Velho Mundo. As medidas de distância genética também indicaram que a população da Austrália Ocidental se diferenciou significativamente das outras populações estudadas. Concluiu-se então que um evento fundador, provavelmente, deveria ter ocorrido durante a história demográfica desta população em particular (BAKER et al., 2003).

A caracterização molecular utilizando microssatélites tem sido abordada em diversos trabalhos. Amostras de uma praga de díptero de trigo, *Mayetiola destructor* (Say) (Diptera: Cecidomyiidae), de Israel e Síria, foram usadas para analisar suas identidades, descrever as populações. Com isso sugeriu-se a implantação de genes de resistência em cultivares de trigo para o controle desta praga (JOHNSON, 2012). Foram utilizados cinco *loci* de microssatélites revelando a existência de populações mistas em Israel que são distintamente separadas da única população na Síria. Além desse, outro trabalho teve como objetivo ampliar o conhecimento sobre a estrutura genética e obter informações para a conservação de pacu *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887), provenientes de populações selvagens dos rios da Bacia do Alto Paraguai resultando em informações sobre a estrutura populacional desta espécie, permitindo uma possível caracterização de seu banco genético. Esses estudos mostraram populações com pequena estruturação e que está presente um intenso fluxo gênico devido sua alta capacidade migratória e as características climáticas e geográficas da região do Pantanal Matogrossense (SUGANUMA, 2008).

O complexo *C. flavipes* possui membros que parasitam com sucesso numerosas espécies de pragas do caule, no entanto certas populações geográficas demonstram variação na gama de hospedeiros que parasitam. A morfologia do complexo é altamente conservada e existe uma considerável confusão ao redor da identidade associada ao hospedeiro. Utilizando-se genes mitocondriais e nucleares foram realizados estudos no complexo *C. flavipes* por Muirhead et al. (2012). As análises filogenéticas forneceram um forte apoio para o monofiletismo do complexo e a presença de pelo menos quatro espécies, *C. chilonis* (da China e Japão), *C.*

cesamiae (da África), *C. flavipes* (originário da região do Indo-Asiático, mas introduzido na África e no Novo mundo), e *C. nonagriæ* (da Austrália e Papua Nova Guiné). A diversidade haplotípica de populações geográficas diz respeito a históricas barreiras biogeográficas e introduções de controle biológico, e reflete relatos prévios de variação ecológica nestas espécies. Estudos dessa forma permitem examinar a evolução parasitoide-hospedeiro e, dadas as limitações de identificação com base morfológica para os membros deste complexo, a identificação molecular é sempre recomendada antes de qualquer introdução de controle biológico.

Três fatores são citados como importantes para a evolução da adaptação local de parasitos aos seus hospedeiros: variedade de hospedeiros do parasita, taxa de sobrevivência relativa do hospedeiro e parasito, e taxas de migração e estrutura de metapopulação de hospedeiro e parasito. Assim, embora os parasitos sejam comumente adaptados localmente aos seus hospedeiros, não se pode afirmar que um potencial agente de controle biológico será adaptado para toda a gama de praga nativa (HUFBAUER & RODERICK, 2005). Tanto o parasito como o hospedeiro podem ser localmente adaptados um para o outro e, portanto, ser mais favorável a certas interações do que a outras. Havendo uma adaptação local do inimigo natural para um genótipo de praga invasiva é correto afirmar que este inimigo natural usará genótipos adaptados levando a ter maiores taxas de crescimento de sua população ou ser mais prejudicial para os seus hospedeiros locais. Embora admitindo que agentes de controle biológico são adaptados localmente, ainda assim é claro que genótipos de pragas invasoras variam em sua suscetibilidade a seus inimigos naturais. Estudos realizados em diversos trabalhos por Hufbauer & Roderick (2004) sugerem que os agentes de controle biológico, de fato, passam por gargalos no tamanho da população quando ocorre uma introdução da espécie, havendo uma redução da variação nos *loci* neutros e que populações com variação neutra reduzida também reduziram de *fitness*. Isto sugere que a diversidade genética pode ser um indicador válido de *fitness*, e que a baixa diversidade genética é provavelmente associada a endogamia e depressão por endogamia.

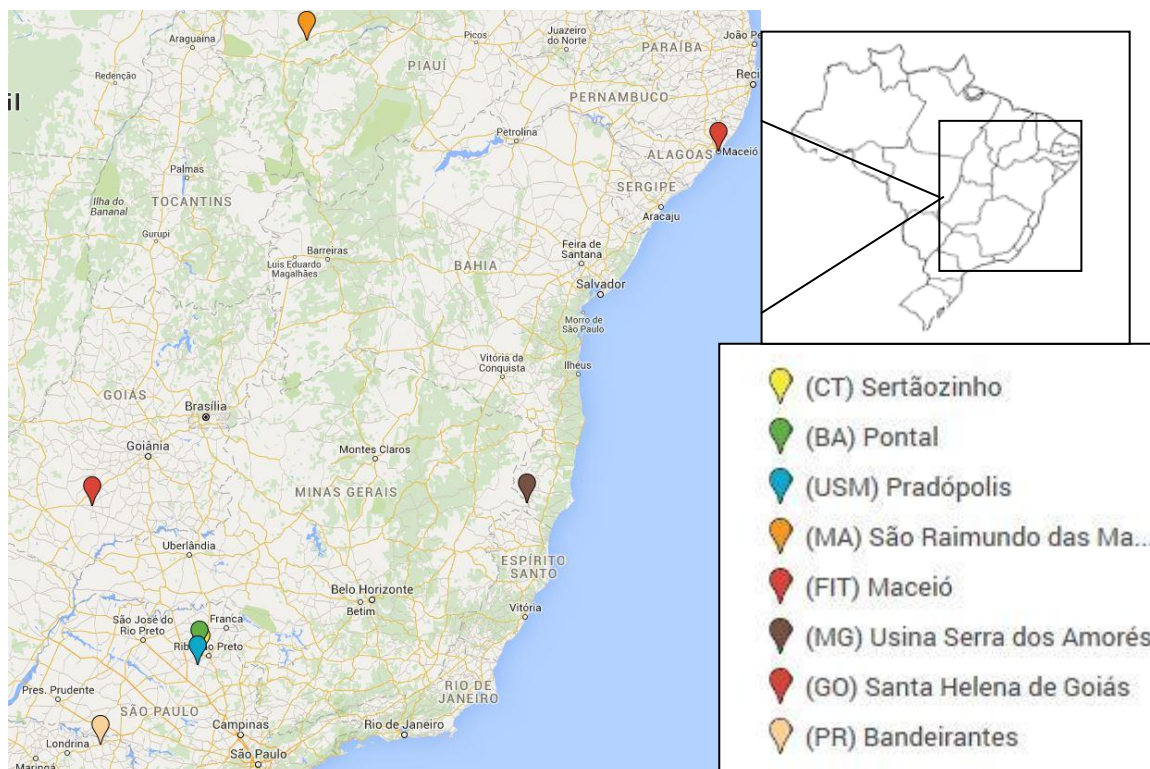
3.MATERIAL E MÉTODOS

3.1.Material biológico

As análises foram realizadas em pelo menos 24 fêmeas de *C. flavipes* provenientes das seguintes biofábricas: laboratórios de criação massal da Usina São Martinho, Pradópolis, SP (**USM**); Biocana, Pontal, SP (**BA**); Biocontrol, Sertãozinho, SP (**CT**); Agroserra, São Raimundo das Mangabeiras, MA (**MA**); Fitoagro, Maceió, AL (**FIT**); Usina Serra dos Amóres, MG (**MG**); Bioecocana, Santa Helena de Goiás; GO (**GO**) e Usina Bandeirante, PR (**PR**) (Figura 1). Logo após a emergência dos adultos, pelo menos 100 fêmeas foram coletadas e imersas vivas em álcool absoluto para garantir a integridade do DNA e permitir futuras análises. Devido à necessidade de nova extração do DNA, as amostras das localidades dos estados de Alagoas e Paraná totalizaram 43 indivíduos analisados.

3.2 Análise morfológica

Os indivíduos foram primeiramente analisados morfológicamente. Para tanto, os parasitoides tiveram a tíbia posterior direita retirada, em placa de Petri com álcool absoluto sob microscópio estereoscópico. Cada perna, após esse procedimento, foi armazenada em tubo graduado com tampa de 2,0 mL contendo álcool absoluto. A visualização das pernas foi feita por meio de microscópio estereoscópico (Câmera Leica DFC295®) e a mensuração do comprimento da tíbia foi realizada utilizando o software Leica Application Suite 3.8® sendo as pernas colocadas em placa de Petri contendo álcool absoluto. Então foram devolvidas a seus tubos e permaneceram armazenadas em freezer (-14°C).



Fonte: Google maps(<https://www.google.com/maps/d/edit?hl=pt-BR&hl=pt-BR&authuser=0&authuser=0&mid=zePEI4IHG49c.kN045f13IJc0>)

Figura 1. Localização das biofábricas fornecedoras das amostras estudadas.

3.3 Análise molecular

Os indivíduos foram submetidos à técnica de extração total de DNA e amplificação por PCR (MULLINS & FALOONA, 1987). Para este trabalho foram utilizados os mesmos cinco *loci* polimórficos analisados para *Cotesia glomerata* (Linnaeus) (Hymenoptera: Braconidae), conforme proposto por ZHOU et al. (2005) (Tabela 1).

Tabela 1. Características dos cinco *loci* polimórficos de microssatélites em *Cotesia glomerata* adotados para *C. flavipes*.

Loci	Sequência do primer (5'-3')	nº. de alelos	Temperatura de pareamento (°C)
<i>Cot1</i>	F: CCTCACAGCATTATGATGAA R: GAGGGATTGCCGTTTGT	15	52
<i>Cot2</i>	F: CGACAACCCCAACTTTAGA R: AAGCGCTCTAATCATAACAC	6	56
<i>Cot3</i>	F: TCCAGGCCAAACAGCTATGC R: AGTTTCTCCTCAGCCCCGAA	4	61
<i>Cot4</i>	F: CCCGCTGATCGGTATCT R: CAACAATCATCTCTTTGGCA	2	54
<i>Cot5</i>	F: AAGCGCCAGATGCGAGT R: CACCAACCGCGATGAAA	4	60

F, forward primer; R, reverse primer

3.3.1 Obtenção do DNA total

O DNA foi extraído individualmente utilizando o Wizard® Genomic DNA Purification kit [Promega] com pequenas alterações no protocolo indicado pelo fabricante. Essas alterações se referem ao tempo em que o material ficou incubado em banho maria a 55°C (16h).

Assim que esse processo tivesse terminado adicionou-se 50 µL de água MiliQ e então o DNA foi armazenado em freezer (-14°C).

3.3.2 Amplificação da região gênica de interesse por PCR e géis

As amplificações por PCR foram realizadas com 25 µL de volume final de reação utilizando kit da Promega®. As condições de amplificação foram iniciadas com uma desnaturação a 94°C durante 5 min, seguido por 30 ciclos de 95°C durante 30 s, à temperatura específica de *primer* para anelamento por 30 s (Tabela 1), 72°C durante 30 s; e finalizando com 72°C durante 20 min para extensão final. Os

produtos de PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 2% para checagem de amplificação e gel de poliacrilamida 6% onde foram observados os fragmentos de DNA microssatélite.

3.4 Parâmetros Moleculares e Análises Estatísticas

Matrizes foram construídas a partir da análise dos alelos por *fingerprint* nos géis de poliacrilamida. A heterozigosidade observada (H_o) e esperada (H_e), riqueza alélica e índice de fixação (FIS) foram analisadas com o programa ARLEQUIN 3.5.2.2 (EXCOFFIER et al., 2005). Foi também realizada uma análise de variância molecular (AMOVA) (MICHALAKIS & EXCOFFIER, 1996) com esse mesmo programa computacional para verificar o grau de diferenciação genética a partir dos valores de R_{ST} (SLATKIN, 1995). A distância genética, frequência dos alelos, heterozigosidade e relação da frequência esperada e observada foram analisadas com o programa TFGA (*Tools for population genetic analyses 1.3*) (MILLER, 1997). A estrutura genética das populações foi avaliada com a ajuda do programa Structure 2.3. (PRITCHARD et al., 2000).

Para o teste biológico de comprimento da tíbia, os dados foram submetidos à Análise de Variância (ANOVA) e teste de separação de média (Teste de Tukey, $P \leq 0,05$) utilizando-se o software SAS (SAS Institute, Cary, NC).

4.RESULTADOS

4.1 Comprimento da tibia

Foram utilizadas 22 fêmeas de cada biofábrica estudada para a realização da medição da tibia posterior. Os resultados obtidos indicaram diferenças significativas ($F_{7,184} = 15,96$; $P < 0,0001$) entre as populações avaliadas (Figura 2).

O menor comprimento encontrado para a tibia foi de 0,225 mm para os indivíduos provenientes da biofábrica USM e o maior foi de 0,448 mm para os indivíduos da biofábrica PR. Dentre os valores mínimos do comprimento da tibia para todas as amostras o maior encontrado foi na BA (0,376 mm) e nos comprimentos máximos para todas as amostras o menor encontrado foi em GO (0,393 mm). A média para os menores comprimentos de todos indivíduos analisados foi de 0,3345 mm e para os maiores comprimentos foi de 0,4221 mm. A média geral do comprimento da tibia foi de 0,3852 mm.

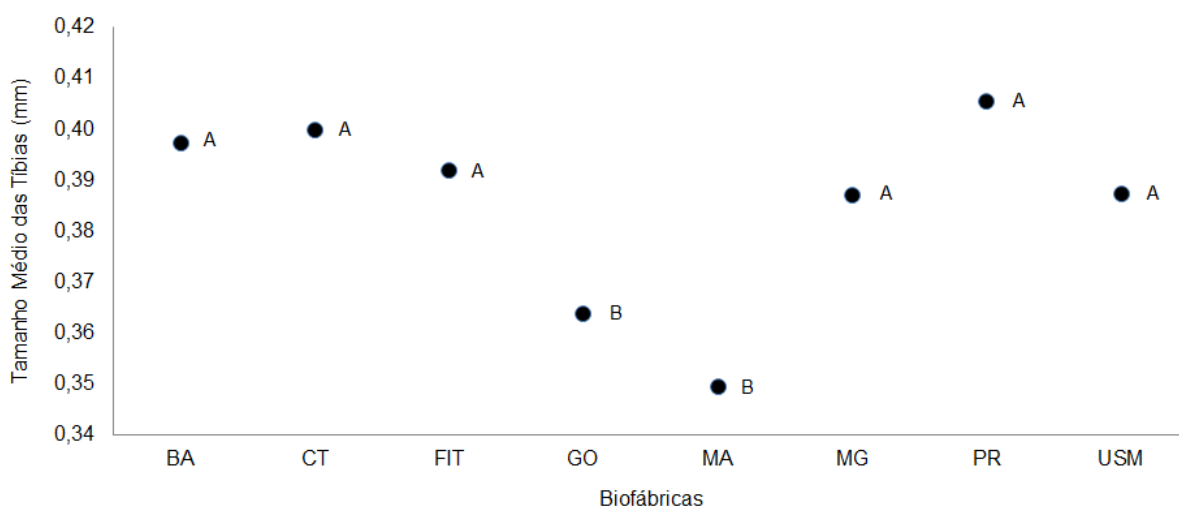


Figura 2. Comprimento médio da tíbia de *C. flavipes* para as diversas biofábricas do Brasil. **FIT** = Fitoagro, Maceió, AL; **MG** = Usina Serra dos Aimorés, MG; **MA** = Agroserra, São Raimundo das Mangabeiras, MA; **PR** = Usina Bandeirante, PR; **GO** = Bioecocana, Santa Helena de Goiás, GO; **USM** = Usina São Martinho, Pradópolis, SP; **CT** = Biocontrol, Sertãozinho, SP; **BA** = Biocana, Pontal, SP. (Diferença Mínima Significativa = 0,0208).

4.2 Análise molecular

Este trabalho foi realizado com quatro loci, pois um deles Cot 4 (ZHOU et al., 2005) não foi passível de amplificação apesar de ter sido testado também com técnica de purificação do DNA e a adição de diferentes volumes de DMSO para realização de PCR. Os quatro *loci* foram polimórficos. No *locus* Cot1 observou-se a presença de três alelos, nos *loci* Cot2 e Cot3 apenas dois alelos e o *locus* Cot5 apresentou 12 alelos. Para o *locus* Cot3, seis das oito amostras das biofábricas estudadas foram monomórficas e para o Cot2, quatro foram monomórficas (Figura 3).

As frequências alélicas de três *loci* (Cot2, Cot3, e Cot5) estavam de acordo com o Equilíbrio de Hardy-Weinberg para todas as populações enquanto que para o

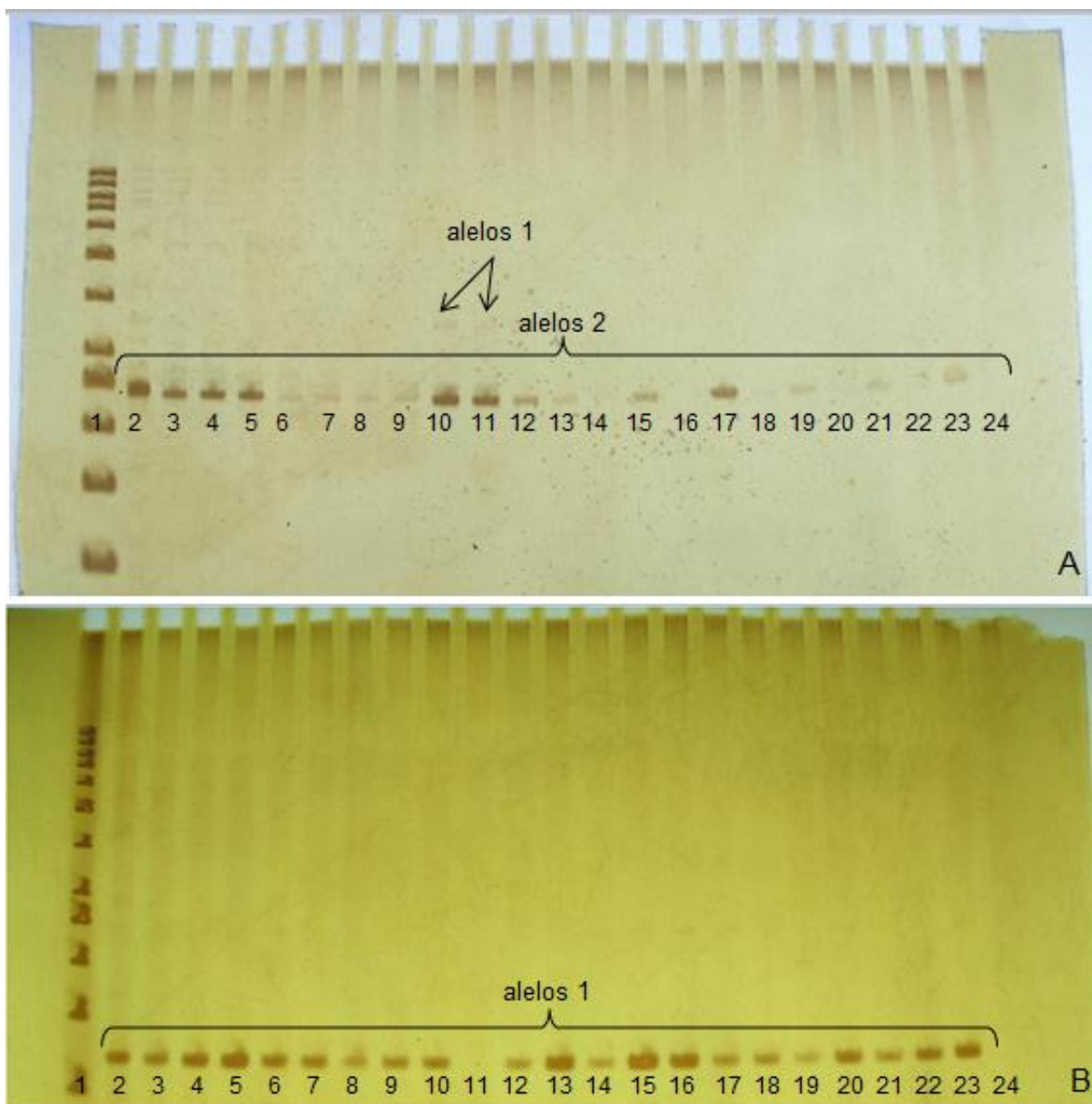


Figura 3. Gel de poliacrilamida com 24 poços. No poço 1 o peso 50pb e no 24 o controle. **A.** Alelos 1 e 2 encontrados na localidade Usina São Martinho Pradópolis, SP (**USM**) marcados com o primer Cot 1. Poços 14, 20 e 22 com ausência de alelos; **B.** Alelo 1 encontrado na localidade Usina Serra dos Aimorés, MG (**MG**) marcados com o primer Cot 2. Poço 11 com ausência de alelos.

outro *loci* (25%) (Cot1) nenhuma das populações apresentou-se em equilíbrio. Foi encontrada uma média de 4,75 alelos por *locus* variando de 2 a 12. A menor

frequência alélica foi observada para o *locus* Cot5 para os alelos denominados 7 e 9 da população da Usina dos Aimorés, MG (Tabela 2).

Foi observada a presença de cinco alelos exclusivos em apenas dois *loci* (Cot1 e Cot5). Em Cot1 o alelo 2 foi exclusivo para amostras da biofábrica MA enquanto que para o Cot5 cada uma das quatro biofábricas (FIT, MG, MA e USM) apresentaram um alelo exclusivo (4, 11, 8 e 10 respectivamente). A heterozigosidade observada (H_o) variou de 0,1667 em USM a 0,6055 em BA e a heterozigosidade esperada (H_e) variou de 0,1890 em MA a 0,4342 em BA. Os maiores valores foram encontrados na localidade BA ($H_o= 0,6055$ e $H_e=0,4342$).

Tabela 2. Frequência alélica de quatro *loci* de DNA microsatélite para amostras de biofábricas no Brasil. Heterozigosidade médias esperada (H_e) e observadas (H_o) para as biofábricas (em negrito valores em desequilíbrio de HW). n= número de indivíduos amplificados.

<i>Locí</i>	FIT	MG	MA	PR	GO	USM	CT	BA	
Cot1	n = 14	n = 22	n = 21	n = 21	n = 21	n = 21	n = 22	n = 22	
Alelos	1	0,1786	0,1136	-	0,1429	0,1190	0,0952	0,1818	0,0909
	2	-	-	0,0476	-	-	-	-	-
	3	0,8214	0,8864	0,9524	0,8571	0,8810	0,9048	0,8182	0,9091
Cot2	n = 21	n = 21	n = 41	n = 43	n = 22	n = 8	n = 22	n = 21	
Alelos	1	0,5000	-	-	-	0,4091	-	0,1136	0,3333
	2	0,5000	1	1	1	0,5909	1	0,8636	0,6667
Cot 3	n = 12	n = 22	n = 8	n = 22	n = 4	n = 7	n = 22	n = 21	
Alelos	1	1	1	1	0,5000	1	1	1	0,6905
	2	-	-	-	0,5000	-	-	-	0,3095
Cot 5	n = 22	n = 22	n = 39	n = 32	n = 22	n = 21	n = 22	n = 22	
Alelos	1	0,1364	0,4091	0,2821	0,2969	0,1818	0,2381	0,1136	0,1818
	2	0,1591	-	0,6410	0,1563	0,0909	-	0,0682	0,0682
	3	0,0682	-	-	-	-	-	0,0227	0,0682
	4	0,1364	-	-	-	-	-	-	-
	5	-	-	-	-	0,2270	-	0,0455	-
	6	-	-	0,2560	-	0,1591	-	-	-
	7	-	0,0227	0,1026	0,0469	0,0455	-	-	0,1591
	8	-	-	0,2560	-	-	-	-	-
	9	-	0,0227	-	-	-	-	0,2500	-
	10	-	-	-	-	-	0,5238	-	-
	11	-	0,0455	-	-	-	-	-	-
	12	0,5000	0,5000	0,5000	0,5000	0,5000	0,2381	0,5000	0,5227
H_o	0,5893	0,3068	0,2738	0,5714	0,5141	0,1667	0,3977	0,6055	
H_e	0,3788	0,1998	0,1890	0,3520	0,3515	0,2009	0,3084	0,4342	

FIT = Fitoagro, Maceió, AL; MG = Usina Serra dos Aimorés, MG; MA = Agroserra, São Raimundo das Mangabeiras, MA; PR = Usina Bandeirante, PR; GO = Bioecocana, Santa Helena de Goiás, GO; USM = Usina São Martinho, Pradópolis, SP; CT = Biocontrol, Sertãozinho, SP; BA = Biocana, Pontal, SP.

Para as análises de diferenciação populacional realizado através do programa computacional TFPGA (*Tools for population genetic analyses 1.3*) (MILLER, 1997) utilizando a estatística F de Wright (1978), que mede a redução média dos heterozigotos de um grupo analisado em relação a uma população total, os valores para F_{st} , F_{it} e F_{is} foram significativamente diferentes de zero para todas as populações analisadas. Quando os *loci* foram analisados individualmente observou-se que no *locus* Cot1 a diferenciação genética foi baixa ($F_{st} = 0,0051$) estando fora do intervalo de confiança e portanto não significativo; já para os *loci* Cot2 e Cot3 foi alta ($F_{st} = 0,3191$ e $F_{st} = 0,3624$, respectivamente), enquanto que para o *locus* Cot5 foi moderada ($F_{st} = 0,0819$). Levando em consideração todos os *loci* analisados, a diferenciação genética foi moderada ($F_{st} = 0,1656$) (Tabela 3).

Tabela 3. Estatística F de Wright para os quatro *loci* polimórficos de microssatélites em amostras de biofábricas de *Cotesia flavipes* do Brasil realizado através do programa computacional TFPGA (*Tools for population genetic analyses 1.3*).

Locí	F_{it}	F_{st}	F_{is}
Cot 1	-0,1238	0,0051	-0,1296
Cot 2	-0,0955	0,3191	-0,6089
Cot 3	-0,1071	0,3624	-0,7364
Cot 5	-0,3204	0,0819	-0,4382
Todos os <i>loci</i>	-0,2116	0,1656	-0,4521
I.C. 95%			
Mínimo	-0,2966	0,0643	-0,6708
Máximo	-0,1013	0,3409	-0,2588

F_{it} = Coeficiente de endocruzamento nas sub-populações; F_{is} = Coeficiente de endocruzamento total; F_{st} = Índice de fixação. I.C. = Intervalo de Confiança com nível de significância em 95%.

As distâncias e identidades genéticas de Nei (1978) mostram que a amostra da biofábrica PR (Usina Bandeirantes/PR) e amostra da biofábrica FIT (Fitoagro/AL) possuem a maior distância genética ($D = 0,2160$) entre si enquanto as amostras das

biofábricas GO (Bioecocana/GO) e FIT (Fitoagro/AL) possuem a menor distância genética (Tabela 4).

Tabela 4. Valores de distância (D) e identidade (I) genéticas de Nei (1978). D abaixo e I acima da diagonal geradas com o programa computacional TFPGA (*Tools for population genetic analyses 1.3*).

Localidade	FIT	MG	MA	PR	GO	USM	CT	BA
FIT		0,9057	0,9091	0,8057	0,9982	0,8558	0,9425	0,9509
MG	0,0991		0,9967	0,9195	0,9408	0,9471	0,9785	0,9335
MA	0,0954	0,0033		0,9190	0,9466	0,9465	0,9778	0,9434
PR	0,2160	0,0840	0,0845		0,8420	0,8612	0,8907	0,9464
GO	0,0018	0,0611	0,0549	0,1720		0,8897	0,9621	0,9659
USM	0,1558	0,0544	0,0550	0,1494	0,1169		0,9306	0,8760
CT	0,0592	0,0218	0,0224	0,1157	0,0387	0,0719		0,9402
BA	0,0503	0,0688	0,0583	0,0551	0,0347	0,1324	0,0616	

FIT = Fitoagro, Maceió, AL; MG = Usina Serra dos Aimorés, MG; MA = Agroserra, São Raimundo das Mangabeiras, MA; PR = Usina Bandeirante, PR; GO = Bioecocana, Santa Helena de Goiás, GO; USM = Usina São Martinho, Pradópolis, SP; CT = Biocontrol, Sertãozinho, SP; BA = Biocana, Pontal, SP.

Com o uso do software ARLEQUIN 3.5.2.2 (EXCOFFIER et al., 2005), a Análise de Variância Molecular (AMOVA) mostrou que a porcentagem de variação entre as populações para todos os *loci* foi de 24,65% e dentro das populações de 75,34%. O nível de diferenciação médio entre as populações (F_{st}) foi de 0,2465 ($p=0,0$) indicando uma estruturação moderada (acima de 0,25 é considerada alta). A comparação entre populações mostrou a maior porcentagem de variação (40,06%) para o *locus* 3 e dentro das populações a porcentagem de variação foi elevada, variando de 59,93% (*locus* 3) a 92,03% (*locus* 4) (Tabela 5).

Tabela 5. Análise da variância molecular (AMOVA) para as amostras de *Cotesia flavipes* nas biofábricas estudadas para os diferentes locus gênico.

<i>Loci</i>	% variação		Índice fixação	
	Entre amostras	Dentro amostras	Fst	valor P
Cot1	24,78151	75,21849	0,24782	0,00000
Cot2	32,41718	67,58282	0,32417	0,00000
Cot3	40,06175	59,93825	0,40062	0,00000
Cot5	7,96026	92,03974	0,07960	0,00000
Total	24,65911	75,34089	0,24659	0,00000

A estrutura das populações foi também analisada com o auxílio do aplicativo Structure 2.3. (PRITCHARD et al., 2000). Para essa matriz foram realizadas análise para 10.000 gerações (*Length of burnin period*) com 10.000 réplicas MCMC (Markov chain Monte Carlo), utilizando o modelo *Admixture* e K variando de 1 a 5 com 25 réplicas para cada valor testado. Com a análise selecionou-se K = 2 (indicando que dois grupos ancestrais seriam necessários para a constituição da variabilidade genética encontrada atualmente) e fez-se um segundo cálculo com a ajuda do aplicativo Structure Harvester v. 0.6.92 (EARL; vonHOLDT, 2012) mostrando um gráfico de DeltaK (Figura 4).

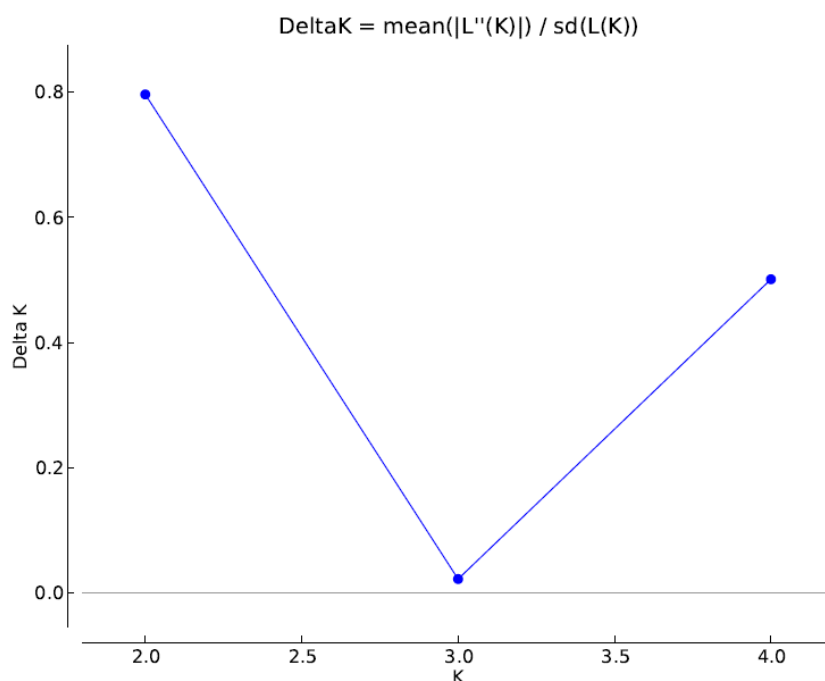


Figura 4. Valor ótimo de K (variando de 1 a 5) em análise com Structure 2.3 para todas as amostras das biofábricas estudadas de *C. flavipes* (Structure Harvester -taylor0.biology.ucla.edu/structureHarvester/).

Verificado o maior pico em $K=2$ utilizou-se o programa Cluster Markov Packager Across K (<http://clumpak.tau.ac.il/>) para análise somente do grupo de amostras com este K (25 corridas). O resultado mostrou que todas as amostras das biofábricas analisadas apresentam as mesmas constituições genéticas em termos de qualidade, sendo observado na Figura 3 que todos os indivíduos possuem tanto a cor laranja como a azul. Porém a quantidade de contribuição dos grupos iniciais para cada indivíduo foi variável (proporções de azul e laranja diferentes) (Figura 5).

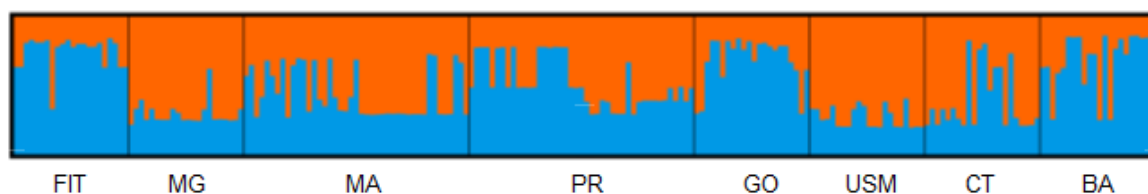


Figura 5. Estrutura genética das oito linhagens estudadas para $K = 2$.

5. DISCUSSAO

Estudos moleculares com *C. flavipes* são escassos, apesar desta espécie ser de grande importância para o controle biológico em diversos países. Como foi realizada uma amplificação heteróloga neste trabalho um dos *loci* estudados (Cot4) não mostrou amplificação, porém para *C. glomerata* todos os cinco *loci* testados amplificaram (ZHOU et al., 2005). Já para a espécie *Cotesia congregata* (Say), Jensen et al. (2002) desenvolveram nove *loci* de microssatélites e quando testado para quatro grupos de insetos observaram que apenas um foi monomórfico enquanto que os outros oito *loci* foram polimórficos.

O número de alelos encontrados neste trabalho variou de um a 12 para quatro *loci* estudados. No trabalho utilizado como modelo para a amplificação heteróloga deste estudo, Zhou et al. (2005) encontraram que todos os cinco *loci* analisados foram polimórficos e o número de alelos variou de dois a 15. No trabalho realizado por Kankare et al. (2004) foi realizada amplificação heteróloga para cinco espécies de *Cotesia* (*Cotesia acuminata* [Reinhard], *C. bignellii* [Marshall], *C. cynthiae* [Nixon], *C. congregata*, *C. melitaearum* [Wilkinson], *C. koebelei* [Riley]) utilizando marcadores microssatélites de *C. melitaearum* e observou-se que em vários casos a amplificação não ocorreu. Verificou-se também uma grande variação (1 a 15) para apenas cinco *loci* estudados (dois foram monomórficos, um loco com três alelos, outro com cinco e o último com 15 alelos), fato também verificado para *C. flavipes* ao utilizar-se de *primers* desenvolvidos para outra espécie. A heterozigosidade observada (H_o) por esses autores em relação à heterozigosidade esperada (H_e) foi sempre menor para todos os *loci*, o que não se aplicou no presente estudo, visto que aqui isso ocorreu somente em uma das oito biofábricas. Para *C. melitaearum*, a maior heterozigose esperada foi de 0,88 e para *C. flavipes* deste estudo foi de 0,43, enquanto a maior heterozigosidade observada foi de 0,60 e para *C. melitaearum* foi de 0,39.

As localidades determinadas para coleta dos materiais deste trabalho foram escolhidas baseando-se na busca por diferentes estados brasileiros e na disponibilidade da empresa em colaborar com o projeto.

A utilização de fêmeas foi de crucial importância visto que machos deste grupo são haplóides, formados a partir de ovos não fertilizados e as fêmeas

formadas a partir de ovos fertilizados sendo diplóides. Quando ocorre a fertilização de ovos na formação de machos, estes se apresentam estéreis ou inviáveis, como foi demonstrado para *Cotesia vestalis* (Haliday) (*C. plutellae*) (BOER et al., 2007). Porém, estudos mais recentes demonstraram que para *Cotesia glomerata* (Linnaeus) a endogamia pode ter um papel de pressão seletiva para a evolução da fertilidade masculina diploide visto que testes com acasalamentos, sob condições naturais, mostraram que mais da metade de todos os cruzamentos envolvem irmãos (ELIAS et al., 2010). A utilização de insetos deste trabalho envolve somente biofábricas de diversos locais do país que provavelmente estão em condições de cruzamentos entre aparentados (endocruzamentos) e o número de indivíduos analisados foi baseado no trabalho de Zhou et al. (2005) de onde também foi usado como referência para a utilização dos *primers*.

A alta heterozigosidade observada é encontrada em populações que passaram por uma recente diminuição do seu tamanho efetivo, isto porque a redução do número de alelos é mais rápida do que da heterozigosidade esperada pelo Equilíbrio de Hardy-Weinberg, como consequência há uma deficiência transitória do número de alelos encontrados na população, até que o equilíbrio do modelo “mutação-deriva” seja reestabelecido ao longo das populações (CORNUET; LUIKART, 1996). A presença de alelos exclusivos com frequências baixas pode indicar que sejam recentes na população não havendo ainda tempo suficiente para sua propagação por fluxo gênico no genoma dos indivíduos enquanto altas frequências destes alelos podem ser explicadas por uma ancestralidade do alelo que não foi perdido ao longo das gerações (deriva genética) (FUTUYMA, 2009).

A estatística F de Wright demonstrou diferenciação genética moderada, que pode ser reforçada pelos valores de distância e identidade genéticas de Nei (heterozigosidade esperada para amostras populacionais de pequeno tamanho). Os valores de distância entre as biofábricas estudadas podem assegurar que elas possuem diferenças genéticas entre si, sendo que entre algumas amostras isso seja maior. Portanto, isso permite sugerir que as biofábricas possam realizar troca de materiais biológicos (insetos de *C. flavipes*) entre si para a manutenção da variabilidade genética, visto que as amostras estudadas possuem frequências alélicas diferenciadas. O *locus* 3 é o que mais contribui para essa variabilidade, visto

que tanto nas análises com os aplicativos TFPGA como com o Arlequin 3.5.2.2 mostraram alto nível de diferenciação. Como as linhagens estão ficando isoladas (em seus laboratórios de criação massal) a presença de um *locus* com essa maior diferenciação amplia os indícios para se fazer um manejo entre essas criações. Observa-se em especial que os maiores valores encontrados de distância genética foi na população do Paraná em relação às demais e a maior média do comprimento da tíbia também foi para essas amostras. No caso dos valores da tíbia é possível afirmar que a população ancestral (fundadora) tenha uma grande variabilidade para diferentes comprimentos da tíbia e as amostras exibem os fragmentos dessa variação, visto a ausência de seleção pois estes insetos vivem nos laboratórios em condições controladas. Os valores negativos para F_{it} e F_{is} significam excesso de heterozigotos (CORNUET; LUIKART, 1996).

A AMOVA indicou uma estruturação moderada das populações bem como foi analisado pela estatística F de Wright. Mas utilizando-se os resultados da distância genética (software TFPGA) e diferenciação dentro das populações (observados com o auxílio do software Structure 2.3) é possível propor formas de mistura entre esses materiais genéticos. As populações com maior distância genética e observadas com maior diferenciação em comparação ao número e frequência dos alelos (F_{st} diferentes, significativos e altamente estruturados) poderiam trocar materiais entre si e com isso incrementarem suas criações massais. Dessa forma pode-se propor uma mistura entre PR e FIT, PR e USM, PR e CT, FIT e USM, GO e USM, USM e BA.

As análises com o aplicativo Structure permitiram a observação de $K = 2$, sendo K o número possível de grupos ancestrais necessários que mostra a variabilidade atual (PRITCHARD et al., 2000). Portanto, a mistura desses dois grupos permitiu uma combinação gênica vista atualmente e com o compartilhamento de genótipos entre essas amostras estudadas e nenhum dos indivíduos se mostrou diferente dos demais em relação a qualidade gênica e sim em relação a quantidade.

As diferenças na composição genética de *C. flavipes* mostradas neste trabalho, para as biofábricas estudadas, podem levar a uma sugestão de que esses endocruzamentos, que estão acontecendo há pelo menos 38 anos, possam estar relacionados com uma diminuição do *fitness* do inseto no campo, como por exemplo a diminuição da capacidade de voo. A ação da deriva genética, com o efeito do

fundador, leva a uma diminuição de variabilidade ao acaso, podendo assim se perder genes benéficos para a biologia do inseto (FUTUYMA, 2009). Portanto, a combinação de diversos materiais biológicos de *C. flavipes* poderia auxiliar no aumento desta variabilidade em especial entre as amostras que apresentam alelos exclusivos. Visto isso, além da mistura de materiais biológicos já proposta, uma nova introdução dos insetos selvagens, nessas criações massais, poderia trazer um aumento (retomada) da variabilidade genética e conseqüentemente agregar uma melhora do inseto no campo.

Apesar do estudo da biologia molecular de *C. flavipes* ter se expandido com este trabalho e ter-se aliado a um fator da morfologia do inseto (comprimento da tíbia), trabalhos futuros seriam de grande importância para o esclarecimento da possível relação entre a variabilidade genética e os diversos componentes da biologia do inseto (como atividade de voo, sobrevivência do adulto, características morfométricas, capacidade de parasitismo). Conhecer a influência real da constituição genética e o que isso acarreta nas características biológicas de criações massais destes parasitoides poderá ser uma grande contribuição para as diversas biofábricas.

6. CONCLUSÃO

1. A utilização de microssatélites (Cot1, Cot2, Cot3 e Cot5) permite caracterizar *C. flavipes*.
2. Insetos criados em biofábricas brasileiras apresentam diferenciação genética moderada a alta.
3. Valores de comprimento da tíbia e estudos moleculares em *C. flavipes* evidenciaram a diversidade genética das amostras.

7. REFERÊNCIAS

- BAKER, D. A.; LOXDALE, H. D.; EDWARDS, O. R. Genetic variation and founder in the parasitoid wasp, *Diaeretiella rapae* (M'Intosh) (Hymenoptera:Aphidiidae), affecting its potential as a biological control agent. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 12, n. 12, p. 3303–3311, 2003.
- BARROSO, F.; ADAY, O., SILVIA ACOSTA, F. R.; MUJICA, D.; BARROSO, J. Aclimatación y colonización de *Cotesia flavipes* Cam. en áreas de producción en Villa Clara, Cuba. **Centro Agrícola**, ano 30, n. 1, p. 55-58, 2003.
- BOER, J.G. DE; ODE P.J.; VET, L. E. M.; J. WHITFIELD & G. E. HEIMPEL. Complementary sex determination in the parasitoid wasp *Cotesia vestalis* (*C. plutellae*). **Journal compilation**, European Society for Evolutionary Biology, p. 340–348, 2007.
- BOTELHO, P.S.M.; MACEDO, N. *Cotesia flavipes* para o controle de *Diatraea saccharalis*. In: Parra, J. R. P.; Botelho, P. S. M.; Corrêa-Ferreira, B. S.; Bento, J. M. S. (Ed.). **Controle Biológico no Brasil: parasitoides e predadores**. São Paulo: Editora Manole, p. 409-426, 2002.
- CAIXETA, D. F. **Dispersão de machos de *Diatraea saccharalis* (Fabricius) (Lepidoptera: Crambidae) em cana-de-açúcar**. 2010. 48f. 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, 2010.
- CONAB, **Companhia Nacional de Abastecimento**. Acompanhamento de safra brasileira: cana-de-açúcar. Safra 2015/2016. Segundo levantamento, agosto/2015 - Companhia Nacional de Abastecimento. – Brasília : Conab 2015. Disponível em: <http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/15_09_11_10_51_14_boletim_cana_portugues_-_2o_lev_-_15-16.pdf>. Acesso em 21/10/2015.
- CORNUET, J. M.; LUIKART, G. Description and power analysis of two tests for detecting recent population bottlenecks from allele frequency data. **Genetics**, v. 144, p. 2001-2014, 1996.

DINARDO-MIRANDA, L. L.; FRACASSO, J. V.; PERECIN, D. Variabilidade espacial de populações de *Diatraea saccharalis* em canaviais e sugestão de método de amostragem. **Bragantia**, Campinas, v. 70, n. 3, p.577-585, 2011.

DINARDO-MIRANDA, L. L.; FRACASSO, J. V.; ANJOS, I. A. dos; GARCIA, J.; COSTA, V. P. da. Influência da infestação de *Diatraea saccharalis* (Fabr.) sobre parâmetros tecnológicos da cana-de-açúcar. **Bragantia**, Campinas, 2012.

DINARDO-MIRANDA, L. L.; FRACASSO, J. V.; COSTA, V. P. da; VILELA, J.; LOPES, D. O. T. Dispersal of *Cotesia flavipes* in sugarcane field and implications for parasitoid releases. **Bragantia**, Campinas, v. 73, n. 2, p.163-170, 2014.

EARL, Dent A. and vonHoldt, Bridgett M. (2012) STRUCTURE HARVESTER: a website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. *Conservation Genetics Resources* vol. 4 (2) pp. 359-361 doi: 10.1007/s12686-011-9548-7.

ELIAS, J.; DORN, S.; MAZZI, D. Inbreeding in a natural population of the gregarious parasitoid wasp *Cotesia glomerata*. **Molecular Ecology**, v. 19, n. 11, p. 2336-2345, 2010.

EXCOFFIER, L.; LAVAL, G.; SCHNEIDER, S. Arlequin ver. 3.1: An integrated software package for population genetics data analysis. **Evolutionary Bioinformatics Online**. v. 1, p. 47-50, 2005.

FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. EMBRAPA – CENARGEN, 2 ed, Brasília, 1998.

FUTUYMA, D.J. **Evolution**. In: _____ (2º ed) Population structure and genetic drift 2009.

GARCIA, J. F.; BOTELHO, P. S. M.; MACEDO, L. P. M. Criação do parasitoide *Cotesia flavipes* em laboratório. In: BUENO, V. H. P. (Ed.). **Controle Biológico de Pragas: Produção Massal e Controle de Qualidade**. Lavras: Editora UFLA, p. 199-220, 2009.

HART, D. L.; CLARK, A. G. **Principles of population genetics**. 3ª. ed. Sinauer Pub., Sunderland: Canadá, 1997.

HAYASHIDA, E. K.; KASSAB, S. O.; FONSECA, P. R. B. da; ROSSONI, C. L.; AMORIM, E. de S.; PESSOA, L. G. Efeito dos isolados de *Metarhizium anisopliae* (metschnikoff) sorokin (Hypocreales: Clavicipitaceae) sobre parasitoide *Cotesia flavipes* (Cameron, 1891) (Hymenoptera: Braconidae). **Nucleus**, v.9, n.1.,2012.

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 *Aphidus ervi*, a parasitoid wasp. **Molecular Ecology**. v.13, p. 337–348, 2004.

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

JENSEN, M. K.; KESTER K. M.; KANKARE M.; BROWN B. L. Characterization of microsatellite loci in the parasitoid, *Cotesia congregata* (Say) (Hymenoptera Braconidae). **Molecular Ecology Notes**, v. 2, p. 346–348, 2002.

JOHNSON, A. J.; WEINTRAUB, P. G.; KATOCH, R.; SCHEMERHORN, B. J.; SHUKLE, R. H. Biological and molecular characterization of *Hessian fly* (Diptera: Cecidomyiidae) from Israel. **Bulletin of Entomological Research**, n. 102, p. 632–643, 2012.

KANKARE M.; JENSEN, M. K.; KESTER K. M.; SACCHERI J I. Characterization of microsatellite *loci* in two primary parasitoids of the butterfly *Melitaea cinxia*, *Cotesia melitaearum* and *Hyposoter horticola* (Hymenoptera). **Molecular Ecology Notes**, v. 4,p. 231 –233, 2004.

LEHMANN, T.; HAWLEY, W. A. & COLLINS, F. H. An evaluation of evolutionary constraints on microsatellite loci using null alleles. **Genetics**. v. 144, p. 1155-1163, 1996. MACEDO, N.; ARAÚJO, J. R. **Controle biológico da broca da cana-de-açúcar**, IAA/Planalsucar: 24 p., Piracicaba, 2000.

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

MACEDO, N.; ARAÚJO, J. R. **Controle biológico da broca da cana-de-açúcar**, IAA/Planalsucar: Piracicaba, 2000. 24p.

MASSON, M. B.; PINTO, A. de S.; CANINI, F. L. S.; JUNQUEIRA, V. R. P.; LIMA, J.A.; CANO, M. A. V. Liberação de diferentes quantidades de *Cotesia flavipes* no controle de *Diatraea saccharalis* em cana-de-açúcar. **VI Workshop Agroenergia**, Ribeirão Preto, SP, 2012.

MAYR, E. Storage and protection of genetic variation. In: _____. (Ed.). **Populations, Species, and Evolution: An Abridgment of Animal Species and Evolution**. Cambridge: Havard University, 1970. p.136-161.

MENDONÇA, A. F. Pragas da cana-de-açúcar. Maceió: Insetos & Cia. 200 p., 1996

MENDONÇA F, A.F.; RISCO; S.H.B.; COSTA, J.M.B. Introduction and rearing of *Apanteles flavipes* CAMERON (HYM.: BRACONIDAE) in Brazil. **Entomology**. p. 703 – 710, 1977.

MICHALAKIS, Y.; EXCOFFIER, L. A. Generic estimation of population subdivision using distances between alleles with special reference for microsatellite loci. **Genetics**. v. 142, p. 1061-1064, 1996.

MILLER, M. P. Tools for population genetic analyses (TFPGA) 1.3: A Windows program for the analyses of allozyme and molecular population genetic data. Computer software distributed by author, 1997.

MUIRHEAD, K. A.; MURPH, N. P.; SALLAM, N.; DONNELLAN, S. C.; AUSTIN, A. D. Phylogenetics and genetic diversity of the *Cotesia flavipes* complex of parasitoid wasps (Hymenoptera: Braconidae), biological control agents of lepidopteran stemborers. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 63, p. 904–914, 2012.

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

NAVAS, D. E.; PINTO, A. S.; SILVA, S. D. dos A. **Controle biológico da broca-da-cana de açúcar**. Embrapa Clima Temperado, Pelotas – RS, 2009.

PADILHA, L.; GUIMARÃES, C. T.; PAIVA, E. **Avaliação da pureza genética em sementes de milho utilizando marcadores microsatélites**. Circular Técnica 30, Sete Lagoas – MG, 2003.

PARRA, J. R. P. **A biologia de insetos e o manejo de pragas: da criação em laboratório a aplicação em campo**. In: GUEDES, J. C.; COSTA, I. D.; CASTIGLIONI, E. (Eds.). Bases técnicas do manejo de insetos. Santa Maria: Universidade Federal de Santa Maria, 2000, cap. 4, p. 59-68.

PINTO, A.S. **Controle de pragas da cana-de-açúcar**. Piracicaba, SP – Boletim Técnico Biocontrol (2006).

PINTO, A. S.; GARCIA, J. F.; BOTELHO, B. S. M. **Controle biológico da cana-de-açúcar**. In: PINTO, A. S.; NAVA, D. E.; ROSSI, M. M.; MALERBO-SOUZA, D. T. (Eds.). Controle biológico de pragas na prática. Piracicaba, 2006. 287 p.

POMARI, A. F. Dispersão de *Cotesia flavipes* em cana-de-açúcar (cana-planta), no município de Bandeirantes-Paraná. Congresso Brasileiro de Entomologia. v. 22. 2008.

PRITCHARD, J. K.; STEPHENS, M.; DONNELLY, P. Inference of population structure using multilocus genotype data. **Genetics**, v. 155, p. 945–959. Documentation for structure software: Version 2.3, 2000.

ROSSATO Jr., J. A. de S. ***Diatraea saccharalis* (Fabr.) (Lepidoptera: Crambidae) e *Mahanarva fimbriolata* (Stal) (Hemiptera: Cercopidae) em cana-de-açúcar: impacto na qualidade da matéria-prima, açúcar e etanol**. 2012. 109f. Tese (Doutorado em Agronomia - Entomologia Agrícola) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Jaboticabal, 2012.

SALVATORE, A. R.; GARCÍA, M. B., ROMERO, E.; WILLINK, E. Sugar losses caused by the sugarcane borer (*Diatraea saccharalis*) in Tucumán, Argentina. **Proc. Int. Soc. Sugar Cane Technol**, Argentina, v. 27, 2010.

SANTOS, D. M. **Produção em massa de agentes biológicos para controle de *Diatraea saccharalis* em cana-de-açúcar**. 2009. Monografia (Tecnologia em Agropecuária) - Faculdade de Ciências Exatas e da Terra, Dourados, MS, 2009.

SAS INSTITUTE. SAS/STAT User`s Guide, version 9.00 TS level 2MO. SAS Institute Inc., Cary, NC: SAS Institute Inc., 2002.

SLATKIN, M. A. Measure of population subdivision based on microsatellite allele frequencies. **Genetics**. v. 139, p. 457-462, 1995.

STÅHLS, G.; SAVOLAINEN, E. MtDNA COI barcodes reveal cryptic diversity in the *Baetis vernus* group (Ephemeroptera, Baetidae). **Molecular Phylogenetics and Evolution**, Orlando, v. 46, n. 1, p. 82–87, 2008.

SUGANUMA, C. H. **Avaliação da Diversidade Genética de Populações de Pacu (*Piaractus mesopotamicus* Holmberg, 1887) do Pantanal Matogrossense com o Uso de Marcadores Moleculares do Tipo Microssatélites**. 2008. 105 f. Tese (Doutorado em Aqüicultura) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2008.

SUNNUCKS, P. Efficient genetic markers for population biology. **Tree**. London, v. 15. n. 5, p. 199-203, 2000.

van LENTEREN, J.C. **Quality control and production of biological control agents: theory and testing procedures**. CAB International, Wallingford, UK. 2003. 352 p.

VISWANATHAN, R.; SAMIYAPPAN, R. Antifungal activity of chitinases produced by some fluorescent pseudomonads against *Colletotrichum falcatum* Went causing red rot disease in sugarcane. **Microbiological Research**. India, n. 155, p. 309-314, 2001.

VOLPE, H. X. L. **Distribuição espacial do parasitismo de *Cotesia flavipes* (CAMERON, 1891) (Hymenoptera: Braconidae) em cana-de-açúcar**. 2009. 67 f. Dissertação (Mestrado em Entomologia Agrícola) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Campus de Jaboticabal, 2009.

WRIGHT, S. The genetical structure of populations. **Annals of eugenics**. v. 15, p. 323–354, 1949.

WRIGHT. S. Evolution and the genetics of populations. **Variability within and among natural populations**, Chicago, vol. 4, 1978.

ZHOU, Y., GU, H.N., DORN, S. Polymorphic microsatellite *loci* in the parasitic wasp *Cotesia glomerata* (Hymenoptera: Braconidae). **Molecular Ecology Notes**, Suíça, v. 5, p. 475–477, 2005.