

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

**ESTUDOS DE VARIABILIDADE GENÉTICA EM
POPULAÇÕES DE *Chrysoperla externa* HAGEN, 1861
(NEUROPTERA: CHRYSOPIDAE) DO ESTADO DE SÃO
PAULO, BRASIL**

Nara Cristina Chiarini Pena Barbosa

Bióloga

2013

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

**ESTUDOS DE VARIABILIDADE GENÉTICA EM
POPULAÇÕES DE *Chrysoperla externa* HAGEN, 1861
(NEUROPTERA: CHRYSOPIDAE) DO ESTADO DE SÃO
PAULO, BRASIL**

Nara Cristina Chiarini Pena Barbosa

Orientador: Prof. Dr. Sergio Antonio De Bortoli

Coorientadora: Profa. Dra. Adriana Coletto Morales

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

2013

Barbosa, Nara Cristina Chiarini Pena
B238e Estudos de variabilidade genética em populações de *Chrysoperla externa* Hagen, 1861 (Neuroptera: Chrysopidae) do estado de São Paulo, Brasil / Nara Cristina Chiarini Pena Barbosa. – – Jaboticabal, 2013
vi, 75 f. : il. ; 29 cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2013
Orientador: Sergio Antonio De Bortoli
Coorientadora: Adriana Coletto Morales
Banca examinadora: Odair Aparecido Fernandes, Vera Nisaka Solferini
Bibliografia

1. ISSR. 2. COI. 3. Crisopídeos. 4. Vegetação nativa. 5. Agroecossistema. 6. Controle biológico. I. Título. II. Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 595.74

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

DADOS CURRICULARES DA AUTORA

Nara Cristina Chiarini Pena Barbosa, nascida em Alfenas - MG em 29 de janeiro de 1988. Graduada em Ciências Biológicas (Bacharelado), ênfase em Ciências Ambientais, pela Universidade Federal de Alfenas (UNIFAL-MG), em 30 de janeiro de 2011. Foi voluntária/bolsista do Programa de Educação Tutorial (PET – Biologia) da mesma instituição, no período de janeiro de 2009 a dezembro de 2010. Durante a graduação, foi estagiária no Laboratório de Biologia Molecular Aplicada à Biodiversidade, sob orientação da Profa. Dra. Tereza Cristina Orlando. Em março de 2011, ingressou no curso de Mestrado 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 junho de 2013, sendo bolsista da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) no período de março de 2011 a fevereiro de 2013.

Tudo aquilo que o homem ignora não
existe para ele. Por isso o universo de cada
um, se resume ao tamanho de seu saber.

Albert Einstein

Dedico à minha família, por ser minha base e, de modo especial, ao Professor Sérgio de Freitas, que sempre se fará presente por meio de seus ensinamentos e enquanto houver alguém buscando responder “O que? Por quê? Para que?”... até mesmo para as coisas mais simples...

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Sérgio de Freitas, que de um modo todo particular, sempre me encorajou e me ensinou a enxergar a vida com os olhos de um “cientista”. Palavras nunca serão suficientes para descrever minha admiração e explicar sua falta, não apenas como orientador, mas também como amigo.

À Profa. Adriana Coletto Morales, por tornar possível a realização deste trabalho, me orientando, ensinando e me incentivando a buscar sempre o melhor.

Ao Prof. Sergio Antonio De Bortoli, por todo apoio e compreensão.

À Profa. Janete Aparecida Desidério e ao Prof. Manoel Victor Franco Lemos, por cederem o Laboratório de Genética de Bactérias e Biotecnologia Aplicada, para a realização das eletroforeses.

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 desse trabalho.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa e à Fundação de Amparo à Pesquisa de São Paulo (FAPESP) pelo auxílio financeiro em parte do projeto.

Agradeço ainda a Deus, por me dar serenidade e discernimento para escolher o melhor caminho sempre.

Aos meus pais, Honorato e Maria do Carmo, por todo o amor dispensado a mim e por nunca medirem esforços para que eu alcançasse meus objetivos.

Aos meus irmãos, José Henrique, Márcia Cristina e José Renato e minha cunhada Aline, por todo o apoio, conselhos e incentivo.

Aos meus avós (aqui ou não mais entre nós), pelos exemplos, orações e desejos de que eu vencesse mais essa etapa.

Aos colegas e amigos do Laboratório de Biossistemática, Biologia e Ecologia Molecular de Neurópteros: André Maurício Múscari, Francisco José Sosa Duque, Amália Torrezan Lopes, Éllen Carbognin, Patrícia Forli Schwartz Freire, Caleb Califre Martins, Mariah Valente Baggio e aos “agregados” Luciana Bedore e Antônio Rovere, pela amizade e por fazerem os momentos, não só no laboratório, tão agradáveis e inesquecíveis.

Aos eternos amigos: Josiane de Fátima Lourenço, Gabriela Meireles, Josiane Ferreira Pires, Denise Helena Moreira, Natalia Ingrid Oliveira da Silva, Marina Acero Angotti, Liliane Gonçalves Vila Nova, Luiz Carlos Barbosa, Vinícius Pereira Silva e Jader Augusto Costa Pereira, que mesmo à distância sempre permaneceram ao meu lado, me apoiando, aconselhando ou simplesmente torcendo por mim.

A todos os colegas do mestrado, em especial à Letícia Henrique de Azevedo, pela amizade e por todos os “desesperos” compartilhados e à Maria Flora de Almeida Tango, André Luís Martins e Fabiana Freitas por todas as conversas e companhia durante esses anos.

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	iii
ABSTRACT	iv
LISTA DE TABELAS	v
LISTA DE FIGURAS	vi
CAPÍTULO 1 - CONSIDERAÇÕES GERAIS	1
Introdução	1
Revisão de Literatura	2
Posição sistemática, distribuição geográfica e utilização de <i>Chrysoperla externa</i> no controle biológico	2
Variação genética e estrutura populacional	4
Fontes de variação	4
Fatores que alteram as frequências gênicas	5
Marcadores moleculares	7
Referências	8
CAPÍTULO 2 - VARIABILIDADE GENÉTICA COMPARADA EM POPULAÇÕES DE <i>Chrysoperla externa</i> (HAGEN, 1861) (NEUROPTERA: CHRYSOPIDAE)	19
Resumo	19
Introdução	19
Material e Métodos	21
Municípios amostrados	21
Extração do DNA total	22
ISSR-PCR	22
Escolha dos “primers” e amplificação	22
Análise dos dados	23
COI	24
Amplificação e sequenciamento	24
Análise dos dados	25
Resultados e Discussão	25
ISSR-PCR	25

	Página
COI	31
Referências	37
CAPÍTULO 3 - EVIDÊNCIA DE ESTRUTURA GENÉTICA EM POPULAÇÕES DE <i>Chrysoperla externa</i> (HAGEN, 1861) (NEUROPTERA: CHRYSOPIDAE)	43
Resumo	43
Introdução	43
Material e Métodos	45
Áreas amostradas e coleta	45
Criação em laboratório	45
Extração do DNA total	46
Escolha dos “primers” e amplificação	47
Análise dos dados	48
Resultados	49
Discussão	65
Referências	69
CAPÍTULO 4 – CONSIDERAÇÕES FINAIS	75

ESTUDOS DE VARIABILIDADE GENÉTICA EM POPULAÇÕES DE *Chrysoperla externa* HAGEN, 1861 (NEUROPTERA: CHRYSOPIDAE) DO ESTADO DE SÃO PAULO, BRASIL

RESUMO – A família Chrysopidae é considerada a maior da ordem Neuroptera, sendo constituída por predadores generalistas que se alimentam de diversas espécies consideradas pragas agrícolas. A espécie *Chrysoperla externa* encontra-se tanto em ambientes de vegetação nativa quanto em áreas de cultivo agrícola e possui várias características que a tornam um potencial agente de controle biológico. Entretanto, a capacidade de uma espécie se adaptar à ambientes exóticos, como agroecossistemas, está relacionada à sua variabilidade genética. Assim, os objetivos desse trabalho foram investigar e comparar a variabilidade genética de *C. externa* em populações estabelecidas no estado de São Paulo, em áreas de vegetação nativa e agroecossistemas, bem como analisar os efeitos da deriva genética e do gargalo populacional sobre essas populações. Foram utilizadas 13 populações coletadas em agroecossistemas, três em áreas nativas e uma linhagem mantida em laboratório sob forte endogamia. Para todas as populações, foram utilizados marcadores moleculares ISSR e para as populações coletadas em agroecossistemas, empregou-se também o gene mitocondrial COI. Altos níveis de variabilidade genética foram observados em todas as populações, o que configura uma característica da espécie. A correlação entre as distâncias genética e geográfica foi baixa, havendo grande compartilhamento de haplótipos entre todas as populações de agroecossistemas. Para essas populações, o gene mitocondrial COI indicou ausência de estrutura genética, enquanto para o marcador ISSR esta pôde ser observada, indicando que as populações estabelecidas em agroecossistema formavam uma única unidade populacional que vem se diferenciando. Quando todas as populações foram analisadas em conjunto, houve a discriminação em três grupos: nativo, agroecossistemas e laboratório, evidenciando a existência de estrutura genética. As populações nativas apresentaram um número de locus polimórficos superior às demais, entretanto os grupos não diferiram significativamente em relação aos índices de diversidade genética, o que indica isolamento recente entre as populações. Do mesmo modo, a geração parental apresentou maior polimorfismo quando comparada à F2, porém com índices de diversidade não significativos. Dessa forma, o maior polimorfismo associado às áreas de vegetação nativa sugere perda de alelos nos agroecossistemas, decorrente de gargalo populacional e efeito fundador, entretanto o rápido crescimento populacional nas áreas agrícolas pode ter contribuído para a manutenção da heterozigosidade nessas populações. Foi observado baixo fluxo gênico entre os ambientes nativos e a matriz. Assim, podemos concluir que a elevada variabilidade genética de *C. externa* pode contribuir para a sua utilização como agente de controle biológico e que a preservação de áreas nativas próximas aos agroecossistemas, bem como de corredores que liguem os remanescentes é de grande importância, a fim de impedir que os efeitos da deriva, sobre a variabilidade genética, afetem a adaptabilidade dos espécimes nas áreas agrícolas.

Palavras-chave:

Agroecossistema, COI, controle biológico, crisopídeos, ISSR, vegetação nativa

**STUDIES OF GENETIC VARIABILITY IN POPULATION OF *Chrysoperla externa*
HAGEN, 1861 (NEUROPTERA: CHRYSOPIDAE) OF THE STATE OF SÃO
PAULO, BRAZIL**

ABSTRACT – The family Chrysopidae comprises the highest number of species in the order Neuroptera, consists of generalist predators that feed on several agricultural pest species. The species *Chrysoperla externa* is found in native vegetation and agricultural crops and has several features that make it a potential biological control agent. However, the ability of a species to adapt to exotic environments, such as agroecosystems, is related to the genetic variability. The aims of this study were to investigate and compare the genetic variability of *C. externa* in established populations in the state of São Paulo, in areas of native vegetation and agroecosystems, as well as to analyze the effects of genetic drift and bottleneck on these populations. We used 13 populations collected in agroecosystems, three in native areas and one lineage maintained in the laboratory under strong inbreeding. ISSR molecular markers were used for all populations, but for the populations collected in agroecosystems we used also the mitochondrial COI gene. High levels of genetic variability were observed in all populations, which is one characteristic of the specie. The correlation between genetic and geographic distances was low and a large number of haplotypes was shared among all populations of agroecosystems. For populations of agroecosystems, the mitochondrial COI gene showed no genetic structure, whereas the ISSR marker demonstrated genetic structure, indicating that the established populations in agroecosystems formed a single population unit, which has been under differentiation. When all populations were analyzed together, there was discrimination in three groups: native, agroecosystems and laboratory, showing the existence of genetic structure. The native populations showed a number of polymorphic loci superior to others, but the groups did not differ significantly with respect to the indices of genetic diversity, which indicates recent isolation between populations. Similarly, the parent generation has higher polymorphism compared to F2, but with no significant diversity index. Thus, the higher polymorphism associated with native vegetation suggests loss of alleles in agroecosystems due to bottleneck and founder effect, however the rapid population growth in the agricultural areas may have contributed to the maintenance of heterozygosity in these populations. Was observed low gene flow between native environments and matrix. Thus, we conclude that the high genetic variability of *C. externa* can contribute to its use as a biological control agent. Also, the preservation of natural areas close to agroecosystems and corridors linking remnant forest is of great importance to prevent the effects of drift on genetic variability and affect the adaptability of specimens in agricultural areas.

Keywords:

Agroecosystem, COI, biological control, green lacewings, ISSR, native vegetation

LISTA DE TABELAS

Página

CAPÍTULO 2

Tabela 1. Municípios amostrados, coordenadas geográficas, número de espécimes analisados e número de identificação, tipo de cultura nos pontos e data de coleta.	21
Tabela 2. Temperatura de anelamento específica por “primer” ISSR e sequência de nucleotídeos	23
Tabela 3. Índices de diversidade genética dentro das populações de <i>C. externa</i> ..	27
Tabela 4. Área e tipo de vegetação natural encontrada nos municípios amostrados	28
Tabela 5. Análise da variância molecular para as populações de <i>C. externa</i> para os diferentes “primers” ISSR	29
Tabela 6. Distância genética entre as populações de <i>C. externa</i> baseada nos marcadores ISSR e distância geográfica entre os municípios	30
Tabela 7. Lista de haplótipos do mtDNA (COI) de <i>C. externa</i>	31
Tabela 8. Medidas de variabilidade das populações de <i>C. externa</i>	32
Tabela 9. Distância genética entre as populações de <i>C. externa</i> baseada no mtDNA COI e distância geográfica entre os municípios	34

CAPÍTULO 3

Tabela 1. Municípios amostrados, coordenadas geográficas, tipo de vegetação nos pontos amostrados, data de coleta, número de indivíduos analisados e número de identificação	48
Tabela 2. Temperatura de anelamento específica por “primer” ISSR e sequência de nucleotídeos	48
Tabela 3. Índices de diversidade nas populações de <i>C. externa</i>	51
Tabela 4. Análise da variância molecular para as populações de <i>C. externa</i> e índices de fixação	52
Tabela 5. Distância genética entre as populações de <i>C. externa</i> e distância geográfica entre os municípios	53
Tabela 6. Análise de Clados Aninhados	54
Tabela 7. Testes de neutralidade para as populações de <i>C. externa</i>	65

LISTA DE FIGURAS

	Página
CAPÍTULO 2	
Figura 1. Mapa dos municípios amostrados no estado de São Paulo	22
Figura 2. Exemplo de bandas de ISSR em gel de agarose 2%	26
Figura 3. “Mismatch Distribution” para as populações de <i>C. externa</i>	33
Figura 4. Rede haplotípica aninhada, para sequências de COI de <i>C. externa</i>	35
CAPÍTULO 3	
Figura 1. Mapa dos municípios amostrados no estado de São Paulo	46
Figura 2. Exemplo de bandas de ISSR em gel de agarose 2%	50
Figura 3. Rede baseada nos padrões de bandejamento obtidos pelo “primer” UBC 809	57
Figura 4. Rede baseada nos padrões de bandejamento obtidos pelo “primer” UBC 849	58
Figura 5. Rede baseada nos padrões de bandejamento obtidos pelo “primer” UBC 856	59
Figura 6. Rede baseada nos padrões de bandejamento obtidos pelo “primer” UBC 836	60
Figura 7. Rede baseada nos padrões de bandejamento obtidos pelo “primer” UBC 820	61
Figura 8. Rede baseada nos padrões de bandejamento obtidos pelo “primer” UBC 891	62
Figura 9. Rede baseada nos padrões de bandejamento obtidos pelo “primer” UBC 880	63
Figura 10. Rede baseada nos padrões de bandejamento obtidos pelo “primer” UBC 889	64

CAPÍTULO 1 - Considerações gerais

Introdução

A família Chrysopidae é composta por insetos pertencentes à ordem Neuroptera e possui mais de 1.200 espécies descritas (FREITAS; PENNY, 2001). Crisopídeos são holometábolos e apresentam hábito alimentar distintos, sendo as larvas predadoras generalistas e os adultos predadores ou consumidores de pólen e néctar. Estão associados a várias culturas, alimentando-se de pulgões, cochonilhas, mosca-branca, além de ovos e lagartas de diversos lepidópteros (FREITAS, 2001).

Dentre os crisopídeos, *Chrysoperla externa* (Hagen, 1861) é considerada uma das espécies mais comum das Américas (BROOKS, 1994), possui alta capacidade de predação e reprodução e é multiplicada com sucesso em laboratório (FREITAS, 2001), fazendo desta, um potencial agente de controle biológico (ALBUQUERQUE; TAUBER; TAUBER, 1994). Entretanto, é essencial que os indivíduos criados em laboratório sobrevivam e sejam eficientes no controle de pragas, uma vez que em áreas agrícolas os espécimes são expostos às condições distintas ou adversas do novo ambiente. Desse modo, a fim de evitar danos ambientais e econômicos, os estudos genéticos populacionais se tornam extremamente importantes, uma vez que a capacidade de suportar as pressões ambientais está diretamente associada com a variabilidade genética da espécie (BAKER; LOXDALE; EDWARDS, 2003; HUFBAUER; RODERICK, 2005).

A perda de variabilidade é um dos problemas associados à introdução de espécimes em ambientes exóticos e à manutenção em condições estáveis em laboratório (MACKAUER, 1976). As variações genéticas observadas nas espécies são geradas por meio de mutações ou por recombinação, enquanto processos como deriva genética, seleção e fluxo gênico podem alterar a frequência dos alelos nas populações, levando à diferenciação entre elas. Assim, informações históricas valiosas sobre o comportamento genético das populações frente à redução e isolamento de áreas nativas, podem ser obtidas em estudos genéticos.

Diferentes métodos podem ser utilizados para se realizar estudos genéticos populacionais, entre eles a análise do DNA nuclear ou mitocondrial. A técnica PCR-

ISSR é um dos métodos que tem sido amplamente utilizada em estudos de variabilidade genética e estrutura populacional de insetos (BORBA et al., 2005; ROUEX et al., 2007; SOUZA et al., 2008; KEHLMAIER; ASSMANN, 2010; TAYLOR; DOWNIE; PATERSON, 2011). Os marcadores moleculares ISSR ('Inter Simple Sequence Repeat') são formados essencialmente por sequências de DNA não codificante, entre as regiões microssatélites, de modo que é gerado um grande número de bandas potencialmente polimórficas (REDDY; SARLA; SIDDIQ, 2002).

Do mesmo modo, a região da Citocromo Oxidase, subunidade I (COI), tem sido utilizada em estudos de variabilidade genética, estrutura populacional, filogenia e identificação de insetos (SMITH-CALDAS et al., 2001; WINTERTON; FREITAS, 2006; ASOKAN et al., 2007; VELONA et al., 2011). O DNA mitocondrial apresenta algumas particularidades que favorecem sua utilização, entre elas, o fato de estar presente em grande quantidade nas células e de ser purificado e amplificado mais facilmente que o DNA nuclear (LOXDALE; LUSHAI, 1998).

Assim, os objetivos desse trabalho foram investigar e comparar a variabilidade genética de populações de *C. externa* estabelecidas no estado de São Paulo, por meio de marcadores moleculares ISSR e do gene mitocondrial COI, bem como analisar os efeitos da deriva genética e do gargalo populacional sobre essas populações.

Revisão de Literatura

Posição sistemática, distribuição geográfica e utilização de *Chrysoperla externa* no controle biológico

A família Chrysopidae é considerada a maior da ordem Neuroptera, compreendendo mais de 1.200 espécies distribuídas em cerca de 80 gêneros e subgêneros (FREITAS, 2002). Esta família se divide nas subfamílias Apochrysinae, Chrysopinae e Nothochrysinae, sendo que Chrysopinae apresenta o maior número de espécies, as quais estão distribuídas em quatro tribos: Ankylopterigini, Belonopterigini, Chrysopini e Leucochrysini. A tribo Chrysopini possui trinta gêneros e sete subgêneros (BROOKS; BARNARD, 1990), entre eles o gênero *Chrysoperla*

Steinmann, 1964. Este é um dos gêneros mais estudados e apresenta 36 espécies descritas, das quais apenas quatro ocorrem no Brasil: *Chrysoperla defreitasi* Brooks, 1994, *Chrysoperla externa* (Hagen, 1861), *Chrysoperla genanigra* Freitas, 2003 e *Chrysoperla raimundoi* Freitas e Penny, 2001.

Os crisopídeos possuem ampla distribuição geográfica, não tendo sido registrados apenas na Antártica (BROOKS; BARNARD, 1990). A espécie *C. externa* é considerada uma das mais comuns das Américas, já tendo sido observada desde o sul dos EUA até a Argentina (BROOKS, 1994). No Brasil essa espécie ocorre em todas as regiões, sendo observada tanto em agroecossistemas como em ambientes naturais. Adams e Penny (1985) registraram sua presença nos estados do Amazonas, Rio de Janeiro, Rondônia, Roraima, Santa Catarina e Rio Grande do Sul. Foi ainda encontrada nos estados do Paraná (CARDOSO et al., 2003; QUEIROZ et al., 2009; CARNEIRO et al., 2010), Goiás (SILVA et al., 1995), Mato Grosso (SCOMPARIN, 1997), Bahia (RIBEIRO et al., 2009), Paraíba (SILVA et al., 2007), Pernambuco (BARBOSA et al., 2005), Rio Grande do Norte (BEZERRA et al., 2010), Minas Gerais (ADAMS; PENNY, 1985; KUMAGAI, 2002; SILVA et al., 2006; SOUZA; COSTA; LOUZADA, 2008; COSTA; SOUZA; FREITAS, 2010), São Paulo (ADAMS; PENNY, 1985; BELORTE; RAMIRO; FARIA, 2004; RAMIRO; FARIA, 2006; QUEIROZ et al., 2009) e no Distrito Federal (MEDEIROS, 2009).

A espécie *C. externa* é considerada um potencial agente de controle biológico em programas de manejo em toda América Central e do Sul (ALBUQUERQUE; TAUBER; TAUBER, 1994), devido à sua alta capacidade de predação e potencial reprodutivo e sua ampla distribuição geográfica, bem como pelo fato de ser facilmente multiplicada em laboratório, demandando poucos esforços, uma vez que os adultos não necessitam de presas (FREITAS, 2001). Além disso, não são afetados por alguns inseticidas, de modo que podem ser utilizados em sistemas de Manejo Integrado de Pragas (MIP) (GODOY et al., 2004; MOURA et al., 2009; CASTILHOS et al., 2011).

Os adultos se alimentam de pólen, néctar e “honeydew”, enquanto as larvas são predadoras generalistas e se alimentam de diversos insetos considerados pragas agrícolas (FREITAS, 2001). Em condições de laboratório, pôde-se observar o elevado consumo de *Bemisia tabaci* (Gennadius, 1889) (ADRIANO et al., 2010),

Schizaphis graminum (Rondani, 1852) (FIGUEIRA; LARA; CRUZ, 2002), *Hyadaphis foeniculi* (Passerini, 1860) (LIRA; BATISTA, 2006), larvas de *Alabama argillacea* (Hübner, 1822) (SILVA; CARVALHO; SOUZA, 2002), *Leucoptera coffeella* (Guérin-Mènéville e Perrottet, 1842) (ECOLE et al., 2002) e *Phyllocnistis citrella* Stainton, 1856 (RIBEIRO et al., 2007), *Parlatoria cinerea* Doane e Hadden, 1909 (GRAVENA; YAMAMOTO; FERNANDES, 1993), *Planococcus citri* (Risso, 1813) (BEZERRA et al., 2006), entre outras. Estudos em casa de vegetação têm sido realizados a fim de verificar a eficiência de predação de *C. externa* em cultivos protegidos. Nestas condições, Auad et al. (2007) observaram a redução de 40% a 50% de ninfas de *Bemisia tabaci* biótipo B em tomateiro. Do mesmo modo, Costa (2011) observou que a liberação, seja de ovos ou larvas de *C. externa*, é eficiente no controle de *Aphis gossypii* Glover, 1877 em cultivo protegido de pepino, sendo relatada a redução de 100% das ninfas em até 72 horas, quando na proporção predador/presa de 1:4. Em campo, encontram-se associados a diversas culturas, como algodão (SILVA et al., 1995; BARROS et al., 2006; RAMIRO; FARIA, 2006; SILVA et al., 2007), café (RIBEIRO, 2005; SILVA et al., 2006), citros (SOUZA; CARVALHO, 2002), manga (BARBOSA et al., 2005; RIBEIRO et al., 2009) e soja (BELORTE; RAMIRO; FARIA, 2004; CARNEIRO et al., 2010), onde muitas vezes é considerado o predador mais abundante.

Variação genética e estrutura populacional

Fontes de variação

Dentro de uma mesma espécie, os indivíduos podem apresentar sequências variantes de DNA, denominadas haplótipos, e os polimorfismos genéticos podem ser gerados por meio de mutações ou por recombinação. Mutações são definidas como alterações no material genético e podem afetar apenas a sequência ou também a organização, regulação ou função de um gene (HOY, 2003). As sequências são alteradas por inserções e deleções de nucleotídeos, inversão de segmentos de DNA ou por mutações pontuais, ou seja, pela substituição de um nucleotídeo. Esta substituição é dita uma transição quando ocorre entre bases nitrogenadas da

mesma classe (purina por purina ou pirimidina por pirimidina) e uma transversão quando a substituição se dá entre bases de classes diferentes (purina por pirimidina e vice-versa), sendo as transições mais frequentes (KIMURA, 1980). Quando ocorrem em regiões intergênicas, as mutações geralmente são silenciosas, pois não afetam a sequência de aminoácidos; entretanto, em regiões gênicas também pode haver mutações silenciosas devido à degeneração do código genético. As mutações podem ocorrer por erros na replicação do DNA ou ser induzidas por agentes químicos ou físicos e podem ocorrer espontaneamente em cada divisão celular, na proporção de uma vez a cada 10^8 pares de base (HOY, 2003).

As variações no material genético de uma espécie também são geradas por recombinação, a qual pode ocorrer na reprodução sexuada e na formação de gametas. Por meio da reprodução sexuada é possível unir gametas com conteúdo genético diferentes, resultando na formação de uma prole geneticamente distinta dos parentais. Já na formação dos gametas dois processos podem atuar no aumento da variabilidade, a segregação independente dos cromossomos não homólogos e a recombinação dos cromossomos homólogos. Dessa forma, os cromossomos são separados aleatoriamente durante a meiose, podendo formar gametas constituídos tanto de cromossomos herdados do pai quanto da mãe, bem como de cromossomos que possuam segmentos de ambos, devido ao “crossing-over”, processo no qual os cromossomos homólogos, pareados durante a meiose, podem trocar segmentos, gerando novas combinações (JANSSEENS, 1909).

Em insetos, existem ainda vários tipos de elementos transponíveis (TE), segmentos de DNA que podem se mover de uma região à outra no cromossomo, muitas vezes carregando consigo genes próximos. Frequentemente estão presentes em múltiplas cópias e correspondem à grande parte do DNA repetitivo dos insetos, podendo alterar as sequências de DNA de diferentes formas (FUTUYMA, 2005; PALOMEQUE; LORITE, 2008).

Fatores que alteram as frequências gênicas

Para que ocorra diferenciação genética entre as populações, é necessário que haja variação entre os indivíduos, entretanto não é preciso que ocorram novas

mutações ou recombinações, de modo que alguns processos, como a deriva genética, a seleção e o fluxo gênico, podem levar a diferenciação genética, pois alteram a frequência dos alelos nas populações (RIDLEY, 2006).

A deriva genética aleatória corresponde à flutuação, ao acaso, na frequência de alelos ou haplótipos (WRIGHT, 1929). Assim, a variação dentro das populações é reduzida e as diferenças entre elas podem aumentar, quando alelos são fixados ou perdidos (KING; JUKES, 1969). Diferentemente da seleção, a deriva genética não é adaptativa, de modo que alelos que não representam incremento adaptativo podem ser fixados, enquanto alelos com maior valor adaptativo são perdidos (WRIGTH, 1982).

Os efeitos da deriva genética são mais intensos sobre populações pequenas, especialmente quando a população sofre uma redução abrupta em seu tamanho efetivo, conhecido com gargalo populacional (WRIGHT, 1929; KOMAI; EMURA, 1955). Quando uma nova população é formada a partir de poucos indivíduos, a deriva genética é descrita como efeito fundador (MAYR, 1963), resultando em redução da variabilidade em locus neutros (NEI; MARUYAMA; CHAKRABORTY, 1975).

A seleção natural, por sua vez, pode ser definida como qualquer diferença consistente no “fitness” entre espécimes fenotipicamente distintos, de modo que alelos que confirmam maior sucesso na sobrevivência e reprodução têm suas frequências aumentadas gradualmente a cada geração, tornando a população mais apta a sobreviver e se reproduzir no ambiente (FISHER, 1999). A seleção natural pode favorecer tanto os fenótipos intermediários, ou seja, os heterozigotos, quanto os fenótipos extremos, homozigotos, levando à fixação de alelos e consequentemente à perda da variabilidade (RUEFFLER et al., 2006).

Por outro lado, o fluxo gênico é considerado uma força homogeneizadora, pois consiste na troca de alelos entre as populações, mantendo semelhantes tanto a composição genética quanto a frequência alélica (MAYR, 1970; SLATKIN, 1987). Quando não há fluxo gênico ou este é limitado, as populações tendem a se diferenciar devido aos eventos de mutação, deriva genética e/ou seleção, sendo o agrupamento de populações diferenciadas conhecido como estrutura populacional (SLATKIN, 1987). O baixo fluxo gênico entre as populações pode estar associado à

falta de conectividade entre elas. Características da paisagem podem favorecer ou dificultar o movimento de insetos, de modo que, em ambientes fragmentados, o tipo e a qualidade da matriz influenciam na taxa de migração e fluxo gênico (HUNTER, 2002).

Marcadores moleculares

Estudos genéticos populacionais podem ser realizados por diferentes métodos, com análises de proteínas, RNA ou DNA, seja nuclear ou mitocondrial. Análises diretas do DNA são mais sensíveis às variações genéticas e fornecem informações sobre estrutura genética, efeito fundador, fluxo gênico, gargalo populacional e endogamia (RODERICK, 1996; BOHONAK, 1999; HOY, 2003).

Entre os marcadores que permitem a análise do DNA nuclear estão os marcadores moleculares ISSR ("Inter Simple Sequence Repeat"). O DNA de insetos apresenta uma elevada quantidade de sequências repetitivas, entre elas as regiões microssatélites ou SSRs ("Simple Sequence Repeat"), que são segmentos de DNA ricos em sequências A+T ou G+C que se repetem em tandem (LOXDALE; LUSHAI, 1998). A técnica PCR-ISSR baseia-se na amplificação de sequências de DNA não codificante, entre as regiões microssatélites, onde as mutações são conservadas. As repetições microssatélites com di-, tri-, tetra- ou penta-nucleotídeos são utilizadas como "primers", sendo amplificada a região entre dois microssatélites idênticos e com orientação oposta nas fitas de DNA molde (REDDY; SARLA; SIDDIQ, 2002). Um grande número de bandas potencialmente polimórficas é gerado e por serem consideradas dominantes, ou seja, amplificadas mesmo com apenas uma cópia alélica, alguns erros podem ser cometidos na interpretação (ROUX et al., 2007). Por exemplo, sua ausência pode significar uma ou mais divergências com o "primer" ou ainda um rearranjo no cromossomo enquanto a presença de bandas de mesmo tamanho podem não corresponder a bandas similares, sendo a variabilidade subestimada. Entretanto, esta técnica apresenta a vantagem de não ser necessário um conhecimento prévio a respeito das sequências, além de ser um método simples e com alta reprodutibilidade (WOLFE; LISTON, 1998). Tem sido amplamente utilizada em estudos de variabilidade genética e estrutura populacional para

diferentes ordens de insetos (REDDY; NAGARAJU; ABRAHAM, 1999; LUQUE et al., 2002; BORBA et al., 2005; HUNDSDOERFER; KITCHINGB; WINK, 2005; HUNDSDOERFER; WINK, 2005, ROUEX et al., 2007; SOUZA et al., 2008; KEHLMAIER; ASSMANN, 2010; HELMI; KHAFAGA; EL-FATIH, 2011; TAYLOR; DOWNIE; PATERSON 2011).

O DNA mitocondrial (mtDNA) também representa uma importante fonte para estudos populacionais, devido às suas características particulares, como a herança materna e a ausência de recombinação, além da grande quantidade presente nas células (LOXDALE; LUSHAI, 1998). É formado por uma molécula circular e pequena, que codifica menos de 40 genes. Destes, cerca de metade codificam RNA ribossomal e transportador, destinados a síntese de proteínas da própria mitocôndria e os demais codificam proteínas utilizadas no transporte de elétrons ou na fosforilação oxidativa (GRAZIEWICZ; LONGLEY; COPELAND, 2006).

Dentre o complexo de genes que codificam essas proteínas transmembrana, destaca-se a região da Citocromo Oxidase, subunidade I (COI). Essa é uma das regiões que acumulam as mutações mais rapidamente, devido à presença reduzida de mecanismos de reparo (GRAZIEWICZ; LONGLEY; COPELAND, 2006). Além disso, a região do gene COI apresenta a vantagem desta ser obtida por meio de iniciadores universais conservados (SMITH-CALDAS et al., 2001). É amplamente utilizada em estudos de variabilidade genética, estrutura populacional, filogenia, filogeografia e identificação de diversas espécies de insetos, sendo algumas pesquisas realizadas com neurópteros (CLARK; MEINKE; FOSTER, 2001; SMITH-CALDAS et al., 2001; FINN et al., 2006; WINTERTON; FREITAS, 2006; ASOKAN et al., 2007; VANDERGAST et al., 2007; STÅHLS; SAVOLAINEN, 2008; BOEHME et al., 2010; MORALES; FREITAS, 2010; WILSON et al., 2010; VELONÀ et al., 2011; NIE et al., 2012; HENRY et al., 2012; MORALES; LAVAGNINI; FREITAS, 2013; SOLE et al., 2013).

Referências

ADAMS, P. A.; PENNY, N. D. Neuroptera of the Amazon Basin. Part 11a. Introduction and Chrysopini. **Acta Amazonica**, Manaus, v. 15, n. 3-4, p. 413-479, 1985.

ADRIANO, E.; TOSCANO, L. C.; SCHLICK, E. C.; MARUYAMA, W. I.; SANTOS, F. L. Desenvolvimento e capacidade de consumo de *Chrysoperla externa* (Hagen, 1861) alimentada com ninfas de mosca-branca criadas em hortaliças. **Revista Caatinga**, Mossoró, v. 23, n. 3, p. 1-6, 2010.

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

ASOKAN, R.; KRISHNA KUMAR, N. K.; KUMAR, V.; RANGANATH, H. R. Molecular differences in the mitochondrial cytochrome oxidase I (mtCOI) gene and development of a species-specific marker for onion thrips, *Thrips tabaci* Lindeman, and melon thrips, *T. palmi* Karny (Thysanoptera: Thripidae), vectors of tospoviruses (Bunyaviridae). **Bulletin of Entomological Research**, Farnham Royal, v. 97, n. 5, p. 461-470, 2007.

AUAD, A. M.; CARVALHO, C. F.; SOUZA, B.; SIMÕES, A. D.; OLIVEIRA, S. A.; BRAGA, A. L. F.; FERREIRA, R. B. Potencial de *Chrysoperla externa* (Hagen) no controle de *Bemisia tabaci* (Gennadius) biótipo B em tomateiro. **Acta Scientiarum: agronomy**, Maringá, v. 29, n. 1, p. 29-32, 2007.

BAKER, D. A.; LOXDALE, H. D.; EDWARDS, O. R. Genetic variation and founder in the parasitoid wasp, *Diaeretiella rapae* (M'intosh) (Hymenoptera: Braconidae: Aphidiidae), affecting its potential as a biological control agent. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 12, n. 12, p. 3303-3311, 2003.

BARBOSA, F. R.; GONÇALVES, M. E. C.; MOREIRA, W. A.; ALENCAR, J. A. de; SOUZA, E. A. de; SILVA, C. S. B. da; SOUZA, A. M.; MIRANDA, I. G. Artrópodes - praga e predadores (Arthropoda) associados à cultura da mangueira no Vale do São Francisco, Nordeste do Brasil. **Neotropical Entomology**, Londrina, v. 34, n. 3, p. 471-474, 2005.

BARROS, R.; DEGRANDE, P. E.; RIBEIRO, J. F.; RODRIGUES, A. L. L.; NOGUEIRA, R. F.; FERNANDES, M. G. Flutuação populacional de insetos predadores associados a pragas do algodoeiro. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 73, n. 1, p. 57-64, 2006.

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

BEZERRA, C. E. S.; TAVARES, P. K. A.; MACEDO, L. P. M.; FREITAS, S.; ARAUJO, E. L. Green lacewings (Neuroptera: Chrysopidae) associated with melon crop in Mossoró, Rio Grande do Norte State, Brazil. **Neotropical Entomology**, Londrina, v. 39, n. 3, p. 454-455, 2010.

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

BOEHME, P.; AMENDT, J.; DISNEY, R. H. L.; ZEHNER, R. Molecular identification of carrion-breeding scuttle flies (Diptera: Phoridae) using COI barcodes. **International Journal of Legal Medicine**, Bonn, v. 124, n. 6, p. 577-581, 2010.

BOHONAK, A. J. Dispersal, gene flow, and population structure. **The Quarterly Review of Biology**, New York, v. 74, n. 1, p. 21-45, 1999.

BORBA, R. S.; GARCIA, M. S.; KOVALESKI, A.; OLIVEIRA, A. C.; ZIMMER, P. D.; CASTELO BRANCO, J. S.; MALONE, G. Dissimilaridade genética de linhagens de *Trichogramma* Westwood (Hymenoptera: Trichogrammatidae) através de marcadores moleculares ISSR. **Neotropical Entomology**, Londrina, v. 34, n. 4, p. 565-569, 2005.

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

BROOKS, S. J.; BARNARD, P. C. The green lacewings of the world: a generic review (Neuroptera: Chrysopidae). **Bulletin of the British Museum Natural History (Entomology)**, London, v. 59, n. 2, p. 117-286, 1990.

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

CARNEIRO, E.; CUZZI, C.; LINK, S.; VILANI, A.; SARTORI, C.; ONOFRE, S. B. Entomofauna associada a cultura da soja (*Glycine max* (L.) Merrill) (Fabaceae) conduzida em sistema orgânico. **Revista em Agronegócios e Meio Ambiente**, Maringá, v. 3, n. 3, p. 271-289, 2010.

CASTILHOS, R. V.; GRÜTZMACHER, A. D.; NAVA, D. E.; ZOTTI, M. J.; SIQUEIRA, P. R. B.. Seletividade de agrotóxicos utilizados em pomares de pêssego a adultos do predador *Chrysoperla externa* (Hagen, 1861) (Neuroptera: Chrysopidae). **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 33, n.1, p. 73-80, 2011.

CLARK, T. L.; MEINKE, L. J.; FOSTER, J. E. PCR-RFLP of the mitochondrial cytochrome oxidase (subunit I) gene provides diagnostic markers for selected *Diabrotica* species (Coleoptera: Chrysomelidae). **Bulletin of Entomological Research**, Farnham Royal, v. 91, n. 6, p. 419-427, 2001.

COSTA, M. B. **Uso de *Chrysoperla externa* (Hagen, 1861) no controle de *Aphis gossypii* Glover, 1877 em *Cucumis sativus* L. em ambiente protegido.** 2011. 61 p. Dissertação (Mestrado em Agronomia - Entomologia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2011.

COSTA, R. I. F.; SOUZA, B.; FREITAS, S. Dinâmica espaço-temporal de taxocenoses de crisopídeos (Neuroptera: Chrysopidae) em ecossistemas naturais. **Neotropical Entomology**, Londrina, v. 39, n. 4, p. 470-475, 2010.

DOANE, R. W.; HADDEN, E. Coccidae from the Society Island. **Canadian Entomologist**, Ottawa, v. 41, p. 296-300, 1909.

ECOLE, C. C.; SILVA, R. A.; LOUZADA, J. N. C.; MORAIS, J. C.; BARBOSA, L. R.; AMBROGI, B. G. Predação de ovos, larvas e pupas do bicho-mineiro-do-cafeeiro, *Leucoptera coffeella* (Guérin-Menèville & Perrottet, 1842) (Lepidoptera: Lyonetiidae) por *Chrysoperla externa* (Hagen, 1861) (Neuroptera: Chrysopidae). **Ciências e Agrotecnologia**, Lavras, v. 26, n. 2, p. 318–324, 2002.

FIGUEIRA, L. K.; LARA, F. M.; CRUZ, I. Efeito de genótipos de sorgo sobre o predador *Chrysoperla externa* (Hagen) (Neuroptera: Chrysopidae) alimentado com *Schizaphis graminum* (Rondani) (Hemiptera: Aphididae). **Neotropical Entomology**, Londrina, v. 31, n. 1, p. 133-139, 2002.

FINN, D. S.; THEOBALD, D. M.; BLACK, W. C. IV; POFF, N. L. Spatial population genetic structure and limited dispersal in a Rocky Mountain alpine stream insect. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 15, n. 12, p. 3553–3566, 2006.

FISHER, R. A. **The genetical theory of natural selection:** a complete variorum edition. New York: Oxford University Press Inc., 1999. 356 p.

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

FREITAS, S. O uso de crisopídeos no controle biológico de pragas. In: PARRA, J. R. P.; BOTELHO, P. S. M.; CORRÊA-FERREIRA, B. S.; BENTO, J. M. S. **Controle biológico no Brasil:** parasitóides e predadores. Barueri: Editora Manole, 2002. cap. 13, p. 209-224.

FREITAS, S. *Chrysoperla* Steinmann, 1964 (Neuroptera, Chrysopidae): descrição de uma nova espécie do Brasil. **Revista Brasileira de Entomologia**, São Paulo, v. 47, n. 3, p. 385-387, 2003.

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

FUTUYMA, D. J. The origin of genetic variation. In: _____. **Evolution.** Sunderland: Sinauer Associates, 2005. cap. 8, p. 161-188.

GENNADIUS, P. Disease of the tobacco plantations in the Trikonía: the aleurodid of tobacco. **Ellenike Georgia**, Hobart, v. 5, p. 1-3, 1889.

GLOVER, T. Report of the entomologist and curator of the museum. **Report of the commissioner of agriculture of the operations of the department of the year 1876**. Washington, p. 17-46, 1877.

GODOY, M. S.; CARVALHO, G. A.; MORAES, J. C.; COSME, L. V.; GOUSSAIN, M. M.; CARVALHO, C. F.; MORAIS, A. A. Seletividade de seis inseticidas utilizados em citros a pupas e adultos de *Chrysoperla externa* (Hagen) (Neuroptera: Chrysopidae). **Neotropical Entomology**, Londrina, v. 33, n. 3, p. 359-364, 2004.

GRAVENA, S.; YAMAMOTO, P. T.; FERNANDES, O. D. Biologia de *Parlatoria cinerea* (Hemiptera: Diaspididae) e predação por *Chrysoperla externa* (Neuroptera: Chrysopidae). **Científica**, São Paulo, v. 21, n. 1, p. 149-156, 1993.

GRAZIEWICZ, M. A.; LONGLEY, M. J.; COPELAND, W. C. DNA polymerase α in mitochondrial DNA replication and repair. **Chemical Reviews**, Washington, v. 106, n. 2, p. 383-405, 2006.

GUÉRIN-MÉNÉVILLE, F. E.; PERROTTET, S. **Memoire sur un insecte et un champignon qui ravagent les cafiers aux antilles**. Paris: Ministère de la Marine, 1842. 40 p.

HAGEN, H. Synopsis of the Neuroptera of North America, with a list of the South American species. **Smithsonian Miscellaneous Collections**, Washington, v. 4, n. 1, p. 1-347, 1861.

HELMI, A.; KHAFAGA, A. F.; EL-FATIH, M. M. Molecular fingerprinting of certain cereal aphids in Egypt (Hemiptera: Sternorrhyncha: Aphididae) using RAPD and ISSR markers. **Journal of Entomology**, New York, v. 8, n. 4, p. 327-340, 2011.

HENRY, C. S.; BROOKS, S. J.; DUELLI, P.; JOHNSON, J. B.; WELLS, M. M.; MOCHIZUKI, A. Parallel evolution in courtship songs of North American and European green lacewings (Neuroptera: Chrysopidae). **Biological Journal of the Linnean Society**, London, v. 105, n. 4, p. 776-796, 2012.

HOY, M. A. DNA, gene structure, and DNA replication. In: _____. **Insect molecular genetics: an introduction to principles and applications**. San Diego: Academic Press, 2003. cap. 1, p. 3-27.

HÜBNER, J. Supplemento the collection of exotic Lepidoptera. **Zutr.**, Hund, s. 32, p. 399-400, 1822.

HUFBAUER, R. A.; RODERICK, G. K. Microevolution in biological control: mechanisms, patterns and processes. **Biological Control**, Orlando, v. 35, n. 3, p. 227-239, 2005.

HUNDSDOERFER, A. K.; KITCHINGB, I. J.; WINK, M. The phylogeny of the *Hyles euphorbiae* complex (Lepidoptera: Sphingidae): molecular evidence from sequence data and ISSR-PCR fingerprints. **Organisms, Diversity & Evolution**, Jena, v. 5, n. 3, p. 173-198, 2005.

HUNDSDOERFER, A. K.; WINK, M. New source of genetic polymorphisms in Lepidoptera? **Zeitschrift für Naturforschung C: A Journal of Biosciences**, Tübingen, v. 60, n. 7/8, p. 618-624, 2005.

HUNTER, M. D. Landscape structure, habitat fragmentation, and the ecology of insects. **Agricultural and Forest Entomology**, Saint Albans, v. 4, n. 3, p. 159-166, 2002.

JANSSENS, F. A. La théorie de la chiasmotypie: nouvelle interprétation des cinisés de maturation. **Cellule**, Louvain, v. 22, p. 387-411, 1909.

KEHLMAYER, C.; ASSMANN, T. Molecular analysis meets morphology-based systematics - a synthetic approach for Chalarinae (Insecta: Diptera: Pipunculidae). **Systematic Entomology**, Oxford, v. 35, n. 1, p. 181-195, 2010.

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

KING, J. L.; JUKES, T. H. Non-darwinian evolution. **Science**, Washington, v. 164, n. 3881, p. 788-798, 1969.

KOMAI, T.; EMURA, S. A study of population genetics on the polymorphic land snail *Bradybaena similaris*. **Evolution**, Lancaster, v. 9, n. 4, p. 400-418, 1955.

KUMAGAI, A. F. Os Ichneumonidae (Hymenoptera) da Estação Ecológica da Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, com ênfase nas espécies de Pimplinae. **Revista Brasileira de Entomologia**, São Paulo, v. 46, n. 2, p. 189-194, 2002.

LIRA, R. S.; BATISTA, J. L. Aspectos biológicos de *Chrysoperla externa* alimentados com pulgões da erva-doce. **Revista de Biologia e Ciências da Terra**, Campina Grande, v. 6, n. 2, p. 20-35, 2006.

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

LUQUE, C.; LEGAL, L.; STAUDTER, H.; GERS, C.; WINK, M. ISSR (Inter Simple Sequence Repeats) as genetic markers in Noctuids (Lepidoptera). **Hereditas**, Lund, v. 136, n. 3, p. 251-253, 2002.

MACKAUER, M. Genetic problems in the production of biological control agents. **Annual Review of Entomology**, Stanford, v. 21, p. 369-385, 1976.

MAYR, E. Factors reducing the genetic variation of populations. In: _____. **Animal species and evolution**. Cambridge: Harvard University Press, 1963. cap. 8, p. 108-214.

MAYR, E. The population structure of species. In: _____. **Population, species, and evolution: an abridgement of animal species and evolution**. Cambridge: Harvard University Press, 1970. cap. 13, p. 214-234.

MEDEIROS, M. A. de. Parasitismo natural em ovos de crisopídeos. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 39, n. 1, p. 221-223, 2009.

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

MORALES, A. C.; LAVAGNINI, T. C.; FREITAS, S. Loss of genetic variability induced by agroecosystems: *Chrysoperla externa* (Hagen) (Neuroptera: Chrysopidae) as a case study. **Neotropical Entomology**, Londrina, v. 42, n. 1, p. 32–38, 2013.

MOURA, A. P.; CARVALHO, G. A.; MOSCARDINI, V. F.; MARQUES, M. C.; SOUZA, J. R. Toxicidade de pesticidas recomendados na Produção Integrada de Maçã (PIM) a populações de *Chrysoperla externa* (Hagen) (Neuroptera: Chrysopidae). **Neotropical Entomology**, Londrina, v. 38, n. 3, p. 395-404, 2009.

NEI, M.; MARUYAMA, T.; CHAKRABORTY, R. The bottleneck effect and genetic variability in populations. **Evolution**, Lancaster, v. 29, n. 1, p. 1-10, 1975.

NIE, R.; MOCHIZUKI, A.; BROOKS, S. J.; LIU, Z.; YANG, X. Phylogeny of the green lacewing *Chrysoperla nipponensis* species-complex (Neuroptera: Chrysopidae) in China, based on mitochondrial sequences and AFLP data. **Insect Science**, Beijing, v. 19, n. 6, p. 633-642, 2012.

PALOMEQUE, T.; LORITE, P. Satellite DNA in insects: a review. **Heredity**, London, v. 100, n. 6, p. 564–573, 2008.

PASSERINI, G. **Gli afidi con un prospetto dei generi ed alcune specie nuove Italiane**. Parma: Tipografia Carmignani, 1860. 40 p.

QUEIROZ, D. L.; ZANOL, K. M. R.; ANJOS, N. dos; ANDRADE, D. P. de. Dinâmica populacional de *Ctenarytaina spatulata* (Hemiptera: Psyllidae) em *Eucalyptus grandis* com novos registros de ocorrência. **Acta Biológica Paranaense**, Curitiba, v. 38, n. 3-4, p. 157-178, 2009.

RAMIRO, Z. A.; FARIA, A. M. de. Levantamento de insetos predadores nos cultivares de algodão Bollgard® DP90 e convencional Delta Pine Acala 90. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 73, n. 1, p. 119-121, 2006.

REDDY, K. D.; NAGARAJU, J.; ABRAHAM, E. G. Genetic characterization of the silkworm *Bombyx mori* by simple sequence repeat (SSR)-anchored PCR. **Heredity**, London, v. 68, n. 3, p. 681-687, 1999.

REDDY, M. P.; SARLA, N.; SIDDIQ, E. A. Inter simple sequence repeat (ISSR) polymorphism and its application in plant breeding. **Euphytica**, Wageningen, v. 128, n. 1, p. 9–17, 2002.

RIBEIRO, A. E. L. **Análise faunística e ocorrência sazonal de crisopídeos (Neuroptera: Chrysopidae) em agroecossistemas da região sudoeste da Bahia.** 2005. 109 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia - Fitotecnia) – Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, Vitória da Conquista, 2005.

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

RIBEIRO, L. J.; FILHO, E. B.; MACEDO, L. P. M.; MAGRO, S. R. Predação da lagarta-minadora-dos-citros *Phyllocnistis citrella* Stainton, 1856 (Lepidoptera: Gracillariidae) por larvas de *Chrysoperla externa* (Hagen 1861) (Neuroptera: Chrysopidae). **Revista Caatinga**, Mossoró, v. 20, n. 2, p. 100-105, 2007.

RIDLEY, M. Eventos aleatórios na genética de populações. In: _____. **Evolução**. 3. ed. Porto Alegre: Artmed, 2006. cap. 6, p. 167-184.

RISSE, P. A. Sur l'histoire naturelle des orangers, bigaradiers, limettiers cédratiers, limoniers ou citronniers, cultivés dans le département des Alpes-Maritimes. **Annales du Muséum National d'Histoire Naturelle**, Paris, v. 20, p. 401–431, 1813.

RODERICK, G. K. Geographic structure of insect populations: gene flow, phylogeography, and their uses. **Annual Review of Entomology**, Stanford, v. 41, p. 325-352, 1996.

RONDANI, C. Nota sopra una specie di afide, volante in numerosa term sulla città di Parma. **Nuovi annali delle scienze naturali**, Bologna, ser. 3, v. 6, p. 9-12, 1852.

ROUX, O.; GEVREY, M.; ARVANITAKIS, L.; GERS, C.; BORDAT, D.; LEGAL, L. ISSR-PCR: Tool for discrimination and genetic structure analysis of *Plutella xylostella* populations native to different geographical areas. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, Orlando, v. 43, n. 1, p. 240–250, 2007.

RUFFLER, C.; VAN DOOREN, T. J. M.; LEIMAR, O. ABRAMS, P. A. Disruptive selection and then what? **Trends in Ecology and Evolution**, Amsterdam, v. 21, n. 5, 2006.

SCOMPARIN, C. H. J. **Crisopídeos (Neuroptera, Chrysopidae) em seringueira (*Hevea brasiliensis* Muell. Arg.) e seu potencial no controle biológico de percevejo-de-renda (*Leptopharsa heveae* Drake & Poor) (Hemiptera, Tingidae).** 1997. 147 f. Dissertação (Mestrado em Entomologia Agrícola) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Jaboticabal, 1997.

SILVA, A. L. da; VELOSO, V. R. S.; CUNHA, H. F. da; FERREIRA, G. A.; SOUSA, L. T. Inimigos naturais de *Alabama argillacea* (Huebner, 1818), em regiões cotonicultoras do estado de Goiás. **Anais da Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz**, Piracicaba, v. 25, n. 2, p. 141-147, 1995.

SILVA, G. A.; CARVALHO, C. F.; SOUZA, B. Aspectos biológicos de *Chrysoperla externa* (Hagen, 1861) (Neuroptera: Chrysopidae) alimentada com lagartas de *Alabama argillacea* (Hubner, 1818) (Lepidoptera: Noctuidae). **Ciências e Agrotecnologia**, Lavras, v. 26, n. 4, p. 682-698, 2002.

SILVA, R. A.; REIS, P. R.; SOUZA, B.; CARVALHO, C. F.; CARVALHO, G. A.; COSME, L. V. Flutuação populacional de adultos de *Chrysoperla externa* (Hagen 1861) (Neuroptera: Chrysopidae) em cafeeiros conduzidos em sistemas orgânico e convencional. **Manejo Integrado de Plagas y Agroecología**, Turrialba, n. 77, p. 44-49, 2006.

SILVA, T. B. M.; JÚNIOR, F. F. A.; BASTOS, C. S.; SILVA, M. N. B. da; SOUZA, S. L. de; ALMEIDA, M. G. M. Reflexo do cultivo consorciado e exclusivo do algodão *Gossypium hirsutum* L. na densidade de insetos fitófagos, de inimigos naturais e nas características das plantas. In: CONGRESSO BRASILEIRO DO ALGODÃO, 6., 2007, Uberlândia. **Anais eletrônicos...** Uberlândia: ABRAPA, 2007. Disponível em: <<http://www.cnpa.embrapa.br/produtos/algodao/publicacoes/cba6/trabalhos/Entomologia/Trabalho%20E70.pdf>>. Acesso em: 5 abril 2013.

SLATKIN, M. Gene flow and the geographic structure of natural populations. **Science**, Washington, v. 236, n. 4803, p. 787-792, 1987.

SMITH-CALDAS, M. R. B.; MCPHERON, B. A.; SILVA, J. G.; ZUCCHI, R. A. Phylogenetic relationships among species of the *fraterculus* Group (*Anastrepha*: Diptera: Tephritidae) inferred from DNA sequences of mitochondrial cytochrome oxidase I. **Neotropical Entomology**, Londrina, v. 30, n. 4, p. 565-573, 2001.

SOLE, C. L.; SCHOLTZ, C. H.; BALL, J. B.; MANSELL, M. W. Phylogeny and biogeography of southern African spoon-winged lacewings (Neuroptera: Nemopteridae: Nemopterinae). **Molecular Phylogenetics and Evolution**, Orlando, v. 66, n. 1, p. 360–368, 2013.

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

SOUZA, B.; COSTA, R. I. F.; LOUZADA, J. N. C. Influência do tamanho e da forma de fragmentos florestais na composição da taxocenose de crisopídeos (Neuroptera: Chrysopidae). **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 75, n. 3, p. 351-358, 2008.

SOUZA, G. A.; CARVALHO, M. R. O.; MARTINS, E. R.; GUEDES, R. N. C.; OLIVEIRA, L. O. de. Diversidade genética estimada com marcadores ISSR em populações brasileiras de *Zabrotes subfasciatus*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 43, n. 7, p. 843-849, 2008.

STANTON, H. T. Descriptions of three species of Indian Micro-Lepidoptera. **Transactions of the Entomological Society of London**, London, v. 3, n. 8, p. 301-304, 1856.

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.

STEINMANN, H. The *Chrysopa* species (Neuroptera) of Hungary. **Annales historico-naturales Musei Nationales hungarici**, Budapest, v. 56, p. 257-266, 1964.

TAYLOR, S. J.; DOWNIE, D. A.; PATERSON, I. D. Genetic diversity of introduced populations of the water hyacinth biological control agent *Eccritotarsus catarinensis* (Hemiptera: Miridae). **Biological Control**, Orlando, v. 58, n. 3, p. 330-336, 2011.

VANDERGAST, A. G.; BOHONAK, A. J.; WEISSMAN, D. B.; FISHER, R. N. Understanding the genetic effects of recent habitat fragmentation in the context of evolutionary history: phylogeography and landscape genetics of a southern California endemic Jerusalem cricket (Orthoptera: Stenopelmidae: *Stenopelmatus*). **Molecular Ecology**, Oxford, v. 16, n. 5, p. 977-992, 2007.

VELONÀ, A.; LUCHETTI, A.; GHESINI, S.; MARINI, M.; MANTOVANI, B. Mitochondrial and nuclear markers highlight the biodiversity of *Kaloterme flavicollis* (Fabricius, 1793) (Insecta, Isoptera, Kalotermitidae) in the Mediterranean area. **Bulletin of Entomological Research**, Farnham Royal, v. 101, n. 3, p. 353-364, 2011.

WILSON, J. S.; WILLIAMS, K. A.; GUNNELL, C. F.; PITTS, J. P. Phylogeographic investigations of the widespread, arid-adapted antlion *Brachynemurus sackeni* Hagen (Neuroptera: Myrmeleontidae). **Psyche: a journal of entomology**, Cambridge, v. 2012, 7 p., 2012.

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

WOLFE, A. D.; LISTON, A. Contributions of PCR-based methods to plant systematics and evolutionary biology. In: SOLTIS, D. E.; SOLTIS, P. S.; DOYLE, J. J. (Ed.). **Molecular systematics of plants II: DNA sequencing**. Boston: Kluwer, 1998. cap. 2, p. 43-86.

WRIGHT, S. The evolution of dominance. **The American Naturalist**, Chicago, v. 63, n. 689, p. 556-561, 1929.

WRIGHT, S. The shifting balance theory and macroevolution. **Annual Review of Genetics**, Palo Alto, v. 16, p. 1-19, 1982.

CAPÍTULO 2 - Variabilidade genética comparada em populações de *Chrysoperla externa* (Hagen, 1861) (Neuroptera: Chrysopidae)

Nara C. C. P. Barbosa¹, Sérgio de Freitas^{1,3}, Adriana C. Morales^{1,2}

¹ Departamento de Fitossanidade, Universidade Estadual Paulista 'Júlio de Mesquita Filho', Via de Acesso Prof. Paulo Donato Castellane s/n, 14884-900 - Jaboticabal, SP. barbosa.naracristina@gmail.com

² Departamento de Biologia Aplicada à Agropecuária, Universidade Estadual Paulista 'Júlio de Mesquita Filho', Via de Acesso Prof. Paulo Donato Castellane s/n, 14884-900 - Jaboticabal, SP. dri_morales@fcav.unesp.br

³ *in memoriam*

RESUMO - Crisopídeos são predadores generalistas e a espécie *Chrysoperla externa* apresenta grande potencial para a utilização no controle biológico de pragas agrícolas devido a sua alta capacidade de predação e reprodução e ao fato de ser multiplicada com êxito em laboratório. A fim de maximizar o sucesso do controle biológico e evitar danos ambientais e econômicos, tornam-se extremamente importantes os estudos genéticos populacionais. Dessa forma, este estudo utilizou um marcador molecular nuclear (ISSR) e um mitocondrial (COI) para estimar a variabilidade genética de 13 populações do estado de São Paulo, Brasil, bem como a relação genética entre elas. Para ambos os marcadores foram observados altos níveis de diversidade genética. Houve grande compartilhamento de haplótipos e a correlação com a distribuição geográfica das populações foi ausente ou baixa, indicando que estas formavam uma única unidade populacional, que tem se diferenciado após sua expansão.

Palavras-chave:

COI, controle biológico, crisopídeo, distância genética, ISSR

Introdução

A família Chrysopidae é composta por cerca de 1.200 espécies distribuídas em 80 gêneros (FREITAS; PENNY, 2001). As fases, larval e adulta, apresentam hábito alimentar distinto, sendo que os adultos consomem pólen, néctar e "honeydew", enquanto as larvas são predadoras generalistas e se alimentam de diversos insetos considerados pragas agrícolas, como pulgões, cochonilhas, mosca-branca, bem como ovos e lagartas de lepidópteros (FREITAS, 2001).

Os crisopídeos possuem ampla distribuição geográfica, não tendo sido registrados apenas na Antártica (BROOKS; BARNARD, 1990). O gênero *Chrysoperla* Steinmann, 1964 é um dos mais estudados e possui 36 espécies descritas, das quais apenas quatro ocorrem no Brasil (FREITAS 2003) - *Chrysoperla*

defreitasi Brooks, 1994; *Chrysoperla raimundoi* Freitas e Penny, 2001; *Chrysoperla genanigra* Freitas, 2003 e *Chrysoperla externa* (Hagen, 1861). A última é considerada uma das espécies mais comum das Américas e pode ser encontrada desde o sul dos EUA até a Argentina (BROOKS, 1994). No Brasil já foi observada tanto em ambiente natural quanto em agroecossistemas em todo território nacional, com especial destaque para o estado de São Paulo (ADAMS; PENNY, 1985; BELORTE; RAMIRO; FARIA, 2004; RAMIRO; FARIA, 2006; QUEIROZ et al., 2009).

Associado a essa ampla distribuição geográfica e alta capacidade de predação, o elevado potencial reprodutivo e o sucesso na multiplicação em laboratório fazem de *C. externa* um possível agente para a utilização no controle biológico (FREITAS, 2001). Entretanto, é essencial que os indivíduos criados em laboratório sobrevivam e sejam eficientes no controle de pragas. Dessa forma, estudos genéticos populacionais são extremamente importantes, pois a variabilidade genética de uma espécie está diretamente associada com sua capacidade de suportar as condições diferentes ou adversas quando inserida em novos ambientes, de modo que conhecê-la pode auxiliar no sucesso do controle biológico, evitando danos econômicos e ambientais (BAKER; LOXDALE; EDWARDS, 2003; HUFBAUER; RODERICK, 2005).

A variabilidade genética e a estrutura populacional podem ser obtidas através de marcadores moleculares, tanto no DNA nuclear quanto no DNA mitocondrial (mtDNA). Os marcadores moleculares ISSR ("Inter Simple Sequence Repeat") tem sido amplamente utilizados em estudos de variabilidade genética (BORBA et al., 2005; SOUZA et al., 2008; KEHLMAIER; ASSMANN, 2010; TAYLOR; DOWNIE; PATERSON, 2011) uma vez que permitem a verificação de diferenças genéticas contidas em todo o genoma. Do mesmo modo, a região da Citocromo Oxidase, subunidade I (COI), é utilizada em diversos estudos populacionais de variabilidade genética, filogenia e ainda identificação de diversas espécies de insetos (CLARK; MEINKE; FOSTER, 2001; SMITH-CALDAS et al., 2001; WINTERTON; FREITAS, 2006; ASOKAN et al., 2007; VELONÀ et al., 2011).

O objetivo deste trabalho foi investigar e comparar a variabilidade genética de *Chrysoperla externa*, por meio dos marcadores moleculares ISSR e do gene mitocondrial COI, em populações estabelecidas em agroecossistemas no estado de

São Paulo, bem como identificar os marcadores ISSR mais eficazes para esta espécie, uma vez que não há relatos de estudos com neurópteros.

Material e Métodos

Municípios amostrados - Os espécimes de *Chrysoperla externa* foram coletados, com auxílio de rede entomológica, no período de julho de 2006 a maio de 2008, totalizando 95 indivíduos. Foram amostradas áreas de cultivos perenes, abrangendo 13 municípios do estado de São Paulo (Tabela 1).

Tabela 1. Municípios amostrados e respectivas coordenadas geográficas, número de indivíduos analisados (n), número de identificação dos espécimes (“voucher”), tipo de cultura nos pontos amostrados e data de coleta.

Municípios	Coordenadas geográficas*		n	“voucher”	Cultura	Data de coleta
	Latitude	Longitude				
Águas da Prata ¹	-21:56:13	-46:43:01	08	143-146, 885-888	café	VIII. 07
Andradina	-20:53:45	-51:22:44	08	75-78, 875-878	pastagem	VIII.06
Barretos ¹	-20:33:25	-48:34:04	07	123-125, 892, 895-897	citros	VIII.06 - XI.06
Brotas	-22:17:02	-48:07:37	08	898-905	eucalipto	XII.07-V.08
Cafelândia ²	-21:48:10	-49:36:36	08	79, 81, 82, 1017-1021	citros	XI.06-XII.06
Conchal ¹	-22:19:48	-47:10:22	07	91-94, 908, 909, 913	citros	X.06
Itápolis ^{1,2}	-21:35:45	-48:48:46	08	147-150, 1063-1066	citros	VIII.06-XI.06
Luiz Antônio ¹	-21:33:18	-47:42:14	08	103-106, 921-924	citros	I.07
Monte Aprazível	-20:46:22	-49:42:50	08	99-102, 927-930	citros	II.05 - VII.07
Presidente Prudente ³	-22:07:33	-51:23:20	08	787, 788, 791, 792, 794-797	café/eucalipto	VIII.06-III.07
Rifaina	-20:04:51	-47:25:15	02	987, 988	café	XI.07
São Carlos ²	-22:01:04	-47:53:27	07	1119-1124, 1126	citros	X.06
Sarutaiá	-23:16:22	-49:28:48	08	968-975	citros	VII.06

* Fonte: Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística – IBGE (2011).

¹ “Vouchers” 144, 123, 895, 94, 147 e 104 foram analisados apenas para ISSR.

² Sequências 1017-1021, 1063-1066, 1119-1126 obtidas em Lavagnini (2011).

³ Sequências obtidas em Morales, Lavagnini e Freitas (2013).

Os espécimes foram identificados com base nas características da morfologia externa (BROOKS; BARNARD, 1990), armazenados em álcool absoluto e mantidos em freezer no Laboratório de Biologia Molecular (LBM) do Departamento de Fitossanidade, FCAV.

A distância, em linha reta, entre os municípios amostrados foi calculada por meio do aplicativo “Google Earth” versão 7.0.1.8244 (GOOGLE, 2012) e um mapa (Figura 1) foi confeccionado com o programa “GPS Track Maker[©]” versão 13.8 (JUNIOR, 2012).

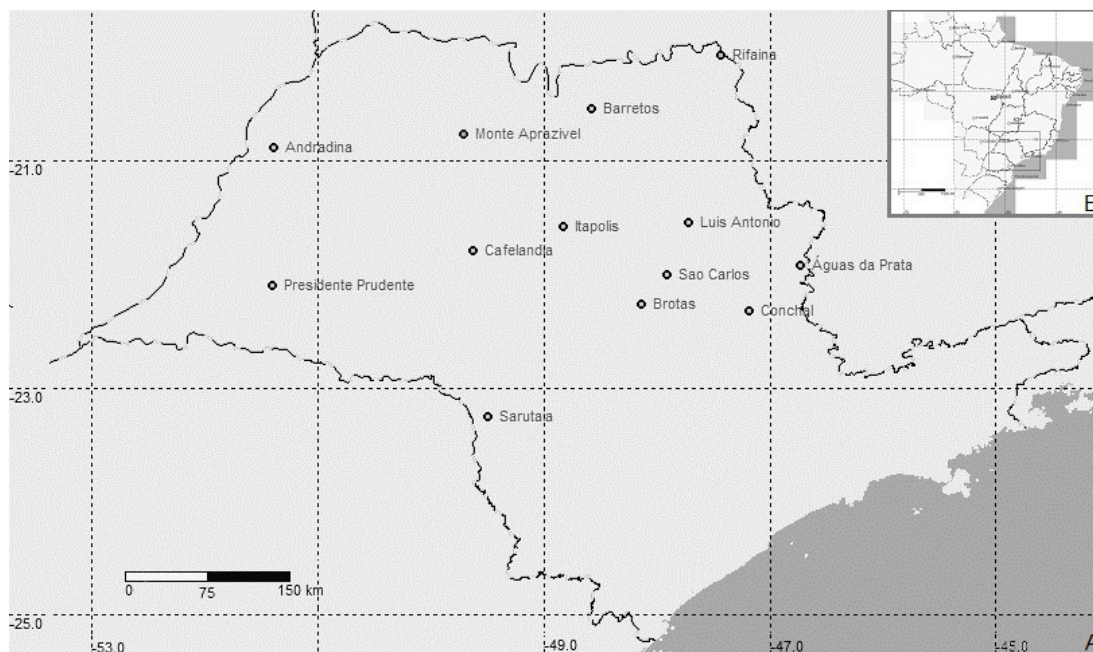


Figura 1. (A) Municípios amostrados no estado de São Paulo. (B) Mapa político do Brasil, com destaque para o estado de São Paulo.

Extração do DNA total - O DNA total foi extraído a partir do tórax dos insetos, sendo as demais partes (cabeça, asas e abdômen) armazenadas em álcool absoluto e mantidas em freezer no LBM, recebendo um número próprio de identificação (Tabela 1). O processo de extração foi realizado com auxílio de “Wizard® Genomic DNA Purification Kit” (Promega), seguindo-se o protocolo fornecido pelo fabricante. As amostras de DNA obtidas, com numeração correspondente, foram armazenadas no mesmo laboratório.

ISSR-PCR

Escolha dos “primers” e amplificação - Os “primers” ISSR utilizados pertencem ao conjunto 9 da “University of British Columbia” (UBC Set#9), formado por 100 iniciadores. Para realizar os testes de amplificação, estes foram primeiramente agrupados de acordo com a semelhança das sequências e a temperatura de desnaturação do “primer” (T_m). Foram então definidas as temperaturas de anelamento (T_a), sendo estabelecido um intervalo de temperatura que abrangia desde a maior T_m até 5 °C abaixo da menor T_m contida em cada grupo de “primer”. Os testes de amplificação foram efetuados com três espécimes de diferentes localidades, escolhidos aleatoriamente. Foram então selecionados oito “primers” que

geraram bandas polimórficas (Tabela 2) e realizados novos testes de padronização, a fim de adequar a concentração dos componentes da PCR e a temperatura de anelamento. As reações de PCR foram realizadas em termociclador “Mastercycler®” (“Eppendorf”) em um volume final de 25 µL, sendo 5 µL de 5X “Green GoTaq® Flexi Buffer” (Promega), 1 mM de MgCl₂, 0,2 mM de cada dNTP, 0,2 µM de “primer”, 1 u de “GoTaq® DNA Polimerase” (Promega) e 2 µL de DNA total (~ 30 ng). Foram utilizadas as condições de amplificação descritas por Souza et al. (2008), com adaptações: desnaturação inicial à 94 °C por 5 min, seguida por 35 ciclos de 45 s à 94 °C, 45 s para cada uma das temperaturas contidas num intervalo específico por “primer” (Tabela 2), 1 min e 50 s à 72 °C e uma etapa de extensão final de 72 °C por 7 min. Os produtos foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 2%, corados com brometo de etídio (1 ng/mL) e visualizados em luz ultravioleta. As imagens foram registradas com o programa Gel Doc 2000 – “Gel Documentation System” (Bio-Rad).

Tabela 2. Temperatura de anelamento específica por “primer” ISSR e sequência de nucleotídeos.

“Primer”	Sequência (5’ – 3’)	Temperatura de anelamento (°C)
UBC 809	AGA GAG AGA GAG AGA GG	44 - 46 - 48 - 50 - 52
UBC 820	GTG TGT GTG TGT GTG TC	47 - 49 - 51 - 53 - 55 - 57
UBC 836	AGA GAG AGA GAG AGA GYA	36 - 38 - 40 - 42 - 44 - 46 - 48
UBC 849	GTG TGT GTG TGT GTG TYA	47 - 49 - 51 - 53 - 55 - 57
UBC 856	ACA CAC ACA CAC ACA CYA	47 - 49 - 51 - 53 - 55 - 57
UBC 880	GGA GAG GAG AGG AGA	42 - 44 - 46 - 48
UBC 886	VDV CTC TCT CTC TCT CT	36 - 38 - 40 - 42 - 44 - 46 - 48
UBC 891	HVH TGT GTG TGT GTG TG	44 - 46 - 48 - 50 - 52

Análise dos dados - Foi construída uma matriz binária de ausência (0) e presença (1) de bandas, uma vez que marcadores ISSR são classificados como dominantes. O tamanho das bandas foi estimado com base no marcador de peso molecular 1 kb, sendo consideradas as bandas de fácil visualização. Bandas menos intensas e de baixa reprodutibilidade foram descartadas da análise. O programa POPGENE versão 1.32 (YEH; YANG; BOYLE, 1999) foi utilizado para estimar o número de locus polimórficos (NLP); a porcentagem de locus polimórficos (P); o índice de diversidade genética de Shannon (I) (LEWONTIN, 1972); a diversidade genética total (H_T), bem como dentro (H_S) e entre as populações (D_{ST}); o coeficiente global de

diferenciação genética (G_{ST}), que expressa a proporção da variabilidade contida entre as populações e corresponde ao F_{ST} de Wright; e o número de migrantes (N_m). A heterozigosidade observada (H_o), estimada com base na frequência de homozigotos recessivos (ausência da banda) e o índice de diversidade de Nei (1978) (H_e), o qual corresponde a heterozigosidade esperada corrigida para populações com baixo tamanho amostral ($n < 50$), foram obtidos por meio do programa TFPGA versão 1.3 (MILLER, 1997). Neste também foram calculadas a distância genética corrigida de Nei (1978) e a correlação entre esta e a distância geográfica em linha reta, por meio do teste de Mantel (1967). A Análise de Variância Molecular (AMOVA) foi obtida por meio do programa Arlequin versão 3.5.1.3 (EXCOFFIER; LISCHER, 2010). A fim de evitar que locus fossem excluídos da análise devido à ausência de dados para alguns indivíduos, a AMOVA foi realizada separadamente por “primer”. Dessa forma, os indivíduos que não apresentaram bandas para um determinado iniciador, foram excluídos apenas para esses locus, permanecendo no restante da análise.

COI

Amplificação e sequenciamento - O gene mitocondrial COI foi amplificado por meio da PCR, realizada em termociclador “Mastercycler®” (“Eppendorf”). A reação se deu em um volume final de 25 μ L, sendo 12,5 μ L de “GoTaq® Colorless Master Mix” (Promega), 0,4 μ M dos “primers” C1-J-2183 (5’CAACATTTATTTTGATTTTTTGG3’) e TL2-N-3014 (5’TCCATTGCACTAATCTGCCATATTA3’) (SIMON et al., 1994) e 2,5 μ L de DNA total (~ 40 ng). A amplificação ocorreu nas seguintes condições: desnaturação inicial à 94 °C por 2 min, seguida por 35 ciclos de 40 s à 94 °C, 50 s à 55 °C, 1 min à 72 °C e uma etapa de extensão final de 72 °C por 10 min. Os produtos foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1% e corados com brometo de etídio (1 ng/mL) a fim de confirmar a amplificação. O material foi então purificado por meio do kit “Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System” (Promega), segundo o protocolo fornecido pelo fabricante. Os produtos foram sequenciados utilizando-se os mesmos “primers” e condições da amplificação. As reações se deram em sequenciador automático “ABI Prism 3100 Genetic Analyser”, por meio de

“Big Dye™ Terminator” versão 3.1 (“Perkin-Elmer Applied Biosystems”) e as sequências foram depositadas no banco de dados do LBM.

Análise dos dados - As sequências foram lidas no programa Chromas Lite versão 2.01 (TECHNELYSIUM PTY LTD, 2005) e alinhadas no programa BioEdit versão 7.1.3.0 (HALL, 1999). Com o programa DnaSP versão 5.10.01 (LIBRADO; ROZAS, 2009) foram realizadas as análises descritivas, obtendo-se o número de sítios polimórficos (S) e de haplótipos (h), diversidade haplotípica (Hd), diversidade nucleotídica (π), número médio de diferenças nucleotídicas (k), o índice de fixação (F_{ST}) e o número de migrantes (N_m). A composição nucleotídica e a distância genética entre as populações foram obtidas através do programa MEGA versão 5.01 (TAMURA et al., 2011), sendo aplicada para a última, o modelo de correção Kimura-2-parâmetros (K2P), o qual considera as transições mais frequentes que as transversões, fato observado no mtDNA (PAGE; HOLMES, 1998). Essa matriz de distância genética foi utilizada para a análise de correlação com a matriz de distâncias geográficas, por meio do teste de Mantel (1967) realizado com o programa TFPGA versão 1.3 (MILLER, 1997). A AMOVA foi obtida por meio do programa Arlequin versão 3.5.1.3 (EXCOFFIER; LISCHER, 2010). Os testes de neutralidade, D de Tajima (TAJIMA, 1989) e F_s de Fu (FU, 1997), e a “Mismatch Distribution” foram realizados com o programa DnaSP versão 5.10.01 (LIBRADO; ROZAS, 2009), a fim de determinar o comportamento populacional ao longo do tempo. Uma rede haplotípica foi construída com o programa TCS versão 1.12 (CLEMENT; POSADA; CRANDALL, 2000) e os clados aninhados segundo a metodologia de Templeton, Boerwinkle e Sing (1987). A correlação entre os clados aninhados e a localização geográfica dos haplótipos foi analisada por meio do programa GeoDis versão 2.6 (POSADA; CRANDALL; TEMPLETON, 2000), sendo os índices testados na chave de inferência filogenética (TEMPLETON, 2004) disponibilizada pelo mesmo programa (darwin.uvigo.es/software/geodis.html).

Resultados e Discussão

ISSR-PCR – Os oito “primers” escolhidos geraram, em conjunto, 134 fragmentos polimórficos sendo 17 obtidos com UBC 809; 21 com UBC 820; 15 com UBC 836 e

UBC 849; 22 com UBC 856; 16 com UBC 880 e UBC 891; 12 com UBC 886 (Figura 2).

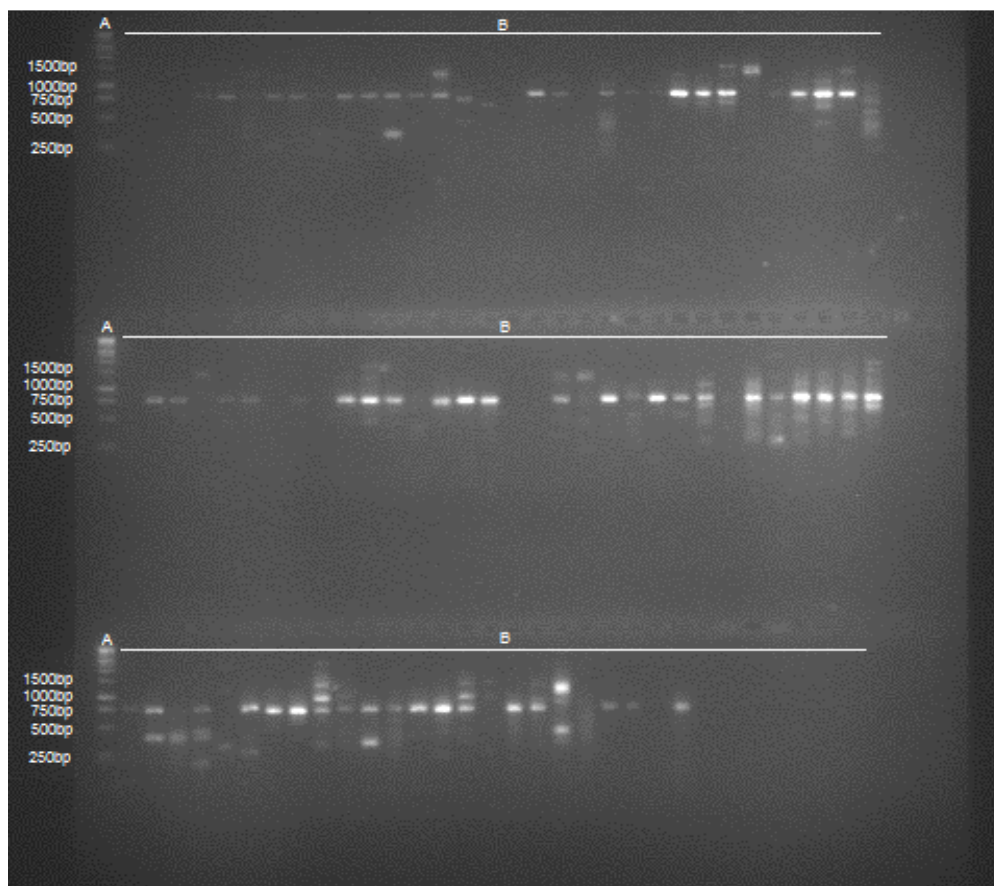


Figura 2. Exemplo de bandas de ISSR em gel de agarose 2%. A: marcador de peso molecular 1 kb. B: bandas amplificadas nas populações de *C. externa* para o “primer” UBC 809.

Este resultado demonstra a alta capacidade de detecção de polimorfismo da técnica para esta espécie, como já observado para outras ordens de insetos (BORBA et al., 2005; SOUZA et al., 2008; VELU et al., 2008). Os índices de diversidade e polimorfismo foram gerados em relação ao número total de fragmentos, sendo apenas a AMOVA efetuada separadamente por “primer”.

As populações apresentaram, em média, 34,39% de polimorfismo, variando de 10,45% a 65,67%. A heterozigosidade (H_o), estimada com base na frequência de homozigotos recessivos, variou de 0,0604 a 0,1646, com média de 0,0876. O índice de diversidade de Nei (H_e), o qual corresponde a heterozigosidade esperada corrigida para populações com baixo tamanho amostral, foi em média 0,0902, variando de 0,0710 a 0,1773. Já o índice de diversidade de Shannon (I) variou de

0,0882 a 0,2671 (Tabela 3). Para todos os parâmetros, os maiores valores absolutos foram observados no município de Brotas, seguido por altos índices em Barretos e São Carlos.

Tabela 3. Índices de diversidade genética dentro das populações de *C. externa*.

Municípios	n	NLP	P (%)	H _o	H _e	I
Águas da Prata	08	31	23,13	0,0833	0,0930	0,1322 ± 0,2186
Andradina	08	55	41,04	0,0907	0,0989	0,1507 ± 0,2073
Barretos	07	44	32,84	0,0985	0,1117	0,1591 ± 0,2206
Brotas	08	88	65,67b	0,1646	0,1773	0,2671 ± 0,2280
Cafelândia	08	47	35,07	0,0814	0,0882	0,1338 ± 0,2051
Conchal	07	38	28,36	0,0766	0,0833	0,1222 ± 0,2106
Itápolis	08	35	26,12	0,0785	0,0853	0,1256 ± 0,2113
Luis Antônio	08	42	31,34	0,0662	0,0710	0,1118 ± 0,1840
Monte Aprazível	08	51	38,06	0,0811	0,0867	0,1362 ± 0,1974
Presidente Prudente	08	44	32,84	0,0858	0,0918	0,1374 ± 0,2170
Rifaina	02	14	10,45	0,0604	0,0805	0,0882 ± 0,2146
São Carlos	07	54	40,30	0,0974	0,1051	0,1591 ± 0,2173
Sarutaiá	08	41	30,60	0,0742	0,0799	0,1211 ± 0,2012
Média	-	44,9	34,39	0,0876	0,0902	0,1418 ± 0,0583

n = número de espécimes analisados; NLP = Número de locus polimórficos; P = Porcentagem de locus polimórficos; H_o = Heterozigosidade observada; H_e = Índice de diversidade de Nei (1978); I = Índice de diversidade genética de Shannon (LEWONTIN, 1972).

Dentre os municípios amostrados, Brotas, Barretos e São Carlos são os que apresentam a maior cobertura vegetal nativa, com 10.565,21 ha, 12.148,03 ha e 13.030,66 ha, respectivamente, distribuídos entre áreas de mata, capoeira, cerrado e vegetação de várzea (Tabela 4). No município de Brotas ainda encontram-se duas unidades de conservação, a Estação Ecológica São Carlos e parte da Estação Ecológica Itirapina. Dessa forma, a alta diversidade associada a estas regiões pode estar relacionada à presença de vegetação nativa, a qual deve constituir um reservatório de diversidade genética, como sugerido por Morales, Lavagnini e Freitas (2013).

Os índices de diversidade mais baixos foram observados para o município de Rifaina, o que pode estar associado ao menor número de indivíduos amostrados nessa localidade, uma vez que ao se corrigir o baixo número amostral, a diversidade (H_e) aproximou-se da média.

Tabela 4. Área (ha) e tipo de vegetação natural encontrada nos municípios amostrados*.

Município	Mata	Capoeira	Cerrado	Cerradão	Campo cerrado	Vegetação de várzea	não classificada	Vegetação natural total
AP	1.091,86	1.899,54	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	2991,4
AN	601,15	1.313,32	121,91	0,00	0,00	215,89	39,54	2291,81
BA	1.380,08	2.141,12	1.277,48	2.022,18	0,00	5.268,27	58,9	12148,03
BR	3.101,84	3.037,78	646,91	2.949,19	0,00	750,65	78,84	10565,21
CA	5.487,10	914,97	203,09	304,28	0,00	1.246,20	6,21	8161,85
CO	288,93	124,64	0,00	0,00	0,00	12,47	23,46	449,5
IT	1.283,75	2.410,25	17,41	171,45	6,11	1.092,98	25,26	5007,21
LA	1.108,46	833,48	1.629,24	3.509,35	0,00	269,37	27,45	7377,35
MA	126,02	734,85	271,26	0,00	0,00	461,87	80,65	1674,65
PP	359,32	407,27	0,00	0,00	0,00	0,00	14,58	781,17
RI	30,28	1.148,08	899,17	0,00	0,00	284,4	1,26	2364,19
SC	1.773,13	4.344,70	2.737,38	2.685,75	0,00	1.463,32	26,38	13030,66
SA	877,74	785,02	0,00	0,00	0,00	12,62	0,00	1675,38

* Fonte: Instituto Florestal (2001)

A diversidade genética total (H_T) encontrada foi de $0,0925 \pm 0,0132$, sendo $0,0831 \pm 0,0060$ correspondente à diversidade genética dentro das populações (H_S) e $0,0094 \pm 0,0145$ à diversidade genética entre as populações (D_{ST}). O coeficiente global de diferenciação genética (G_{ST}) foi de 0,1019, indicando um grau intermediário de diferenciação entre as populações, uma vez que valores inferiores a 0,05 representam baixos níveis de diferenciação genética e superiores a 0,151, alta diferenciação (YEH; CHONG; YANG, 1995). O número médio de migrantes (N_m) obtido foi de 4,4051 e, segundo McDermott e McDonald (1993), valores de N_m superiores a 1 já seriam suficientes para evitar que alelos seletivamente neutros sejam fixados em diferentes populações, de modo que hajam poucas diferenças entre as elas.

Entretanto, a AMOVA apontou a presença de uma estrutura genética para sete dos oito “primers” analisados (Tabela 5), de modo que, em média, 56,53% da variabilidade está contida entre as populações enquanto 43,47% são observados dentro das mesmas. Este valor discorda com o obtido para diversidade genética (H_S e D_{ST}), no qual a diversidade maior foi observada dentro das populações. Além disso, o nível de diferenciação (F_{ST}) médio entre as populações foi de 0,56, reforçando que as populações apresentam diferenças e estão estruturadas, uma vez que valores superiores a 0,25 indicam diferenciação genética muito grande (WRIGHT, 1978; HARTL; CLARK, 2010a). Dessa forma, pode-se inferir que o fluxo gênico esteja restrito a algumas populações, permitindo a diferenciação nas demais, como pode ser observado pela presença de bandas exclusivas para as populações

de Andradina (3), Brotas (6), Cafelândia (1), Luiz Antônio (1), Monte Aprazível (2), Presidente Prudente (2), São Carlos (1) e Sarutaiá (1).

Tabela 5. Análise da variância molecular (AMOVA) para as populações de *C. externa* para os diferentes “primers”.

“Primer”	Porcentagem de variação entre populações (%)	Porcentagem de variação dentro das populações (%)	F _{ST}	valor de p
UBC 809	57,27	42,73	0,57274	0,00000 ± 0,00000
UBC 820	63,40	36,60	0,63396	0,00000 ± 0,00000
UBC 836	57,34	42,66	0,57337	0,00000 ± 0,00000
UBC 849	57,92	42,08	0,57924	0,00000 ± 0,00000
UBC 856	53,60	46,40	0,53598	0,00293 ± 0,00164
UBC 880	55,91	44,09	0,55913	0,00000 ± 0,00000
UBC 886	46,90	53,10	0,46896	0,48485 ± 0,01454
UBC 891	59,88	40,12	0,59882	0,00000 ± 0,00000
Média	56,53	43,47	0,56527	

A distância genética entre as populações foi pequena, variando de 0,0047 (Cafelândia e Monte Aprazível) a 0,0625 (Águas da Prata e Rifaina) (Tabela 6). Valores de distância genética baixos também foram observados por Wells (1994) entre populações de outras espécies do gênero *Chrysoperla*, porém utilizando marcadores enzimáticos. Estes dados mostram que as populações apresentam grande similaridade genética, indicativo de curto período de isolamento entre elas ou à presença de fluxo gênico suficiente para homogeneizá-las (McDERMOTT; McDONALD, 1993). O teste de Mantel apontou uma discreta correlação positiva ($r = 0,2421$; $P = 0,9230$) entre as matrizes de distâncias genética e geográfica (Tabela 6), de modo que as populações tendem a ser mais distintas quando estão afastadas geograficamente e mais semelhantes entre municípios próximos como observado, por exemplo, entre Águas da Prata e Presidente Prudente, Andradina e Rifaina, Brotas e Conchal e entre Cafelândia e Itápolis.

Tabela 6. Distância genética entre as populações de *C. externa* baseada nos marcadores ISSR (diagonal inferior) e distância geográfica (km) entre os municípios (diagonal superior).

	AP	AN	BA	BR	CA	CO	IT	LA	MA	PP	RI	SC	SA
AP		492,3	248,0	150,9	300,3	64,2	219,8	110,9	337,8	482,7	220,2	121,4	319,8
AN	0,0193		293,5	370,0	209,4	462,9	279,3	389,5	174,4	137,1	422,4	381,8	329,3
BA	0,0171	0,0320		198,4	175,3	247,1	120,8	145,7	120,9	338,3	130,3	177,5	316,2
BR	0,0190	0,0234	0,0055		162,8	98,3	103,2	91,6	234,8	335,6	254,9	38,5	176,6
CA	0,0201	0,0195	0,0091	0,0143		258,9	86,4	199,7	115,8	185,9	297,1	179,2	163,9
CO	0,0224	0,0337	0,0183	0,0192	0,0158		187,9	101,9	314,5	434,3	253,1	82,2	257,8
IT	0,0306	0,0316	0,0197	0,0144	0,0190	0,0172		114,8	132,1	272,0	221,7	105,7	197,2
LA	0,0233	0,0356	0,0347	0,0319	0,0305	0,0228	0,0179		225,7	386,0	166,1	53,6	264,1
MA	0,0261	0,0245	0,0069	0,0119	0,0047	0,0188	0,0181	0,0391		227,6	250,2	233,6	282,0
PP	0,0412	0,0422	0,0133	0,0194	0,0137	0,0244	0,0279	0,0426	0,0087		468,4	359,6	234,6
RI	0,0625	0,0453	0,0456	0,0352	0,0255	0,0421	0,0351	0,0506	0,0302	0,0393		220,8	413,8
SC	0,0238	0,0298	0,0252	0,0227	0,0226	0,0241	0,0265	0,0300	0,0291	0,0355	0,0173		214,6
SA	0,0152	0,0277	0,0251	0,0228	0,0214	0,0195	0,0206	0,0170	0,0248	0,0379	0,0243	0,0128	

AP = Águas da Prata; AN = Andradina; BA = Barretos; BR = Brotas; CA = Cafelândia; CO = Conchal; IT = Itápolis; LA = Luís Antônio; MA = Monte Aprazível; PP = Presidente Prudente; RI = Rifaina; SC= São Carlos; SA = Sarutaiá.

COI – As 89 sequências, com 648 bp cada, apresentaram uma composição nucleotídica média de 44,3% de timina (T), 12,7% de citosina (C), 28,4% de adenina (A) e 14,5% de guanina (G), podendo-se notar uma maior porcentagem de A-T, como esperado para o DNA mitocondrial de insetos (HOY, 2003). Foram obtidos 24 sítios polimórficos (S), resultando em 22 haplótipos (h) (Tabela 7) e uma diversidade haplotípica (Hd) de 0,7886 (Tabela 8).

Tabela 7. Lista de haplótipos do mtDNA (COI) de *C. externa*.

Haplótipos	"Voucher"
143 / 787	143, 787
145	145
146	146, 76, 876, 124, 125, 896, 898, 905, 81, 1019, 91, 92, 913, 148, 150, 924, 101, 929, 987, 988, 1119, 1123, 968, 970, 971
885	885, 877, 902, 1021, 149, 975
886	886, 75, 78, 875, 892, 897, 899, 904, 79, 82, 1017, 1018, 1020, 93, 1063, 1066, 103, 105, 106, 922, 923, 100, 102, 927, 928, 788, 791, 796, 1121, 1122, 972, 974
887	887, 878, 903, 797, 969, 973
888	888
77	77
900	900
901	901
908	908
909	909
1064	1064
1065	1065
921	921
99	99
930	930
792	792
794	794
795	795
1120	1120, 1124
1126	1126

Altos valores de diversidade haplotípica também foram observados por Morales e Freitas (2010) e por Morales, Lavagnini e Freitas (2013) em estudos com diferentes populações de *C. externa*, sendo 0,956 e 0,866, respectivamente. Morales, Lavagnini e Freitas (2013) observaram valores de diversidade haplotípica e nucleotídica superiores em regiões de vegetação nativa ($H_d = 0,962$ e $\pi = 0,00861$), quando comparadas à agroecossistemas ($H_d = 0,866$ e $\pi = 0,00353$). De modo semelhante, o município de Brotas, o qual possui uma ampla cobertura vegetal (INSTITUTO FLORESTAL, 2001), apresentou altos valores de diversidade

haplotípica, juntamente com os municípios de Águas da Prata e Presidente Prudente. Morales e Freitas (2010) e Morales, Lavagnini e Freitas (2013) observaram, respectivamente, 24 haplótipos em 40 indivíduos amostrados e 41 haplótipos em 122 indivíduos amostrados, notando-se que o aumento no número de haplótipos não é proporcional ao aumento da amostra. Assim, no presente estudo, o valor encontrado para o número de haplótipos, distribuídos nas populações, corrobora os estudos previamente realizados, de modo que o estado de São Paulo, representado pelos 22 haplótipos, exibe satisfatoriamente a variabilidade da espécie.

O número médio de diferenças nucleotídicas ($k = 1,837$) e a diversidade nucleotídica média ($\pi = 0,00283$) (Tabela 8) foram baixos, o que significa que poucos sítios segregantes são responsáveis pela formação dos haplótipos.

Tabela 8. Medidas de variabilidade das populações de *C. externa*.

Municípios	n	S	h	Hd	k	π
Águas da Prata	7	12	7	1,00000	3,80952	0,00588
Andradina	8	5	5	0,85714	1,71429	0,00265
Barretos	5	1	2	0,60000	0,60000	0,00093
Brotas	8	8	6	0,92857	2,32143	0,00358
Cafelândia	8	4	3	0,60714	1,28571	0,00198
Conchal	6	6	4	0,80000	2,20000	0,00340
Itápolis	7	6	5	0,90476	2,00000	0,00309
Luís Antônio	7	2	3	0,52381	0,57143	0,00088
Monte Aprazível	8	3	4	0,75000	0,92857	0,00143
Presidente Prudente	8	10	6	0,89286	3,00000	0,00463
Rifaina	2	0	1	0,00000	0,00000	0,00000
São Carlos	7	5	4	0,85714	2,47619	0,00382
Sarutaiá	8	5	4	0,82143	1,60714	0,00248
Média	-	1,85	1,69	0,7886	1,837	0,00283
Total	89	24	22	-	-	-

n = número de sequências analisadas; S = número de sítios polimórficos; h = número de haplótipos; Hd = diversidade haplotípica; k = número médio de diferenças nucleotídicas; π = diversidade nucleotídica.

A distância genética entre as populações foi muito pequena e variou de 0,001 a 0,005 (Tabela 9), o que pode ser decorrente de fluxo gênico entre as mesmas ($N_m = 28,07$), o qual evita a fixação de alelos e consequente diferenciação das populações. Valores semelhantes de distância genética foram observados por Morales e Freitas (2010) para populações de *C. externa* do município de Jaboticabal, a qual variou de 0,002 a 0,006, sugerindo não haver uma diferenciação

entre as localidades. A grande similaridade genética também foi evidenciada pela distribuição dos haplótipos deste estudo, como pode ser observado na Tabela 7, mostrando que as populações compartilham haplótipos entre si. O teste de Mantel revelou uma discreta correlação positiva entre a distância genética e a distância geográfica ($r = 0,1204$; $P = 0,7350$), como pode ser observado, por exemplo, entre os municípios de Águas da Prata e Andradina, Conchal e Presidente Prudente, Brotas e Luís Antônio e Cafelândia e Itápolis (Tabela 9), de modo que populações próximas tendem a ser mais semelhantes geneticamente e vice-versa, resultado também encontrado para o outro marcador desse estudo.

A AMOVA também mostra semelhança entre as populações, indicando que 52,35% da variabilidade está contida dentro das populações e 47,65% entre elas, associado ao valor não significativo de $F_{ST} = 0,47647$; $p = 0,75855 \pm 0,01387$, o que indica a ausência de estrutura genética entre estas populações.

Os valores observados para os testes de neutralidade D de Tajima e F_s de Fu foram $-1,84328$ ($p < 0,05$) e $-15,093$ ($p = 0,000$), respectivamente. Valores negativos indicam um excesso de alelos raros dentro da população e podem sugerir expansão populacional (RAMOS-ONSINS; ROZAS, 2002; HARTL; CLARK, 2010c). Entretanto, essa condição não foi confirmada pela “Mismatch Distribution”, a qual apresentou uma curva multimodal (Figura 3), indicando que as populações permaneceram estáveis ao longo do tempo (SLATKIN; HUDSON, 1991; ROGERS; HARPENDING, 1992; MOUSSET; DEROME; VEUILLE, 2004).

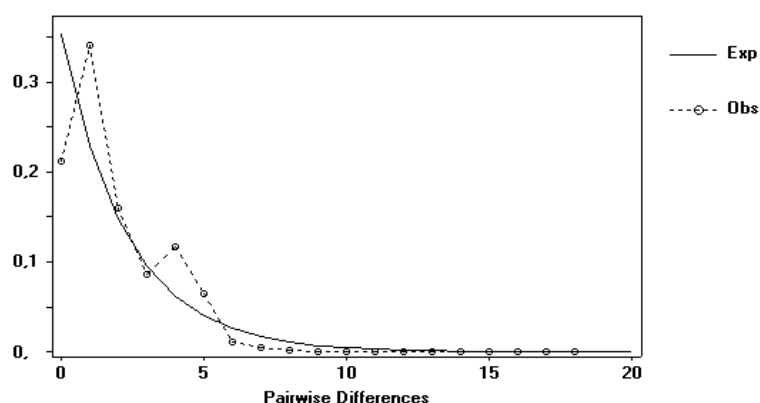


Figura 3. “Mismatch Distribution” para as populações de *C. externa*.

Tabela 9. Distância genética (Nei 1978) entre as populações de *C. externa* baseada no mtDNA COI (diagonal inferior) e distância geográfica (km) entre os municípios (diagonal superior).

	AP	AN	BA	BR	CA	CO	IT	LA	MA	PP	RI	SC	SA
AP		492,3	248,0	150,9	300,3	64,2	219,8	110,9	337,8	482,7	220,2	121,4	319,8
AN	0,004		293,5	370,0	209,4	462,9	279,3	389,5	174,4	137,1	422,4	381,8	329,3
BA	0,003	0,002		198,4	175,3	247,1	120,8	145,7	120,9	338,3	130,3	177,5	316,2
BR	0,005	0,003	0,002		162,8	98,3	103,2	91,6	234,8	335,6	254,9	38,5	176,6
CA	0,004	0,002	0,001	0,003		258,9	86,4	199,7	115,8	185,9	297,1	179,2	163,9
CO	0,004	0,003	0,002	0,003	0,003		187,9	101,9	314,5	434,3	253,1	82,2	257,8
IT	0,004	0,003	0,002	0,003	0,002	0,003		114,8	132,1	272,0	221,7	105,7	197,2
LA	0,004	0,002	0,001	0,002	0,001	0,002	0,002		225,7	386,0	166,1	53,6	264,1
MA	0,004	0,002	0,001	0,002	0,002	0,002	0,002	0,001		227,6	250,2	233,6	282,0
PP	0,005	0,003	0,003	0,004	0,003	0,004	0,004	0,003	0,003		468,4	359,6	234,6
RI	0,003	0,002	0,001	0,002	0,002	0,002	0,002	0,002	0,002	0,003		220,8	413,8
SC	0,005	0,003	0,003	0,004	0,003	0,004	0,004	0,003	0,003	0,004	0,002		214,6
SA	0,004	0,002	0,002	0,003	0,002	0,003	0,003	0,002	0,002	0,003	0,001	0,003	

AP = Águas da Prata; AN = Andradina; BA = Barretos; BR = Brotas; CA = Cafelândia; CO = Conchal; IT = Itápolis; LA = Luís Antônio; MA = Monte Aprazível; PP = Presidente Prudente; RI = Rifaina; SC = São Carlos; SA = Sarutaiá.

Segundo Ramos-Onsins e Rozas (2002), os testes de neutralidade apresentam um suporte estatístico mais robusto que a “Mismatch Distribution”. Além disso, outros fatores evidenciam uma expansão populacional, como o valor rg – “raggedness statistic” (que mede a uniformidade da distribuição) e a conformação da rede haplotípica. O valor de rg obtido foi de 0,0619, o qual tende a apresentar-se baixo para o modelo de crescimento populacional (RAMOS-ONSINS; ROZAS, 2002). A rede haplotípica construída (Figura 4) apresenta o formato de estrela, confirmando a hipótese de expansão populacional, uma vez que indica a presença de vários haplótipos semelhantes, com baixa diversidade nucleotídica, sugerindo que a maior parte destes haplótipos surgiu recentemente (FERRERI; QU; HAN, 2011).

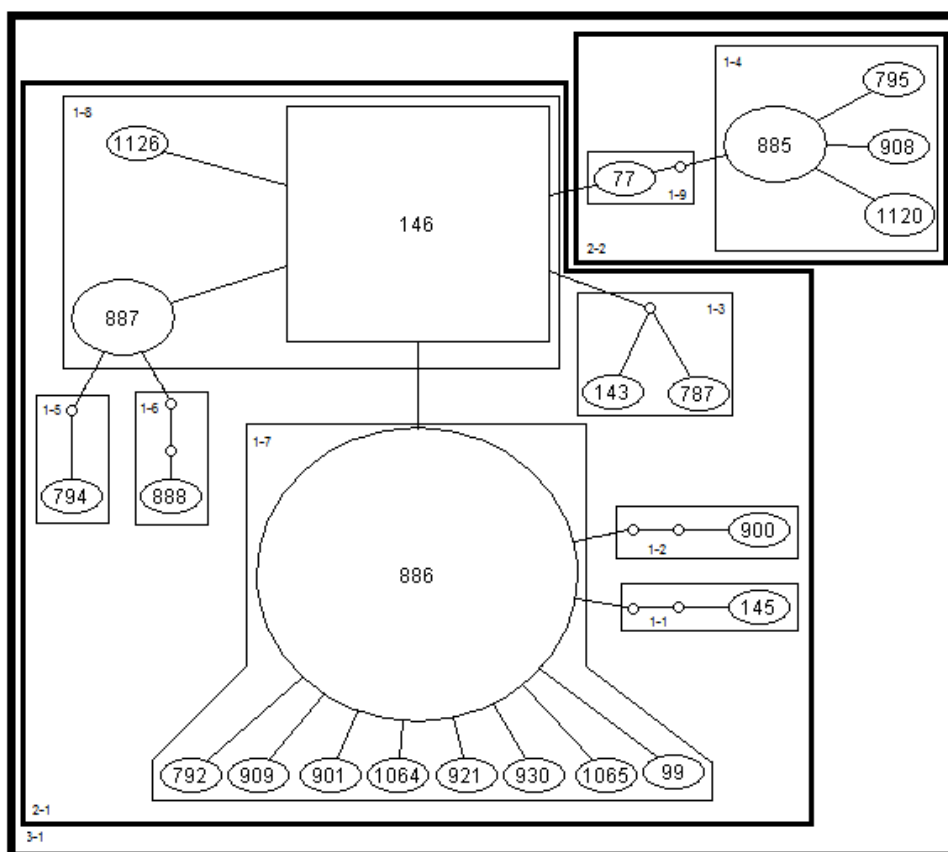


Figura 4. Rede haplotípica aninhada, para sequências de mtDNA (COI) de *C. externa*. Cada linha sólida representa um passo mutacional e interliga dois haplótipos a uma probabilidade maior do que o nível de 95%. Pequenos círculos não nomeados correspondem à falta de haplótipos intermediários.

A análise dos clados aninhados (NCPA) não apresentou nenhum dos valores de D_c (distância do clado), D_n (distância do clado agrupado) e I-T (relação interior-extremidade) fornecidos pela análise, significativos. Dessa forma, não foi possível rejeitar a hipótese nula de não associação geográfica entre os haplótipos, fato que se observa na rede haplotípica (Figura 4), na qual tanto haplótipos mais ancestrais (centros 146 e 886) quanto os derivados (885 e 887), são compartilhados por várias populações. Este resultado não corrobora o encontrado para o teste de Mantel, que indicou uma discreta correlação positiva entre as distâncias genética e geográfica. Isto pode estar associado ao número de populações amostradas (< 25), uma vez que tamanhos populacionais pequenos podem levar a erros do tipo I para o teste de Mantel, ocorridos quando se rejeita a hipótese nula de não associação embora esta seja verdadeira (LOUZADA; BEARZOTI; CARVALHO, 2006) e ao fato da correlação ter sido obtida pela alta semelhança genética entre municípios próximos.

Ambos os marcadores, ISSR e gene COI, mostraram uma elevada diversidade genética para *C. externa*, o que pode indicar uma alta capacidade adaptativa desses inimigos naturais em áreas de agroecossistemas, como já sugerido por Reed e Frankram (2003) para diferentes espécies de invertebrados, uma vez que os efeitos da deriva genética tendem a ser minimizados pela alta variabilidade contida nas populações.

As diferenças obtidas quanto à estruturação populacional entre os marcadores pode ser atribuída às suas características, em que o gene mitocondrial COI, devido à ausência de recombinação e ao menor acúmulo de substituições em relação a regiões intergênicas do DNA nuclear, revela a história evolutiva das populações segundo uma ampla escala de tempo, de modo que populações recentemente isoladas tendem a apresentar grandes similaridades genéticas. Diferentemente, marcadores nucleares SSR são altamente polimórficos e podem revelar efeitos mais recentes do isolamento reprodutivo ou do baixo fluxo gênico (LOXDALE; LUSHAI, 1998; HARTL; CLARK, 2010b).

Dessa forma, podemos inferir que as populações de *C. externa* amostradas formam uma única unidade populacional, uma vez que apresentam alto grau de similaridade genética, baseada na distribuição haplotípica, sem nenhuma relação à distribuição geográfica das populações. Entretanto a expansão populacional,

seguida por isolamento dessas populações poderá resultar na diferenciação genética das mesmas, como indicado pelos dados obtidos por ISSR, aumentando os efeitos decorrentes da deriva genética pela perda acidental de variabilidade.

Agradecimentos

À CAPES pela concessão de bolsa de mestrado à NCCPB e à FAPESP (processo nº 2006/03494-0), pelo financiamento de parte do projeto.

Referências

- ADAMS, P. A.; PENNY, N. D. Neuroptera of the Amazon Basin. Part 11a. Introduction and Chrysopini. **Acta Amazonica**, Manaus, v. 15, n. 3-4, p. 413-479, 1985.
- ASOKAN, R.; KRISHNA KUMAR, N. K.; KUMAR, V.; RANGANATH, H. R. Molecular differences in the mitochondrial cytochrome oxidase I (mtCOI) gene and development of a species-specific marker for onion thrips, *Thrips tabaci* Lindeman, and melon thrips, *T. palmi* Karny (Thysanoptera: Thripidae), vectors of tospoviruses (Bunyaviridae). **Bulletin of Entomological Research**, Farnham Royal, v. 97, n. 5, p. 461–470, 2007.
- BAKER, D. A.; LOXDALE, H. D.; EDWARDS, O. R. Genetic variation and founder in the parasitoid wasp, *Diaeretiella rapae* (M'intosh) (Hymenoptera: Braconidae: Aphidiidae), affecting its potential as a biological control agent. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 12, n. 12, p. 3303–3311, 2003.
- BELORTE, L. C. C.; RAMIRO, Z. A.; FARIA, A. M. Ocorrência de predadores em cinco cultivares de soja [*Glycine max* (L.) Merrill, 1917] no município de Araçatuba, SP. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 71, n. 1, p. 45-49, 2004.
- BORBA, R. S.; GARCIA, M. S.; KOVALESKI, A.; OLIVEIRA, A. C.; ZIMMER, P. D.; CASTELO BRANCO, J. S.; MALONE, G. Dissimilaridade genética de linhagens de *Trichogramma* Westwood (Hymenoptera: Trichogrammatidae) através de marcadores moleculares ISSR. **Neotropical Entomology**, Londrina, v. 34, n. 4, p. 565-569, 2005.
- BROOKS, S. J. A taxonomic review of the common green lacewing genus *Chrysoperla* (Neuroptera: Chrysoperla). **Bulletin of the British Museum Natural History (Entomology)**, London, v. 63, n. 2, p. 137-210, 1994.
- BROOKS, S. J.; BARNARD, P. C. The green lacewings of the world: a generic review (Neuroptera: Chrysopidae). **Bulletin of the British Museum Natural History (Entomology)**, London, v. 59, n. 2, p. 117-286, 1990.

CLARK, T. L.; MEINKE, L. J.; FOSTER, J. E. PCR-RFLP of the mitochondrial cytochrome oxidase (subunit I) gene provides diagnostic markers for selected *Diabrotica* species (Coleoptera: Chrysomelidae). **Bulletin of Entomological Research**, Farnham Royal, v. 91, n. 6, p. 419–427, 2001.

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

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

FERRERI, M.; QU, W.; HAN, B. Phylogenetic networks: A tool to display character conflict and demographic history. **African Journal of Biotechnology**, Nairobi, v. 10, n. 60, p. 12799-12803, 2011.

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

FREITAS, S. *Chrysoperla* Steinmann, 1964 (Neuroptera, Chrysopidae): descrição de uma nova espécie do Brasil. **Revista Brasileira de Entomologia**, São Paulo, v. 47, n. 3, p. 385-387, 2003.

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

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

GOOGLE. Google Earth. Versão 7.0.1.8244. [S. l.]: Google Inc., 2012. Disponível em: <<http://www.google.com/earth/index.html>>. Acesso em: 29 out. 2012.

HAGEN, H. Synopsis of the Neuroptera of North America, with a list of the South American species. **Smithsonian Miscellaneous Collections**, Washington, v. 4, n. 1, p. 1-347, 1861.

HALL, T. A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucleic Acids Symposium Series**, Oxford, v. 41, n. 1, p. 95-98, 1999.

HARTL, D. L.; CLARK, A. G. Endocruzamento, subdivisão populacional e migração. In: _____. **Princípios de genética de populações**. 4. ed. Porto Alegre: Artmed, 2010a. cap. 6, p. 271-330.

HARTL, D. L.; CLARK, A. G. Genética de populações molecular. In: _____. **Princípios de genética de populações**. 4. ed. Porto Alegre: Artmed, 2010b. cap. 7, p. 331-400.

HARTL, D. L.; CLARK, A. G. Mutação e teoria neutral. In: _____. **Princípios de genética de populações**. 4. ed. Porto Alegre: Artmed, 2010c. cap. 4, p. 165-210.

HOY, M. A. Nuclear and extranuclear DNA in insects. In: _____. **Insect molecular genetics: an introduction to principles and applications**. San Diego: Academic Press, 2003. cap. 3, p. 50-75.

HUFBAUER, R. A.; RODERICK, G. K. Microevolution in biological control: mechanisms, patterns and processes. **Biological Control**, Orlando, v. 35, n. 3, p. 227–239, 2005.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA – IBGE (Rio de Janeiro, RJ). **Índice de nomes geográficos**. Rio de Janeiro, 2011. 1 Base Cartográfica Contínua do Brasil ao Milionésimo. Escala 1: 1.000.000.

INSTITUTO FLORESTAL. **Inventário Florestal da Vegetação Natural do Estado de São Paulo**. [S. l.]: Instituto Florestal, 2001. Disponível em: <<http://www.iflorestal.sp.gov.br/sifesp/index.htm>>. Acesso em: 23 nov. 2012.

JUNIOR, O. F. GPS Track Maker. Versão 13.8. [S. l.]: Geo Studio Technology Ltda, 2012. Disponível em: <<http://www.trackmaker.com>> Acesso em: 29 out. 2012.

KEHLMAIER, C.; ASSMANN, T. Molecular analysis meets morphology-based systematics - a synthetic approach for Chalarinae (Insecta: Diptera: Pipunculidae). **Systematic Entomology**, Oxford, v. 35, n. 1, p. 181–195, 2010.

LAVAGNINI, T. C. **Estudo do padrão de distribuição genético haplotípico de *Chrysoperla externa* (Neuroptera: Chrysopidae) em áreas de citros no estado de São Paulo**. 2011. 74 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Jaboticabal, 2011.

LEWONTIN, R. C. The apportionment of human diversity. **Evolutionary Biology**, New York, v. 6, p. 381-398, 1972.

LIBRADO, P.; ROZAS, J. DnaSP v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. **Bioinformatics**, Oxford, v. 25, n. 11, p. 1451-1452, 2009.

LOUZADA, J. M.; BEARZOTI, E.; CARVALHO, D. Avaliação e aplicação de testes para a detecção da autocorrelação espacial usando marcadores genéticos. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 30, n. 2, p. 206-213, 2006.

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

MANTEL, N. The detection of disease clustering and a generalized regression approach. **Cancer Research**, Baltimore, v. 27, n. 2 (part 1), p. 209-220, 1967.

McDERMOTT, J. M.; McDONALD, B. A. Gene flow in plant pathosystems. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 31, p. 353-73, 1993.

MILLER, M. P. Tools for population genetic analyses (TFPGA) 1.3: A Windows program for the analyses of allozyme and molecular population genetic data. [S. l.]: Software de computador distribuído pelo autor, 1997. Disponível em: <<http://www.marksgeneticssoftware.net/tfpga.htm>>. Acesso em: 17 jun. 2012.

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

MORALES, A. C.; LAVAGNINI, T. C.; FREITAS, S. Loss of genetic variability induced by agroecosystems: *Chrysoperla externa* (Hagen) (Neuroptera: Chrysopidae) as a case study. **Neotropical Entomology**, Londrina, v. 42, n. 1, p. 32–38, 2013.

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

NEI, M. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. **Genetics**, Austin, v. 89, n. 3, p. 583-590, 1978.

PAGE, R. D. M.; HOLMES, E. C. Measuring genetic change. In: _____. **Molecular Evolution: a phylogenetic approach**. Oxford: Blackwell Science, 1998. cap. 5, p. 135-171.

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

QUEIROZ, D. L.; ZANOL, K. M. R.; ANJOS, N. dos; ANDRADE, D. P. de. Dinâmica populacional de *Ctenarytaina spatulata* (Hemiptera: Psyllidae) em *Eucalyptus grandis* com novos registros de ocorrência. **Acta Biológica Paranaense**, Curitiba, v. 38, n. 3-4, p. 157-178, 2009.

RAMIRO, Z. A.; FARIA, A. M. de. Levantamento de insetos predadores nos cultivos de algodão Bollgard®DP90 e convencional Delta Pine Acala 90. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 73, n. 1, p. 119-121, 2006.

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

REED, D. H.; FRANKHAM, R. Correlation between fitness and genetic diversity. **Conservation Biology**, Boston, v. 17, n. 1, p. 230–237, 2003.

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

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

SLATKIN, M.; HUDSON, R. R. Pairwise comparisons of mitochondrial DNA sequences in stable and exponentially growing populations. **Genetics**, Austin, v. 129, n. 2, p. 555-562, 1991.

SMITH-CALDAS, M. R. B.; McPHERON, B. A.; SILVA, J. G.; ZUCCHI, R. A. Phylogenetic relationships among species of the *fraterculus* Group (*Anastrepha*: Diptera: Tephritidae) inferred from DNA sequences of mitochondrial cytochrome oxidase I. **Neotropical Entomology**, Londrina, v. 30, n. 4, p. 565-573, 2001.

SOUZA, G. A.; CARVALHO, M. R. O.; MARTINS, E. R.; GUEDES, R. N. C.; OLIVEIRA, L. O. de. Diversidade genética estimada com marcadores ISSR em populações brasileiras de *Zabrotes subfasciatus*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 43, n. 7, p. 843-849, 2008.

STEINMANN, H. The *Chrysopa* species (Neuroptera) of Hungary. **Annales historico-naturales Musei Nationales hungarici**, Budapest, v. 56, p. 257-266, 1964.

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

TAMURA, K.; PETERSON, D.; PETERSON, N.; STECHER, G.; NEI, M.; KUMAR, S. MEGA 5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. **Molecular Biology and Evolution**, Chicago, v. 28, n. 10, p. 2731-2739, 2011.

TAYLOR, S. J.; DOWNIE, D. A.; PATERSON, I. D. Genetic diversity of introduced populations of the water hyacinth biological control agent *Eccritotarsus catarinensis* (Hemiptera: Miridae). **Biological Control**, Orlando, v. 58, n. 3, p. 330-336, 2011.

TECHNELYSIUM PTY LTD. Chromas Lite. Version 2.01. [S. I.]: Technelysium Pty Ltd., 2005. Disponível em: <http://www.technelysium.com.au /chromas_lite.html>. Acesso em: 30 jul. de 2011.

TEMPLETON, A. R. Statistical phylogeography: methods of evaluating and minimizing inference errors. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 13, n. 4, p. 789-809, 2004.

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

VELONÀ, A.; LUCHETTI, A.; GHESINI, S.; MARINI, M.; MANTOVANI, B. Mitochondrial and nuclear markers highlight the biodiversity of *Kaloterme flavicollis* (Fabricius, 1793) (Insecta, Isoptera, Kalotermitidae) in the Mediterranean area. **Bulletin of Entomological Research**, Farnham Royal, v. 101, n. 3, p. 353-364, 2011.

VELU, D.; PONNUVEL, K. M.; MUTHULAKSHMI, M.; SINHA, R. K.; QADRI, S. M. H. Analysis of genetic relationship in mutant silkworm strains of *Bombyx mori* using inter simple sequence repeat (ISSR) markers. **Journal of Genetics and Genomics**, Peiping, v. 35, n. 5, p. 291-297, 2008.

WELLS, M. M. Small genetic distances among populations of green lacewings of the genus *Chrysoperla* (Neuroptera: Chrysopidae). **Annals of the Entomological Society of America**, College Park, v. 87, n. 6, p. 737-744, 1994.

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

WRIGHT, S. Genetic variability in natural populations methods. In: _____. **Evolution and the genetics of populations: variability within and among natural populations**. Chicago: The University of Chicago Press, 1978. cap. 3, p. 78- 103.

YEH, F. C.; CHONG, D. K. X.; YANG, R. C. RAPD variation within and among natural populations of trembling aspen (*Populus tremuloides* Michx.) from Alberta. **Journal of Heredity**, Washington, v. 86, n. 6, p. 454-460, 1995.

YEH, F.; YANG, R.; BOYLE, T. POPGENE: population genetic analysis. Versão 1.32. [S. l.]: Molecular Biology and Biotechnology Center, University Alberta; Center for International Forestry Research, 1999. Disponível em: <http://www.ualberta.ca/~fyeh/popgene_download.html>. Acesso em: 12 nov. 2011.

CAPÍTULO 3 - Evidência de estrutura genética em populações de *Chrysoperla externa* (Hagen, 1861) (Neuroptera: Chrysopidae)

Nara C. C. P. Barbosa¹, Sérgio de Freitas^{1,3}, Adriana C. Morales^{1,2}

¹ Departamento de Fitossanidade, Universidade Estadual Paulista 'Júlio de Mesquita Filho', Via de Acesso Prof. Paulo Donato Castellane s/n, 14884-900 - Jaboticabal, SP. barbosa.naracristina@gmail.com

² Departamento de Biologia Aplicada à Agropecuária, Universidade Estadual Paulista 'Júlio de Mesquita Filho', Via de Acesso Prof. Paulo Donato Castellane s/n, 14884-900 - Jaboticabal, SP. dri_morales@fcav.unesp.br

³ *in memoriam*

RESUMO - Crisopídeos são insetos generalistas, sendo a espécie *Chrysoperla externa* considerada um potencial agente de controle biológico. Nos agroecossistemas, os espécimes são expostos às condições distintas e a capacidade de suportá-las está diretamente associada com a variabilidade genética da espécie. A introdução de espécimes em ambientes exóticos e a manutenção em condições de laboratório podem ocasionar a perda de variabilidade, principalmente por efeitos de deriva genética. Nosso objetivo foi analisar através do marcador ISSR, a variabilidade genética nas populações de *C. externa* estabelecidas em áreas de vegetação nativa e agroecossistemas e compará-la a uma linhagem mantida em laboratório sob forte endogamia, a fim de testar os efeitos da deriva genética e gargalo populacional. Foi observada a existência de estrutura genética, diferenciando três grupos: nativo, agroecossistemas e laboratório. As populações nativas apresentaram o número de polimorfismos mais elevado, entretanto os índices de diversidade não diferiram significativamente entre os grupos, indicando um isolamento recente entre as populações. A geração parental apresentou maior polimorfismo que F2, porém com índices de diversidade não significativos. O maior polimorfismo nas áreas de vegetação nativa sugere perda de alelos nos agroecossistemas decorrente de gargalo populacional e efeito fundador, porém com a manutenção da heterozigosidade devido ao rápido crescimento populacional nas áreas agrícolas. As áreas nativas apresentaram baixo fluxo gênico com a matriz. Assim, é necessária a preservação de áreas nativas próximas aos agroecossistemas e de corredores que liguem os remanescentes, de modo a impedir que os efeitos da deriva genética afetem a adaptabilidade dos espécimes nas áreas agrícolas.

Palavras-chave:

Agroecossistema, criação massal, crisopídeos, ISSR, variabilidade genética, vegetação nativa

Introdução

A espécie *Chrysoperla externa* (Hagen, 1861) é considerada um predador generalista, os quais são potenciais agentes de controle biológico, especialmente por sua alta capacidade de predação, elevado potencial reprodutivo e por serem

multiplicados com sucesso em laboratório (FREITAS, 2001b). Possui ampla distribuição geográfica (BROOKS, 1994) e no Brasil esta espécie já foi registrada em ambientes naturais (ADAMS; PENNY, 1985; KUMAGAI, 2002; SOUZA; COSTA; LOUZADA, 2008) e também em agroecossistemas (FREITAS; PENNY, 2001). Em áreas agrícolas os espécimes são expostos às condições distintas ou adversas do novo ambiente e a capacidade de suportá-las está diretamente associada com a variabilidade genética da espécie (BAKER; LOXDALE; EDWARDS, 2003; REED; FRANKHAM, 2003; HUFBAUER; RODERICK, 2005).

A perda de variabilidade é um dos problemas associados à introdução de espécimes em ambientes exóticos e à manutenção em condições estáveis em laboratório (MACKAUER, 1976). Diversos fatores podem contribuir para a redução da variabilidade genética, entre eles o isolamento geográfico e a deriva genética. Quando um número baixo de espécimes migra para novas áreas ou são coletados para iniciar uma criação em laboratório, apenas uma parte da variabilidade contida na população é representada, configurando um gargalo populacional (NEI; MARUYAMA; CHAKRABORTY, 1975). Caso a população aumente rapidamente em número, a heterozigosidade poderá não diferir significativamente da população inicial, devido às novas mutações, podendo haver a perda de alguns alelos, em especial alelos raros; porém, em populações com baixo tamanho efetivo, os efeitos da deriva genética tendem a diminuir drasticamente a variabilidade genética (FUTUYMA, 2005a). As implicações da deriva genética são agravadas quando as populações se encontram isoladas, levando a diferenciação genética entre elas, uma vez que o fluxo gênico permite a homogeneização das populações (SLATKIN, 1987). Além disso, populações isoladas são mais endogâmicas, de modo que há maior formação de homozigotos e, conseqüentemente, a fixação de alelos e diminuição da heterozigosidade (FUTUYMA, 2005b).

Desse modo, estudos genéticos populacionais se fazem necessários, pois revelam dados históricos essenciais para entender o comportamento genético das populações frente à redução de áreas nativas, que constituem reservatórios de diversidade genética (MORALES; LAVAGNINI; FREITAS, 2013). Marcadores moleculares ISSR ("Inter Simple Sequence Repeat") tem sido amplamente utilizados em estudos de variabilidade genética e análises de estrutura populacional de insetos

(BORBA et al., 2005; ROUX et al., 2007; SOUZA et al., 2008; KEHLMAIER; ASSMANN, 2010; TAYLOR; DOWNIE; PATERSON, 2011). A partir de iniciadores constituídos de di-, tri- ou tetra-nucleotídeos, é gerado um grande número de bandas potencialmente polimórficas, sendo um método simples e com alta reprodutibilidade (WOLFE; LISTON, 1998). Assim, o objetivo deste trabalho foi analisar por meio do marcador ISSR, a variabilidade genética nas populações de *C. externa* estabelecidas em áreas de vegetação nativa e agroecossistemas e compará-la à variabilidade de uma linhagem estabelecida em laboratório sob forte endogamia e efeito fundador, a fim de testar os efeitos da deriva genética e gargalo populacional.

Material e Métodos

Áreas amostradas e coleta - Os espécimes de *C. externa* foram coletados no período de julho de 2006 a agosto de 2011, com auxílio de rede entomológica. Os insetos foram identificados com base nas características da morfologia externa (BROOKS; BARNARD, 1990), armazenados em álcool absoluto e mantidos em freezer no Laboratório de Biologia Molecular (LBM) do Departamento de Fitossanidade, FCAV. Foram amostrados 14 municípios do estado de São Paulo (Figura 1), sendo três pontos em áreas de vegetação nativa e 13 pontos de agroecossistemas (Tabela 1). Os espécimes coletados no Câmpus da FCAV/UNESP, em Jaboticabal, não foram incluídos nas amostras de agroecossistemas, pois constituíram a população inicial da criação em laboratório sendo, dessa forma, analisados juntamente com as gerações seguintes.

Criação em laboratório – Para a manutenção dos insetos em laboratório, foi adotada a metodologia de criação descrita por Freitas (2001a). Inicialmente, os machos e fêmeas coletados (parentais) foram mantidos na mesma unidade de criação, a fim de se obter cópulas aleatórias. Com indivíduos adultos da primeira geração (F1) foram formados casais individualizados, constituídos de fêmeas e machos virgens. O comportamento e a morfologia externa foram utilizados como critérios para a escolha dos indivíduos, sendo selecionados os insetos que mais se movimentavam dentro das unidades de criação, apresentando um comportamento

ativo, e que possuíam as características morfológicas típicas da espécie, sem deformidades. A segunda geração (F2), foi obtida do casal com maior número de posturas, sendo os insetos adultos sacrificados, armazenados em álcool absoluto e mantidos em freezer no LBM.

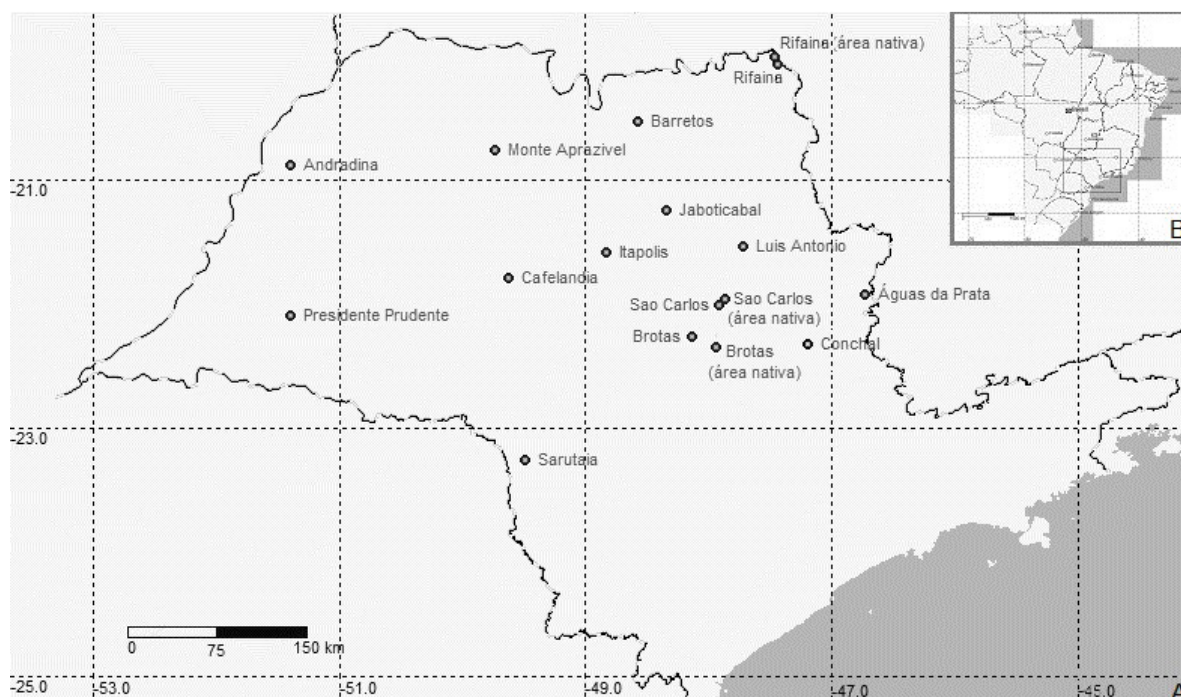


Figura 1. (A) Municípios amostrados no estado de São Paulo. (B) Mapa político do Brasil, com destaque para o estado de São Paulo. Os mapas foram confeccionados com o programa “GPS Track Maker” versão 13.8 (JUNIOR, 2012).

Extração do DNA total - O DNA total foi extraído a partir do tórax dos insetos através de “Wizard® Genomic DNA Purification Kit” (Promega), seguindo-se o protocolo fornecido pelo fabricante. As demais partes (cabeça, asas e abdômen) foram armazenadas em álcool absoluto e mantidas em freezer no LBM, recebendo um número próprio de identificação (Tabela 1). As amostras de DNA, com numeração correspondente, foram armazenadas em freezer no LBM.

Tabela 1. Municípios amostrados e respectivas coordenadas geográficas, tipo de vegetação nos pontos amostrados, número de indivíduos analisados (n), número de identificação dos espécimes (“voucher”) e data de coleta.

Municípios	tipo de vegetação	n	Coordenadas geográficas*		“voucher”	Data de coleta
			Latitude	Longitude		
AP	café	08	-21:56:13	-46:43:01	143-146, 885-888	VIII. 07
AN	pastagem	08	-20:53:45	-51:22:44	75-78, 875-878	VIII.06
BA	citros	07	-20:33:25	-48:34:04	123-125, 892, 895-897	VIII.06 - XI.06
BR	eucalipto	08	-22:17:02	-48:07:37	898-905	XII.07-V.08
CA	citros	08	-21:48:10	-49:36:36	79, 81, 82, 1017-1021	XI.06-XII.06
CO	citros	07	-22:19:48	-47:10:22	91-94, 908, 909, 913	X.06
IT	citros	08	-21:35:45	-48:48:46	147-150, 1063-1066	VIII.06-XI.06
LA	citros	08	-21:33:18	-47:42:14	103-106, 921-924	I.07
MA	citros	08	-20:46:22	-49:42:50	99-102, 927-930	II.05 - VII.07
PP	café/eucalipto	08	-22:07:33	-51:23:20	787, 788, 791, 792, 794-797	VIII.06-III.07
RI	café	02	-20:04:51	-47:25:15	987, 988	XI.07
SC	citros	07	-22:01:04	-47:53:27	1119-1124, 1126	X.06
SA	citros	08	-23:16:22	-49:28:48	968-975	VII.06
BR	vegetação nativa	43	-22:19:59	-47:55:60	1292-1334	XI.07-IV.08
RI	vegetação nativa	34	-20:00:29	-47:27:59	394, 728-730, 978-986, 1335-1355	IV.08
SC	vegetação nativa	50	-21:57:42	-47:50:28	1241-1291	VIII.07 - VI.08
JÁ			-21:15:22	-48:18:58		
(PAR)	milheto	13			1356-1368	VIII.11
(F1)		02			1369, 1370	
(F2)		30			1393, 1451, 1453, 1457, 1458, 1464, 1465, 1466, 1471, 1477, 1479, 1483, 1484, 1487, 1488, 1492, 1493, 1497, 1498, 1501, 1502, 1511, 1516, 1523, 1526, 1528, 1529, 1533, 1537, 1538	

*Fonte: Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística – IBGE (2011)

AP = Águas da Prata; AN = Andradina; BA = Barretos; BR = Brotas; CA = Cafelândia; CO = Conchal; IT = Itápolis; JÁ = Jaboticabal; LA = Luís Antônio; MA = Monte Aprazível; PP = Presidente Prudente; RI = Rifaina; SC = São Carlos; SA = Sarutaiá; PAR = Parental; F1 = primeira geração; F2 = segunda geração.

Escolha dos “primers” e amplificação – Os testes de amplificação foram realizados com os 100 iniciadores ISSR pertencentes ao conjunto 9 da “University of British Columbia” (UBC Set#9). Inicialmente os “primers” foram agrupados de acordo com a semelhança das sequências e a temperatura de desnaturação (T_m). As temperaturas de anelamento (T_a) foram definidas por um intervalo de temperatura que abrangia desde a maior T_m até 5 °C abaixo da menor T_m contida em cada grupo de “primer”. Três espécimes de diferentes localidades, escolhidos aleatoriamente, foram utilizados para efetuar os testes de amplificação. Foram selecionados oito “primers” que geraram bandas polimórficas, sendo realizados novos testes de padronização, a fim de adequar a concentração dos componentes da PCR e a temperatura de anelamento. As reações de PCR foram realizadas em termociclador “Mastercycler®” (“Eppendorf”) em um volume final de 25 µL, sendo 5 µL de 5X “Green GoTaq® Flexi Buffer” (Promega), 1 mM de $MgCl_2$, 0,2 mM de cada dNTP, 0,2

μ M de “primer”, 1 u de “GoTaq[®] DNA Polimerase” (Promega) e 2 μ L de DNA total (~30 ng). Foram utilizadas as condições de amplificação descritas por Souza et al. (2008), com adaptações: desnaturação inicial à 94 °C por 5 min, seguida por 35 ciclos de 45 s à 94 °C, 45 s para cada uma das temperaturas contidas num intervalo específico por “primer” (Tabela 2), 1 min e 50 s à 72 °C e uma etapa de extensão final de 72 °C por 7 min. Os produtos foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 2%, corados com brometo de etídio (1 ng/mL) e visualizados em luz ultravioleta. As imagens foram registradas com o programa Gel Doc 2000 – “Gel Documentation System” (Bio-Rad).

Tabela 2. Temperatura de anelamento específica por “primer” ISSR e sequência de nucleotídeos.

“Primer”	Sequência (5' – 3')	Temperatura de anelamento (°C)
UBC 809	AGA GAG AGA GAG AGA GG	44 - 46 - 48 - 50 - 52
UBC 820	GTG TGT GTG TGT GTG TC	47 - 49 - 51 - 53 - 55 - 57
UBC 836	AGA GAG AGA GAG AGA GYA	36 - 38 - 40 - 42 - 44 - 46 - 48
UBC 849	GTG TGT GTG TGT GTG TYA	47 - 49 - 51 - 53 - 55 - 57
UBC 856	ACA CAC ACA CAC ACA CYA	47 - 49 - 51 - 53 - 55 - 57
UBC 880	GGA GAG GAG AGG AGA	42 - 44 - 46 - 48
UBC 886	VDV CTC TCT CTC TCT CT	36 - 38 - 40 - 42 - 44 - 46 - 48
UBC 891	HVH TGT GTG TGT GTG TG	44 - 46 - 48 - 50 - 52

Análise dos dados – Uma matriz binária de ausência (0) e presença (1) de bandas foi construída, sendo o tamanho dos fragmentos estimado com base no marcador de peso molecular 1 kb. Apenas bandas de fácil visualização foram consideradas para a análise, enquanto bandas menos intensas e de baixa reprodutibilidade foram descartadas. A fim de evitar que locus fossem excluídos devido à ausência de dados para alguns espécimes, as análises foram realizadas separadamente por “primer”, de modo que os indivíduos fossem excluídos apenas para esses locus em falta, permanecendo no restante da análise. Os espécimes que apresentaram o mesmo conjunto de bandas foram considerados geneticamente iguais, sendo este padrão de bandamento interpretado como o haplótipo descrito por outros marcadores moleculares. O número de locus polimórficos (NLP); porcentagem de locus polimórficos (P) e índice de diversidade genética de Shannon (I) (LEWONTIN, 1972) foram estimados com o programa POPGENE versão 1.32 (YEH; YANG; BOYLE, 1999). A heterozigosidade observada (H_o), estimada com base na frequência de

homozigotos recessivos (ausência da banda) e o índice de diversidade de Nei (1978) (H_e), o qual corresponde a heterozigosidade esperada corrigida para populações com baixo tamanho amostral ($n < 50$), foram gerados com o programa TFPGA versão 1.3 (MILLER, 1997). Os valores obtidos foram confrontados por meio do teste de comparação de médias Scott e Knott (1974) com o programa SISVAR versão 5.3 (FERREIRA, 2011). O programa POPGENE versão 1.32 (YEH; YANG; BOYLE, 1999) foi utilizado também para calcular a diversidade genética total (H_T), bem como dentro (H_S) e entre as populações (D_{ST}); o coeficiente global de diferenciação genética (G_{ST}), que expressa a proporção da variabilidade contida entre as populações e o número de migrantes (N_m). A distância, em linha reta, entre os municípios amostrados foi estimada por meio do aplicativo “Google Earth” versão 7.0.1.8244 (GOOGLE, 2013) e a correlação entre a distância geográfica e a distância genética corrigida de Nei (1978), foi obtida por meio do teste de Mantel (1967), através do programa TFPGA versão 1.3 (MILLER, 1997). A Análise de Variância Molecular (AMOVA) e os testes de neutralidade D de Tajima (TAJIMA, 1989) e F_s de Fu (FU, 1997) foram obtidos por meio do programa Arlequin versão 3.5.1.3 (EXCOFFIER; LISCHER, 2010). Com o programa Network versão 4.6.1.1 (FLUXUS TECHNOLOGY LTD, 2012), foram construídas redes baseadas no padrão de bandejamento dos indivíduos, segundo os algoritmos “Reduced Median” (BANDELT et al., 1995) e “Median Joining” (BANDELT; FORSTER; RÖHL, 1999). Os clados foram aninhados segundo a metodologia de Templeton, Boerwinkle e Sing (1987) e a correlação com a localização geográfica dos indivíduos foi analisada por meio do programa GeoDis versão 2.6 (POSADA; CRANDALL; TEMPLETON, 2000), sendo os índices significativos, ao nível de 5%, testados na chave de inferência filogenética (TEMPLETON, 2004) disponibilizada pelo mesmo programa ([darwin.uvigo.es/ software/geodis.html](http://darwin.uvigo.es/software/geodis.html)).

Resultados

Os “primers” produziram em média 25 bandas, totalizando 201 fragmentos polimórficos que variaram de 150 a 3000 bp (Figura 2). Dentre os 146 fragmentos observados em populações de agroecossistemas, 22 foram exclusivos destas

populações e das 160 bandas presentes nas populações de áreas nativas, 27 não apareceram nos espécimes dos demais grupos. Em relação aos insetos mantidos em laboratório, 13 fragmentos foram restritos a esse grupo.

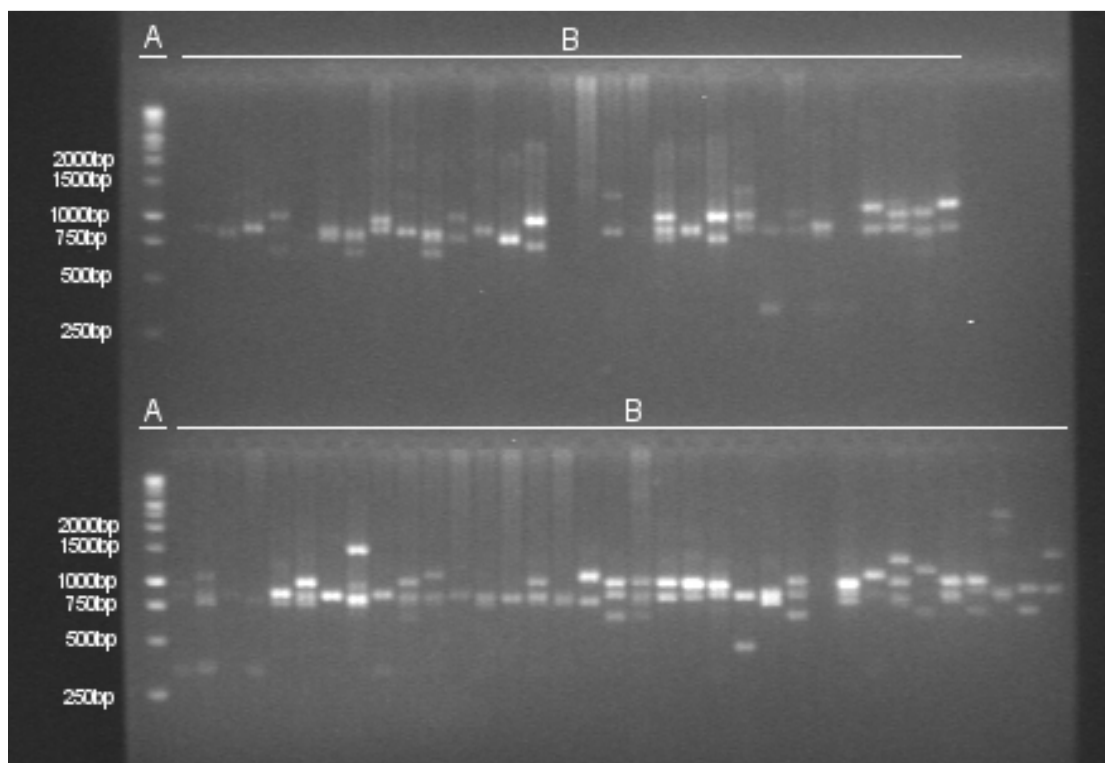


Figura 2. Exemplo de bandas de ISSR em gel de agarose 2%. A: marcador de peso molecular 1 kb. B: bandas amplificadas nas populações de *C. externa* para o “primer” UBC 849.

O número de locus polimórficos (NLP) e a porcentagem de locus polimórficos (P) foram significativamente superiores ($p < 0,05$) nas populações de áreas nativas (NLP = 102,67; P = 49,55) em relação aos agroecossistemas (NLP = 46,92; P = 24,34). Dentre as populações de agroecossistemas, o município de Brotas apresentou os maiores valores para os índices detectores de polimorfismos, assemelhando-se às populações coletadas em áreas nativas (Tabela 3). Houve uma redução de 32 locus polimórficos dos espécimes da geração parental para a segunda geração (F2).

Os índices de diversidade genética de Shannon (I), heterozigosidade observada (H_o) e diversidade genética de Nei (H_e) não diferiram significativamente ($p > 0,05$) entre as populações coletadas em agroecossistemas (I = 0,094; H_o = 0,061 e H_e = 0,067) e áreas nativas (I = 0,116; H_o = 0,064 e H_e = 0,066).

Entretanto, a população de agroecossistema em Brotas apresentou índices significativamente superiores a todas às demais (Tabela 3).

Tabela 3. Índices de diversidade nas populações de *C. externa*.

Grupo	n	Municípios	NLP	P (%)	Ho	He	I
Agroecossistema	08	AP	32 a	20,78 b	0,05632 a	0,06272 b	0,06777 a
	08	AN	57 a	28,36 b	0,05956 a	0,06514 b	0,09890 a
	07	BA	46 a	25,55 b	0,06711 a	0,07591 b	0,09519 a
	08	BR	94 b	46,77 d	0,11976 b	0,12902 c	0,19416 b
	08	CA	50 a	24,87 b	0,05615 a	0,06092 b	0,09214 a
	07	CO	41 a	20,40 b	0,05417 a	0,05889 b	0,08710 a
	08	IT	35 a	19,44 b	0,05188 a	0,05640 b	0,07234 a
	08	LA	46 a	22,88 b	0,04736 a	0,05076 b	0,08026 a
	08	MA	53 a	26,37 b	0,05670 a	0,06062 b	0,09437 a
	08	PP	45 a	22,39 b	0,05944 a	0,06370 b	0,09524 a
	02	RI	14 a	9,46 a	0,04160 a	0,05545 b	0,04556 a
	07	SC	55 a	27,36 b	0,06766 a	0,07296 b	0,11060 a
	08	SA	42 a	20,89 b	0,05096 a	0,05489 b	0,08325 a
Área nativa	43	BR	115 c	57,21 d	0,07181 a	0,07347 b	0,13024 a
	34	RI	81 b	40,30 c	0,05349 a	0,05501 b	0,09484 a
	50	SC	112 c	55,72 d	0,06722 a	0,06879 b	0,12342 a
Criação em laboratório	13	PAR	77 b	38,31 c	0,06995 a	0,07426 b	0,11990 a
	02	F1	11 a	6,39 a	0,02668 a	0,03558 a	0,03411 a
	30	F2	45 a	25,00 b	0,06004 a	0,06126 b	0,08404 a
Média (agroecossistemas)			46,92 a	24,34 a	0,06067 a	0,06672 a	0,09361 a
Média (nativo)			102,67 b	49,55 b	0,06417 a	0,06576 a	0,11617 a
Média (total)			55,31	28,34	0,05989	0,06504	0,09492

n = número de espécimes amostrados; NLP = Número de locus polimórficos; P = Porcentagem de locus polimórficos; Ho = Heterozigiosidade observada; He = Índice de diversidade de Nei (1978); I - Índice de diversidade genética de Shannon. Letras diferentes na mesma coluna indicam diferenças ao nível de significância de 5%.

A diversidade genética total (H_T) foi de 0,0816, sendo 0,0606 correspondentes a diversidade genética dentro das populações (H_S) e 0,0210 entre as populações (D_{ST}). O coeficiente global de diferenciação genética (G_{ST}) foi de 0,2570 e o número médio de migrantes (N_m) 1,5457.

A AMOVA apontou a existência de estrutura genética, evidenciando diferença significativa entre os grupos (nativo, agroecossistema e laboratório) para cinco dos oito “primers”, sendo o valor médio de F_{CT} para os “primers” significativos igual a 0,07956 (Tabela 4). Houve também diferença significativa entre as populações dentro dos grupos e dentro das populações, observando-se valores médios de 0,11780 e 0,18793, para F_{SC} e F_{ST} , respectivamente. A principal fonte de variação foi observada dentro das populações, em média 82,22%, seguida por 11,94% dentro dos grupos e 5,84% entre os grupos (Tabela 4).

Tabela 4. Análise da variância molecular (AMOVA) para as populações de *C. externa* para os diferentes “primers” e índices de fixação.

“Primer”	Porcentagem de variação (%)			F_{ST}	F_{SC}	F_{CT}
	Dentro das populações	Entre as populações dentro dos grupos	Entre os grupos			
UBC 809	88,57	8,16	3,27	0,11432*	0,08440*	0,03268
UBC 820	81,18	22,45	-3,63	0,18817*	0,21664*	-0,03634
UBC 836	76,60	15,66	7,74	0,23397*	0,16969*	0,07741*
UBC 849	80,55	10,34	9,12	0,19454*	0,11374*	0,09117*
UBC 856	85,89	6,75	7,36	0,14114*	0,07290*	0,07361*
UBC 880	78,80	13,09	8,11	0,21195*	0,14240*	0,08110*
UBC 886	84,20	8,35	7,45	0,15804*	0,09026*	0,07450*
UBC 891	82,01	10,71	7,27	0,17986*	0,11554*	0,07272
Média	82,22	11,94	5,84	0,18793**	0,11780**	0,07956**

F_{ST} = covariância entre indivíduos dentro das populações; F_{SC} : covariância entre populações dentro de um grupo e F_{CT} : covariância entre grupos. * Índices significativos, ao nível de nível de 5%. ** Média entre os valores significativos.

A distância genética observada entre todas as populações foi pequena, variando de 0,0032 (Cafelândia e Monte Aprazível) a 0,0702 (Luís Antônio e F1). O teste de Mantel revelou uma discreta correlação positiva ($r = 0,0700$; $P = 0,6790$) entre as matrizes de distância genética e geográfica (Tabela 5).

A análise de clados aninhados (NCPA) foi efetuada para todos os “primers” utilizados neste trabalho. Embora alguns deles não tenham sido significativos no maior nível hierárquico, todos os “primers” apresentaram clados com valores significativos nos demais níveis, conforme descrito na Tabela 6. Ao maior nível (clados de nível 4), as redes expostas nas Figuras 3, 4 e 5 indicaram a ocorrência de fluxo gênico restrito por isolamento geográfico, enquanto a rede da Figura 6 apontou fluxo gênico restrito, porém com alguma dispersão à longa distância. Já as redes correspondentes às Figuras 7 e 8 indicaram expansão em áreas contíguas ao maior nível (clados de nível 4 e 5, respectivamente). Nas demais redes, ao maior nível hierárquico, sendo o clado de nível 4 na Figura 9 e de nível 3 na Figura 10, não foi possível rejeitar a hipótese nula de não associação geográfica. Nos níveis hierárquicos menores (clados de nível 1, 2 e 3) em todas as redes, foram observadas semelhanças entre os eventos ocorridos e as populações envolvidas. Populações advindas de áreas nativas ou de municípios mais distantes dos demais pontos amostrais, como Presidente Prudente e Sarutaiá, apareceram associados a eventos de fluxo gênico restrito, enquanto a ocorrência de expansão em áreas

Tabela 5. Distância genética entre as populações de *C. externa* (diagonal inferior) e distância geográfica (Km) entre os municípios (diagonal superior).

	Agroecossistema													Nativo			Laboratório		
	AP	AN	BA	BR	CA	CO	IT	LA	MA	PP	RI	SC	SA	BR	RI	SC	P	F1	F2
AP		492,25	247,95	150,86	300,30	64,16	219,84	110,89	337,79	482,71	220,16	121,40	319,80	133,10	224,80	116,40	183,00	183,00	183,00
AN	0,0116		293,49	369,95	209,44	462,93	279,33	389,45	174,39	137,14	422,36	381,80	329,29	391,60	421,30	386,00	320,20	320,20	320,20
BA	0,0099	0,0199		198,36	175,26	247,06	120,80	145,66	120,90	338,31	130,25	177,50	316,23	207,70	129,50	175,90	82,40	82,40	82,40
BR	0,0122	0,0156	0,0036		162,75	98,32	103,21	91,58	234,78	335,55	254,88	38,490	176,57	20,60	257,80	45,80	114,90	114,90	114,90
CA	0,0127	0,0124	0,0058	0,0101		258,86	86,39	199,72	115,84	185,90	297,06	179,19	163,91	183,20	298,80	184,00	147,80	147,80	147,80
CO	0,0142	0,0216	0,0115	0,0127	0,0100		187,88	101,89	314,52	434,26	253,06	82,18	257,81	78,20	257,70	79,70	169,00	169,00	169,00
IT	0,0182	0,0199	0,0123	0,0098	0,0121	0,0108		114,80	132,07	272,03	221,74	105,69	197,23	122,20	224,60	108,30	63,70	63,70	63,70
LA	0,0143	0,0229	0,0220	0,0214	0,0197	0,0147	0,0114		225,71	386,02	166,06	53,55	264,14	90,50	172,60	48,50	71,70	71,70	71,70
MA	0,0166	0,0158	0,0045	0,0085	0,0032	0,0122	0,0116	0,0253		227,64	250,15	233,61	281,98	256,10	248,00	235,70	153,80	153,80	153,80
PP	0,0259	0,0271	0,0086	0,0133	0,0089	0,0157	0,0177	0,0276	0,0059		468,44	359,61	234,61	356,80	468,70	365,30	332,40	332,40	332,40
RI	0,0365	0,0282	0,0283	0,0226	0,0160	0,0262	0,0219	0,0317	0,0191	0,0249		220,76	413,83	255,70	8,60	213,70	159,70	159,70	159,70
SC	0,0145	0,0190	0,0158	0,0148	0,0145	0,0155	0,0167	0,0194	0,0189	0,0229	0,0108		214,60	36,30	226,90	7,60	95,30	95,30	95,30
SA	0,0092	0,0178	0,0157	0,0155	0,0138	0,0126	0,0131	0,0108	0,0168	0,0253	0,0152	0,0082		190,20	413,70	221,20	254,30	254,30	254,30
BR	0,0132	0,0138	0,0115	0,0125	0,0108	0,0122	0,0080	0,0174	0,0157	0,0268	0,0193	0,0135	0,0099		261,20	42,80	126,00	126,00	126,00
RI	0,0089	0,0130	0,0079	0,0118	0,0082	0,0152	0,0095	0,0192	0,0124	0,0225	0,0151	0,0123	0,0109	0,0078		219,80	164,20	164,20	164,20
SC	0,0099	0,0148	0,0085	0,0105	0,0069	0,0125	0,0111	0,0215	0,0102	0,0214	0,0163	0,0143	0,0116	0,0043	0,0063		91,80	91,80	91,80
P	0,0099	0,0142	0,0155	0,0119	0,0125	0,0151	0,0167	0,0247	0,0125	0,0222	0,0203	0,0181	0,0137	0,0085	0,0113	0,0072		0,00	0,00
F1	0,0677	0,0507	0,0558	0,0518	0,0575	0,0591	0,0558	0,0702	0,0529	0,0635	0,0638	0,0610	0,0565	0,0457	0,0528	0,0483	0,0380		0,00
F2	0,0170	0,0162	0,0142	0,0116	0,0133	0,0200	0,0153	0,0275	0,0126	0,0237	0,0253	0,0235	0,0177	0,0090	0,0119	0,0097	0,0103	0,0386	

AP = Águas da Prata; AN = Andradina; BA = Barretos; BR = Brotas; CA = Cafelândia; CO = Conchal; IT = Itápolis; LA = Luís Antônio; MA = Monte Aprazível; PP = Presidente Prudente; RI = Rifaina; SC = São Carlos; SA = Sarutaiá; P = Parental; F1 = primeira geração; F2 = segunda geração.

contíguas se relacionou aos espécimes coletados em agroecossistemas geograficamente próximas (Tabela 6 e Figuras 3 a 10).

Tabela 6. Análise de Clados Aninhados. Clados que apresentaram valores de D_c , D_n ou I-T significativos (ao nível de 5%) com respectivos clados constituintes, populações envolvidas e eventos diagnosticados.

"Primer"	Clados significativos	Clados constituintes/ Relação I-T	Populações envolvidas	Evento diagnosticado
UBC 809	2-5	I-T	AN, BA, SC, BRn, Lab	EXP
	2-6	1-25	PP	FGR-D
		I-T	BA, BR, LA, PP, Lab	
		1-36	BRn, SCn	
	2-16	1-46	BRn, SCn, Lab	FGR-I
		I-T	BRn, SCn, Lab	
	2-17	1-47	SCn	FGR-I
	3-2	2-13	SCn	FGR-I
		2-6	BA, BR, LA, PP, Lab	
	3-3	2-7	BR, LA	EXP
		I-T	BA, BR, LA, PP, Lab	
		2-1	AN, RI, SA, BRn, SCn, Lab	
		2-2	CA, IT, SC	
	3-4	2-4	AN, SA, Rln	FGR-I
		2-8	BRn, SCn, Lab	
		2-9	AP, AN, MA, PP, BRn, SCn	
		3-2	BRn, Rln, SCn, Lab	
	4-1	I-T	AP, AN, BA, BR, CA, CO, IT, LA, MA, PP, RI, SC, SA, BRn, Rln, SCn, Lab	FGR-I
UBC 820	2-12	1-40	RI, BRn, Rln, SCn	FGR-I
		I-T	IT, RI, BRn, Rln, SCn, Lab	
		2-3	AN, BA, BR, CA, MA, PP, SC, Rln, SCn, Lab	
	3-1	I-T	AN, BA, BR, CA, CO, IT, MA, PP, SC, BRn, Rln, SCn, Lab	EXP
	3-4	2-12	IT, RI, BRn, Rln, SCn, Lab	FGR-I
		I-T	BR, IT, RI, SC, BRn, Rln, SCn, Lab	
		3-2	CO, IT, LA, RI, SC, SA, BRn, Rln	
	4-1	3-3	AN, BRn, Rln, SCn, Lab	EXP
UBC 836		3-4	BR, IT, RI, SC, BRn, Rln, SCn	
	2-5	1-12	Lab	FGR-I
		I-T	AN, CA, LA, MA, BRn, SCn, Lab	
		1-14	BRn, Rln	
	2-7	1-19	CA, IT, LA, BRn, Rln, SCn, Lab	EXP
		I-T	BA, BR, CA, IT, LA, BRn, Rln, SCn, Lab	
	2-12	1-28	SCn	FGR-I
	3-1	2-4	CO, BRn	EXP
		2-1	BRn, SCn	
		2-5	AN, CA, LA, MA, BRn, SCn, Lab	
	3-4	2-13	BRn, Rln	FGR-D
		I-T	AP, AN, BA, BR, CA, CO, LA, MA, PP, SC, SA, BRn, Rln, SCn, Lab	
		3-1	CO, MA, BRn, Rln, Lab	
		3-2	BA, BR, CA, IT, LA, BRn, Rln, SCn, Lab	
	4-1	3-4	AP, AN, BA, BR, CA, CO, LA, MA, PP, SC, SA, BRn, Rln, SCn, Lab	FGR-D
		I-T	AP, AN, BA, BR, CA, CO, IT, LA, MA, PP, RI, SC, SA, BRn, Rln, SCn, Lab	

(continua)

(Tabela 6. continuação)

"Primer"	Clados significativos	Clados constituintes/ Relação I-T	Populações envolvidas	Evento diagnosticado
UBC 849	1-14	XVII	AN, BA, BR, CA, CO, IT, LA, MA, PP, Rln, SCn, Lab	FGR-I
		XXV	CA, IT	
		I-T	AN, BA, BR, CA, CO, IT, LA, MA, PP, Rln, SCn, Lab	
	1-31	XXXIX	CA, CO	FGR-I
		XLIII	Lab	
	2-3	1-11	Lab	FGR-I
		1-13	LA, BRn, SCn, Lab	
	2-8	1-30	SCn	FGR-I
		1-31	CA, CO, BRn, SCn, Lab	
		I-T	CA, CO, MA, BRn, SCn, Lab	
	2-10	1-36	SA, Rln, Lab	EXP
		1-40	BRn, Rln	
	3-3	2-6	BRn, SCn, Lab	FGR-I
		3-3	BA, BR, CA, CO, IT, LA, MA, BRn, SCn, Lab	
	4-1	3-4	AP, AN, CA, RI, SC, SA, BRn, Rln, SCn, Lab	FGR-I
		I-T	AP, AN, BA, BR, CA, CO, IT, LA, MA, PP, RI, SC, SA, BRn, Rln, SCn, Lab	
UBC 856	2-2	1-5	BRn, Rln	EXP
		1-8	BRn, Rln	
	2-7	1-26	PP	EXP
		1-27	LA, BRn, SCn	
		I-T	LA, PP, BRn, SCn	
		1-25	AP, BRn, Rln	
	2-14	1-46	AN, MA, BRn, Rln, SCn, Lab	FGR-I
		I-T	AP, AN, BA, IT, LA, MA, SC, SA, BRn, Rln, SCn, Lab	
		2-1	AN, CA	
	3-1	2-2	BA, BR, CA, IT, MA, SC, BRn, Rln, SCn, Lab	EXP
		I-T	AN, BA, BR, CA, IT, MA, SC, BRn, Rln, SCn, Lab	
	3-2	2-6	SCn, Lab	FGR-D
		2-9	SCn, Lab	
		2-12	LA, BRn, Rln, SCn, Lab	
		2-13	AN, CA, Rln, SCn	
	4-1	3-1	AN, BA, BR, CA, IT, MA, SC, BRn, Rln, SCn, Lab	FGR-I
		3-2	AP, AN, BA, BR, CA, CO, IT, LA, MA, PP, SC, SA, BRn, Rln, SCn, Lab	
		I-T	AP, AN, BA, BR, CA, CO, IT, LA, MA, PP, SC, SA, BRn, Rln, SCn, Lab	
UBC 880	1-26	V	BRn	FGR-D
		VII	SA	
		XIII	Rln	
		XVI	BRn	
		XVII	LA	
		XVIX	SC, SCn	
	2-4	I-T	AP, LA, SC, SA, BRn, Rln, SCn, Lab	FGR-I
		1-6	LA, Lab	
	3-1	I-T	AN, BR, CA, CO, LA, MA, SA, Lab	EXP
		2-1	BR, MA, SC	
	3-3	2-2	MA, PP	FGR-D
		2-5	AN, CA, SA, BRn Rln	
		2-6	AP, LA, SC, BRn, SCn	

(continua)

(Tabela 6. continuação)

"Primer"	Clados significativos	Clados constituintes/ Relação I-T	Populações envolvidas	Evento diagnosticado
UBC 886	1-10	XI	IT	FGR-I
		XII	BRn, Rln	
		XVI	SA	
	2-1	XIX	Lab	EXP
		1-7	LA, MA, PP, RI, SA	
		1-8	BA, BR, CA, CO, IT, MA, PP, SC, SA, BRn, Rln, SCn, Lab	
		I-T	BA, BR, CA, CO, IT, LA, MA, PP, RI, SC, SA, BRn, Rln, SCn, Lab	
		1-3	BRn, Lab	
	2-2	1-5	PP	FGR-D
		1-10	IT, SA, BRn, Rln, Lab	
		I-T	AN, BA, BR, CA, CO, IT, LA, MA, PP, RI, SC, SA, BRn, Rln, SCn, Lab	
UBC 891	1-10	XIV	SA, Rln, SCn	FGR-I
		I-T	SA, BRn, Rln, SCn	
	1-18	LXXXVII	BA, SA	EXP
		I-T	AN, BA, MA, SA, BRn, Rln, Lab	
	1-32	CIX	SCn	FGR-I
		I-T	MA, PP, BRn, Rln, SCn, Lab	
	2-2	1-8	BRn	FGR-I
		1-19	Rln, Lab	
	2-6	1-22	BRn, Rln, SCn	FGR-I
		I-T	AN, BA, IT, MA, SC, SA, BRn, Rln, SCn, Lab	
	2-9	1-32	MA, PP, BRn, Rln, SCn, Lab	FGR-I
		I-T	BR, CA, IT, MA, PP, SC, BRn, Rln, SCn, Lab	
	2-12	1-40	AN, Rln, SCn, Lab	FGR-I
		I-T	AP, AN, BR, Rln, SCn, Lab	
	2-16	1-12	BRn	FGR-D
		1-13	Rln, SCn	
		I-T	BRn, Rln, SCn	
	2-17	1-11	SCn	FGR-I
		2-1	BRn, SCn	
	3-1	2-3	LA, SA, BRn, Rln, SCn, Lab	FGR-I
		I-T	BA, CA, CO, IT, LA, MA, SA, BRn, Rln, SCn, Lab	
	3-4	2-10	AN, BR, MA, Lab	FGR-I
		3-4	AP, AN, BR, CA, MA, PP, Rln, Lab	
	4-1	3-5	AP, AN, BR, MA, PP, SA, Rln, SCn, Lab	FGR-I
		I-T	AP, AN, BR, CA, MA, PP, SA, Rln, SCn, Lab	
	5-1	4-1	AP, AN, BR, CA, MA, PP, SA, Rln, SCn, Lab	EXP
		4-2	AP, AN, BA, BR, CA, CO, IT, LA, MA, PP, RI, SC, SA, BRn, Rln, SCn, Lab	
		I-T	AP, AN, BA, BR, CA, CO, IT, LA, MA, PP, RI, SC, SA, BRn, Rln, SCn, Lab	

AP = Águas da Prata (agroecossistema); AN = Andradina (agroecossistema); BA = Barretos (agroecossistema); BR = Brotas (agroecossistema); CA = Cafelândia (agroecossistema); CO = Conchal (agroecossistema); IT = Itápolis (agroecossistema); LA = Luís Antônio (agroecossistema); MA = Monte Aprazível (agroecossistema); PP = Presidente Prudente (agroecossistema); RI = Rifaina (agroecossistema); SC = São Carlos (agroecossistema); SA = Sarutaiá (agroecossistema); BRn = Brotas (nativo); Rln = Rifaina (nativo); SCn = São Carlos (nativo); Lab = Linhagem mantida em laboratório; FGR-I = Fluxo gênico restrito com isolamento por distância; FGR-D = Fluxo gênico restrito com alguma dispersão à longa distância; EXP = Expansão em áreas contíguas.

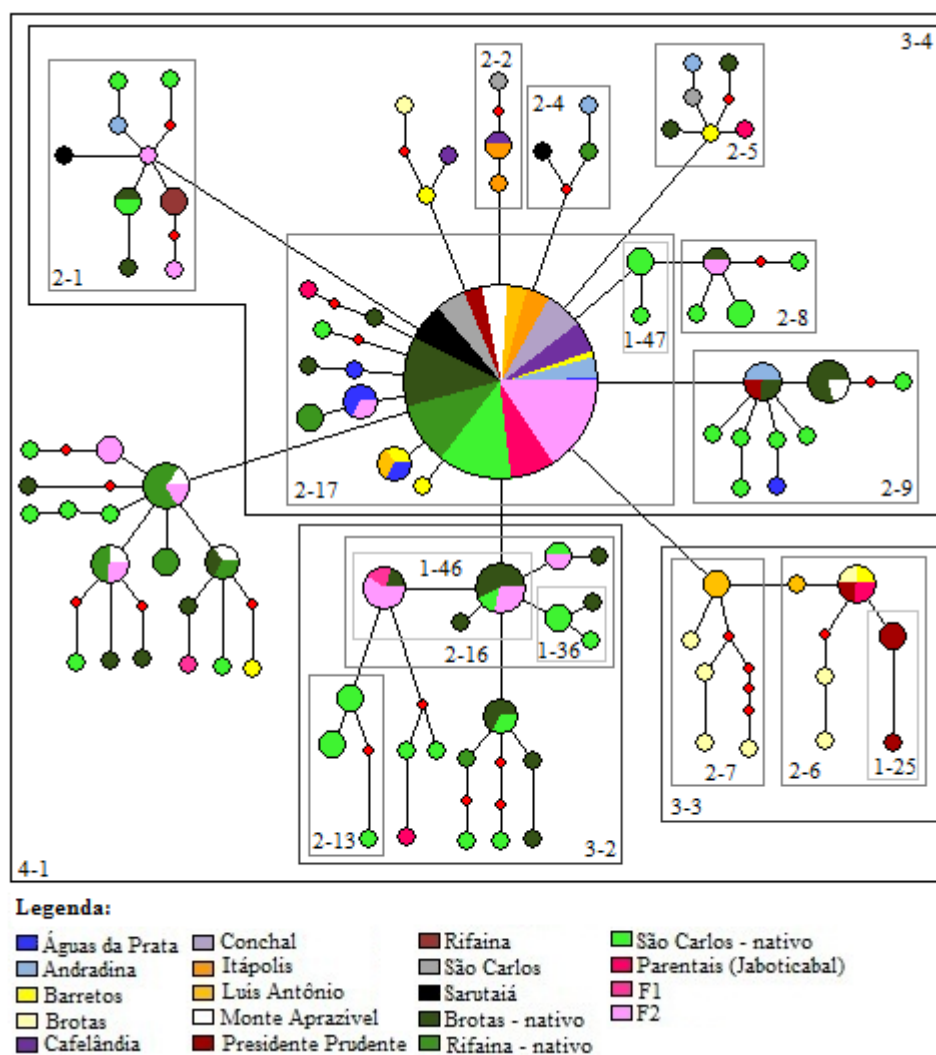


Figura 3. Rede baseada nos padrões de bandeamento obtidos pelo "primer" UBC 809. Os círculos representam os padrões de bandeamento, sendo seu tamanho indicativo da frequência destes. Os pontos vermelhos representam padrões de estado alélico hipotéticos e as linhas indicam a existência de passos mutacionais. Os clados destacados apresentaram valores significativos para D_c , D_n ou I-T.

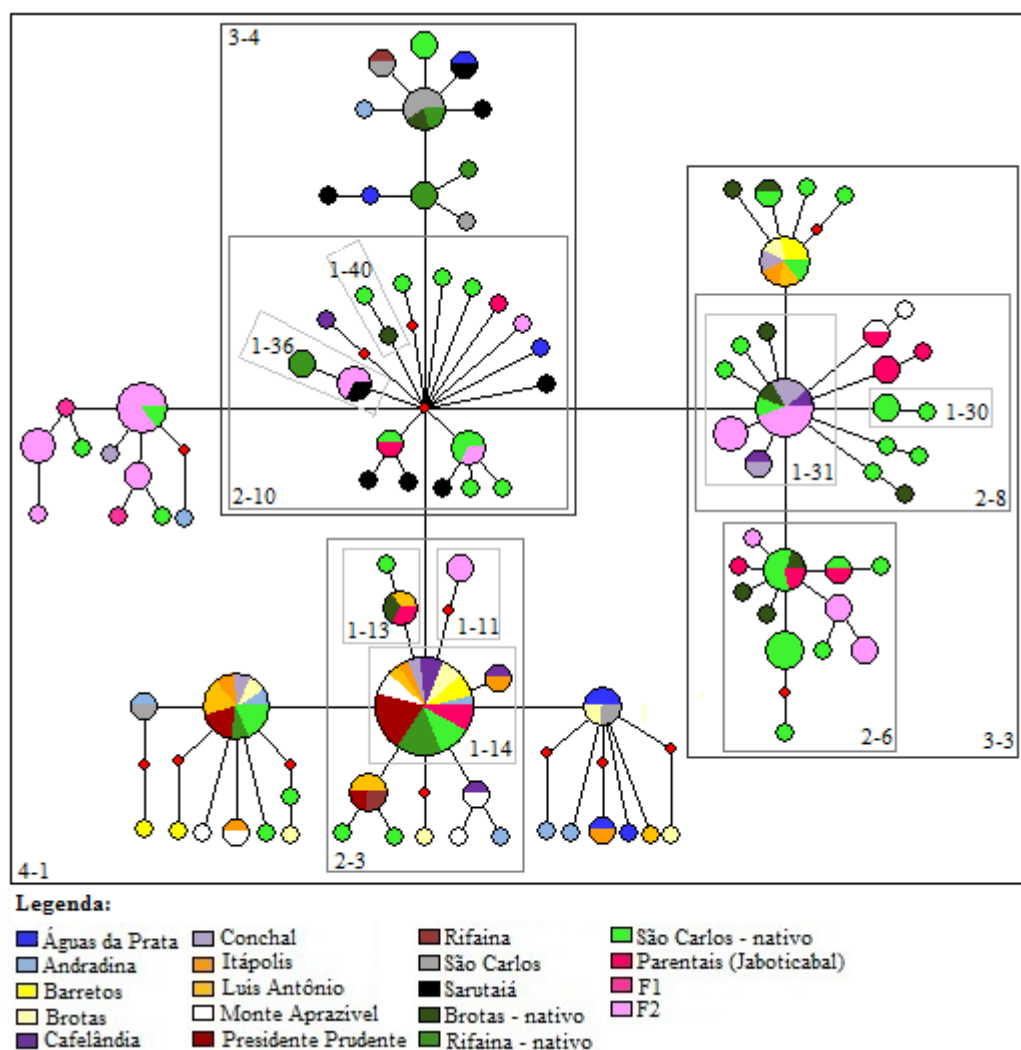


Figura 4. Rede baseada nos padrões de bandejamento obtidos pelo “primer” UBC 849. Os círculos representam os padrões de bandejamento, sendo seu tamanho indicativo da frequência destes. Os pontos vermelhos representam padrões de estado alélico hipotéticos e as linhas indicam a existência de passos mutacionais. Os clados destacados apresentaram valores significativos para D_c , D_n ou I-T.

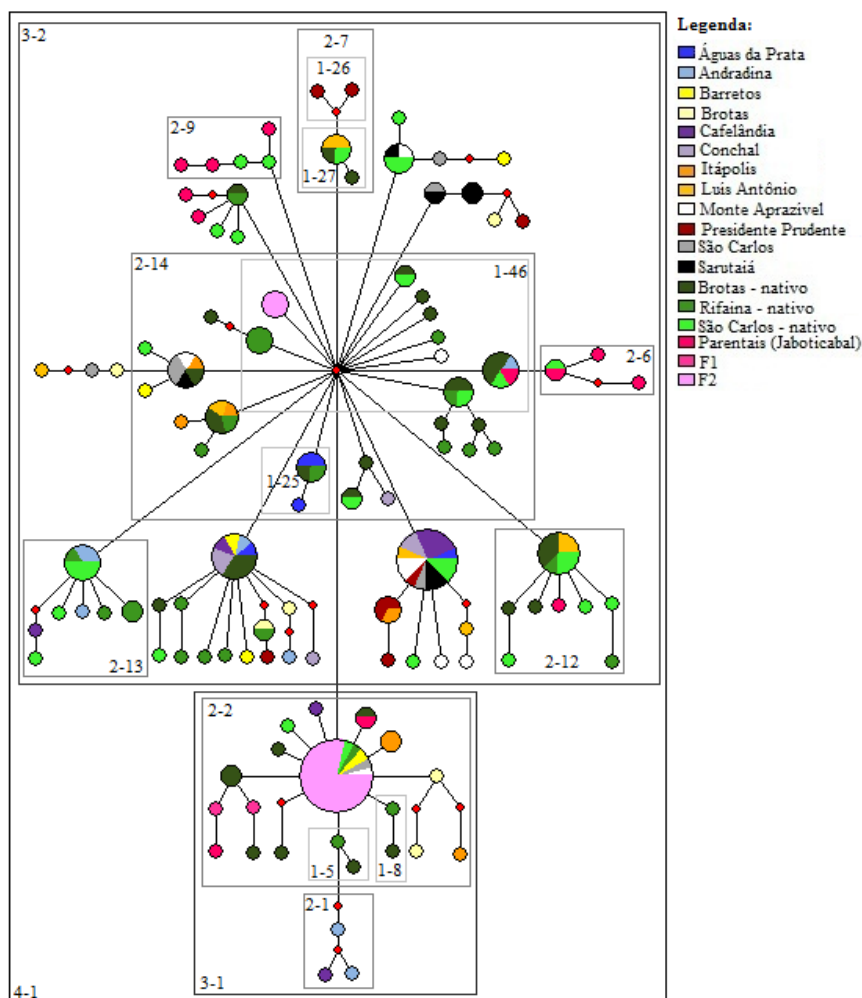


Figura 5. Rede baseada nos padrões de bandeamento obtidos pelo “primer” UBC 856. Os círculos representam os padrões de bandeamento, sendo seu tamanho indicativo da frequência destes. Os pontos vermelhos representam padrões de estado alélico hipotéticos e as linhas indicam a existência de passos mutacionais. Os clados destacados apresentaram valores significativos para D_c , D_n ou I-T.

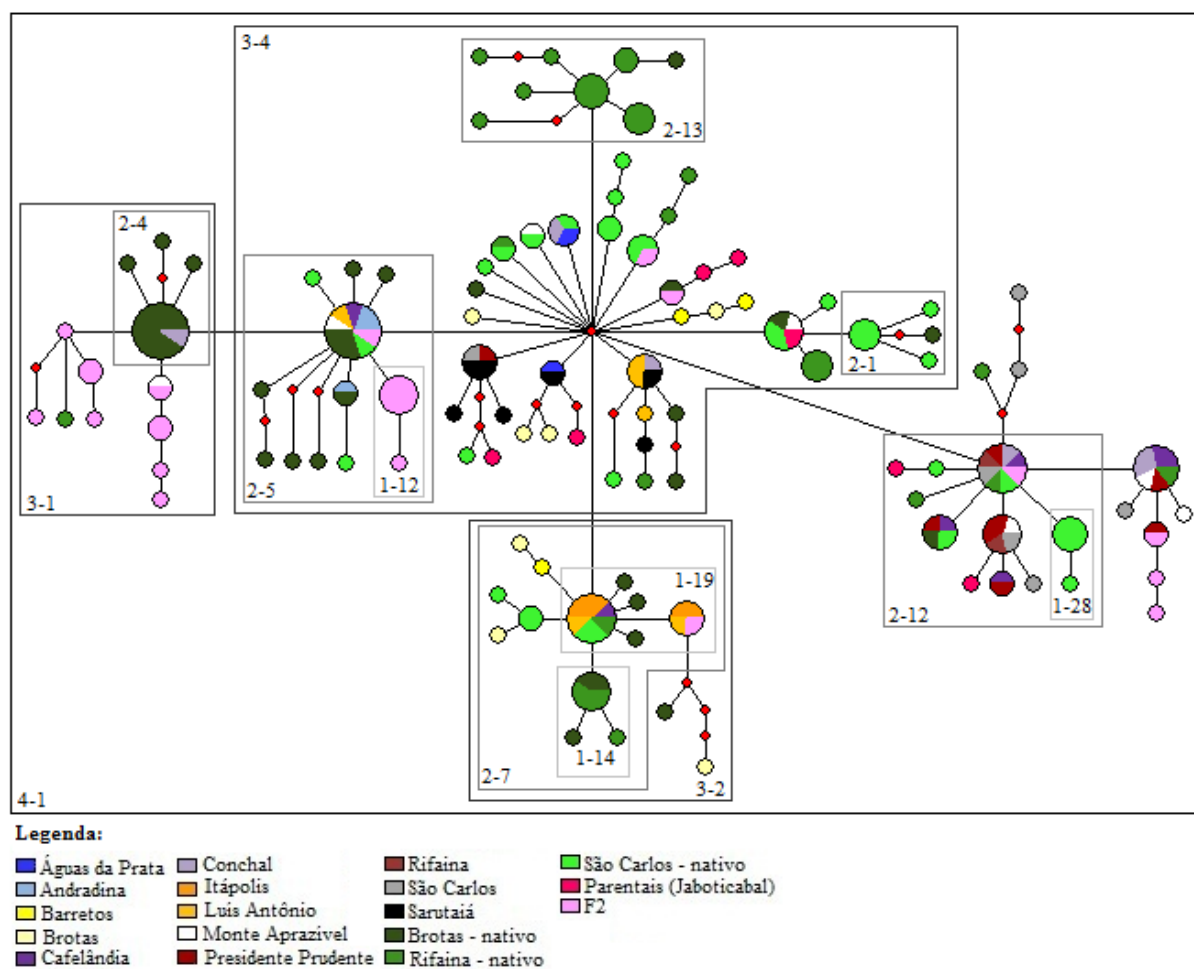


Figura 6. Rede baseada nos padrões de bandeamento obtidos pelo “primer” UBC 836. Os círculos representam os padrões de bandeamento, sendo seu tamanho indicativo da frequência destes. Os pontos vermelhos representam padrões de estado alélico hipotéticos e as linhas indicam a existência de passos mutacionais. Os clados destacados apresentaram valores significativos para D_c , D_n ou I-T.

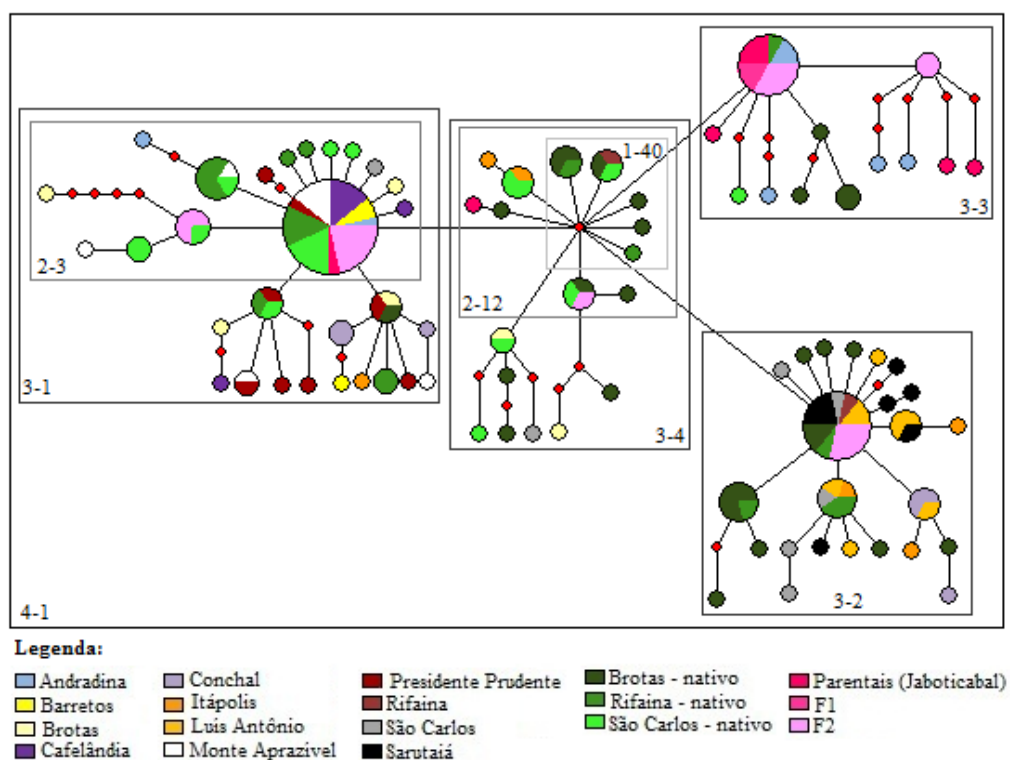
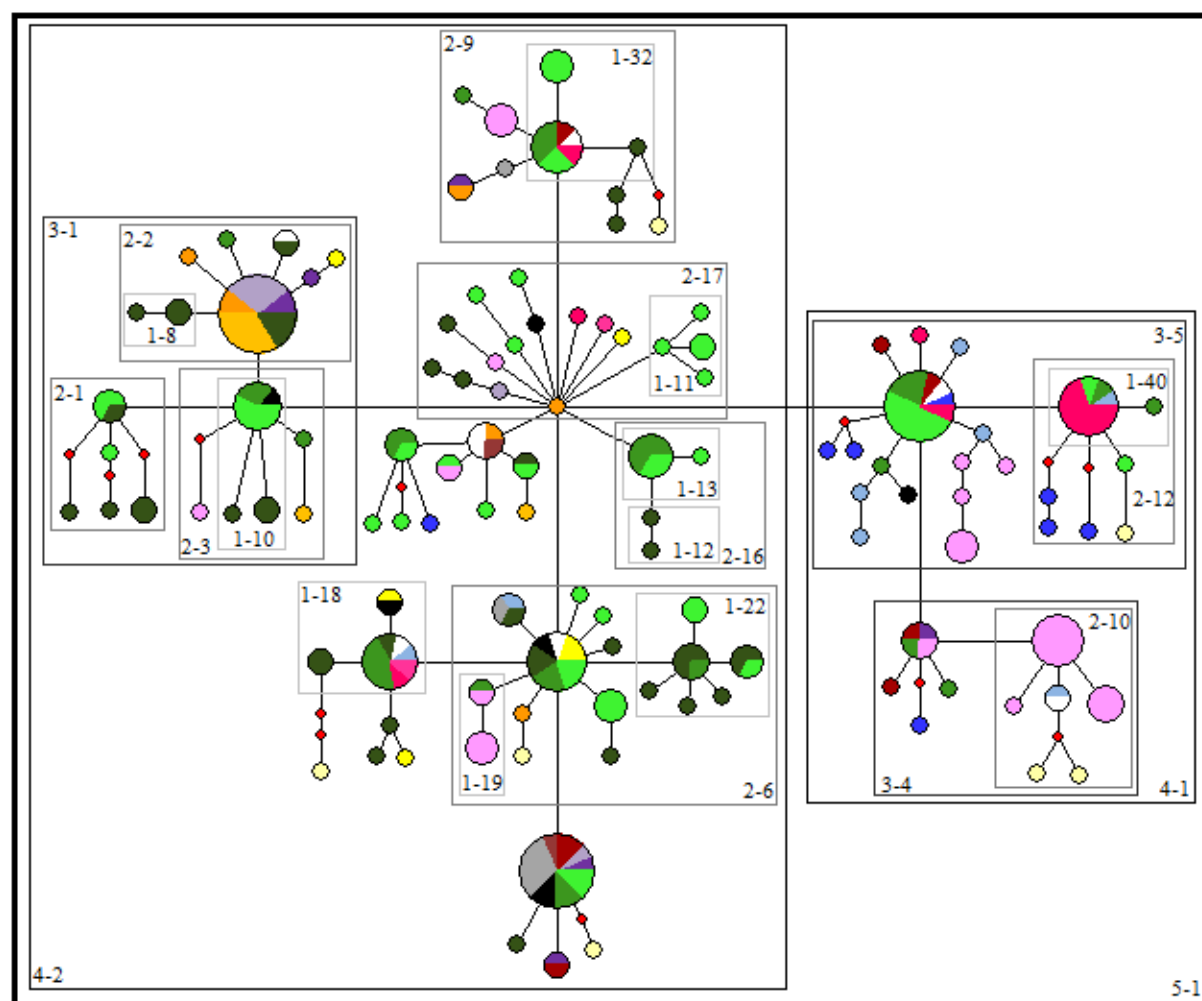


Figura 7. Rede baseada nos padrões de bandeamento obtidos pelo "primer" UBC 820. Os círculos representam os padrões de bandeamento, sendo seu tamanho indicativo da frequência destes. Os pontos vermelhos representam padrões de estado alélico hipotéticos e as linhas indicam a existência de passos mutacionais. Os clados destacados apresentaram valores significativos para D_c , D_n ou I-T.


Legenda:

Águas da Prata	Conchal	Rifaina	São Carlos - nativo
Andradina	Itápolis	São Carlos	Parentais (Jaboticabal)
Barretos	Luis Antônio	Sarutaiá	F1
Brotas	Monte Aprazível	Brotas - nativo	F2
Cafelândia	Presidente Prudente	Rifaina - nativo	

Figura 8. Rede baseada nos padrões de bandeamento obtidos pelo “primer” UBC 891. Os círculos representam os padrões de bandeamento, sendo seu tamanho indicativo da frequência destes. Os pontos vermelhos representam padrões de estado alélico hipotéticos e as linhas indicam a existência de passos mutacionais. Os clados destacados apresentaram valores significativos para D_c , D_n ou I-T.

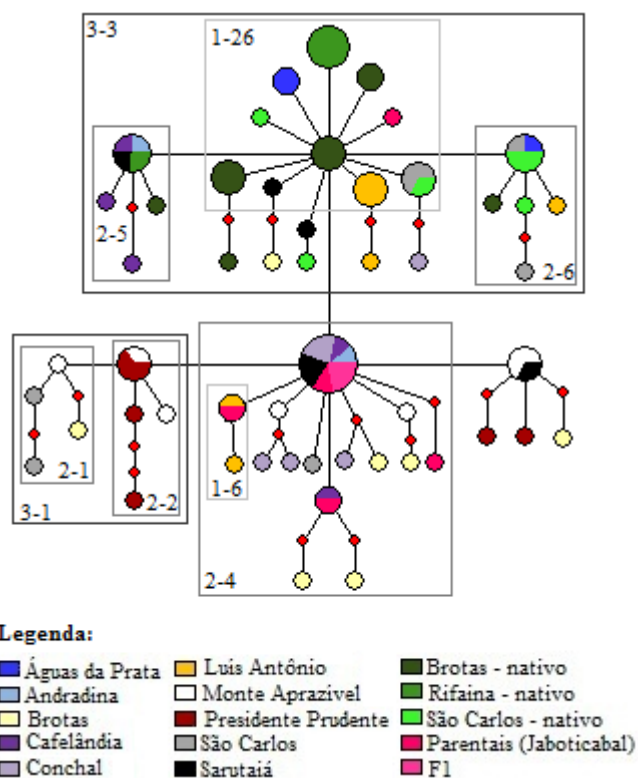


Figura 9. Rede baseada nos padrões de bandeamento obtidos pelo “primer” UBC 880. Os círculos representam os padrões de bandeamento, sendo seu tamanho indicativo da frequência destes. Os pontos vermelhos representam padrões de estado alélico hipotéticos e as linhas indicam a existência de passos mutacionais. Os clados destacados apresentaram valores significativos para D_c , D_n ou I-T.

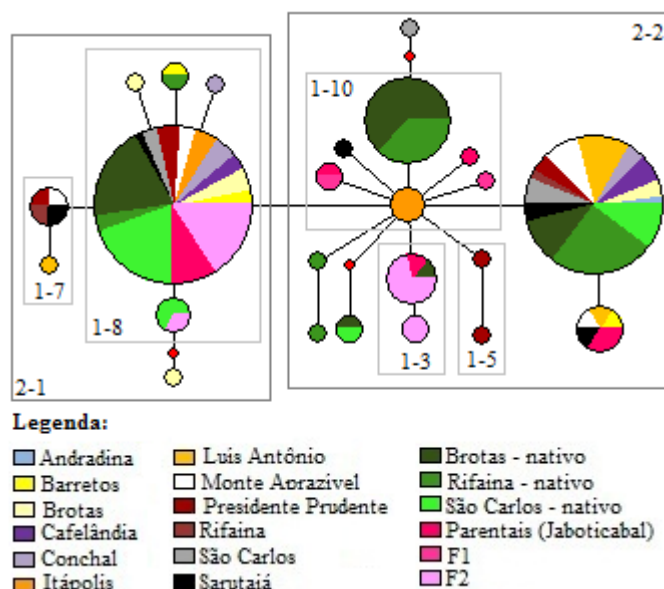


Figura 10. Rede baseada nos padrões de bandeamento obtidos pelo "primer" UBC 886. Os círculos representam os padrões de bandeamento, sendo seu tamanho indicativo da frequência destes. Os pontos vermelhos representam padrões de estado alélico hipotéticos e as linhas indicam a existência de passos mutacionais. Os clados destacados apresentaram valores significativos para D_c , D_n ou I-T.

Os testes de neutralidade D de Tajima e F_s de Fu não apresentaram valores significativos (Tabela 7), indicando que os polimorfismos condizem com o modelo de seleção neutra. Dessa forma, não foi possível sugerir que as populações se encontram em expansão, apesar de terem sido registrados valores negativos.

Tabela 7. Testes de neutralidade para as populações de *C. externa* para os diferentes “primers”.

“Primer”	D de Tajima	p^*	F_s de Fu	p^{**}
UBC 809	-0,41498	0,46174	-4,04075	0,17676
UBC 820	-0,31255	0,47850	-3,50493	0,20753
UBC 836	-0,06028	0,58478	-5,75587	0,11428
UBC 849	-0,10424	0,53100	-4,15370	0,09837
UBC 856	-0,64044	0,32844	-5,75391	0,16550
UBC 880	-0,43577	0,46580	-1,40303	0,17693
UBC 886	0,30895	0,68017	0,25937	0,47323
UBC 891	-0,15281	0,52242	-4,94962	0,17000

*valor de p para o Teste D de Tajima ao nível de significância de 5%.

**valor de p para o Teste F_s de Fu ao nível de significância de 1%.

Discussão

A técnica molecular ISSR mostrou-se eficiente na detecção de polimorfismos em *C. externa*, como já demonstrado para diferentes ordens de insetos (BORBA et al., 2005; SOUZA et al., 2008; VELU et al., 2008; HELMI; KHAFAGA; EL-FATIH, 2011; TAYLOR; DOWNIE; PATERSON, 2011).

A alta variabilidade encontrada dentro das populações reflete uma característica da espécie também observada por Morales e Freitas (2010) e Morales, Lavagnini e Freitas (2013), em estudos com o gene mitocondrial COI, nos quais a maior porcentagem de variação esteve dentro das populações (100% e 93,17%, respectivamente). Do mesmo modo, Wells (1994), comparando diferentes espécies de *Chrysoperla*, observou que a maior parte da diversidade genética encontrava-se contida dentro das populações e não entre elas.

As populações apresentaram alta diferenciação genética, como evidenciado pelos valores de G_{ST} e F_{ST} iguais a 0,2570 e 0,18793, respectivamente. Segundo Yeh, Chong e Yang (1995), valores de G_{ST} inferiores a 0,05 representam baixos níveis de diferenciação genética e superiores a 0,151 indicam alta diferenciação. Do mesmo modo, valores de F_{ST} inferiores a 0,05 indicam pequena diferenciação genética, entre 0,05 e 0,15, diferenciação genética moderada, de 0,15 a 0,25,

grande diferenciação genética e acima de 0,25, diferenciação genética muito grande (WRIGHT, 1978; HARTL; CLARK, 2010).

A AMOVA mostrou a existência de estrutura genética, diferenciando as populações em três conjuntos: nativos, agroecossistemas e laboratório. De modo semelhante, Morales, Lavagnini e Freitas (2013) obtiveram um valor significativo de F_{CT} , distinguindo populações de *C. externa* de áreas nativas e agroecossistemas. Assim, nota-se que o componente de agrupamento é principalmente genético e não geográfico, como apontado pelo teste de Mantel. Entretanto Louzada, Bearzoti e Carvalho (2006) demonstraram que quando o número de populações amostradas é inferior a 25 pode-se cometer o erro do tipo I, rejeitando-se a hipótese nula de não associação, embora esta seja verdadeira. Além disso, a correlação genético-geográfica observada no teste de Mantel pode ter sido obtida pela baixa distância genética entre municípios próximos.

Os dados do presente estudo indicaram haver variação entre as populações dentro dos grupos, diferentemente do relatado por Morales, Lavagnini e Freitas (2013), cujas diferenças observadas estavam contidas apenas entre os grupos. Essa variação pode ter sido gerada pela maior distância genética entre os municípios de Presidente Prudente e de Rifaina com as demais localidades de agroecossistemas. A distância genética observada para o município de Rifaina pode ter sido acarretada por um desvio amostral decorrente do baixo número de exemplares avaliados. Já para o município de Presidente Prudente, foram observadas duas bandas exclusivas (1250 e 1700 pb para o “primer” UBC 886), o que indica baixo fluxo gênico entre esta população e as demais analisadas, como também apontado pela análise de clados aninhados.

O maior polimorfismo associado às áreas de vegetação nativa sugere que as populações estabelecidas nos agroecossistemas sofreram perda de alelos decorrente de gargalo populacional e efeito fundador. Após a fragmentação florestal ocasionada pela expansão de áreas agrícolas e urbanas, poucos espécimes devem ter migrado para as áreas de cultivo, se estabelecendo e multiplicando rapidamente devido à elevada disponibilidade de recursos em monoculturas. Resultados semelhantes foram descritos por Morales, Lavagnini e Freitas (2013), sendo observados valores de diversidade superiores para populações de *C. externa* em

áreas nativas, bem como expansão populacional em ambientes de agroecossistema. A hipótese sugerida é reforçada pela análise de clados aninhados, na qual se pode observar que grande parte dos diferentes padrões de bandejamento está presente nas populações de áreas nativas. Este fato indica que estes conjuntos de bandas iguais foram originados nas áreas nativas e então dispersos para os agroecossistemas, onde houve expansão das populações em áreas contíguas, também evidenciado pela NCPA. Assim, as populações de áreas nativas podem ser consideradas mais ancestrais em relação às populações de agroecossistemas.

O isolamento geográfico dos fragmentos de vegetação é evidenciado pela análise de clados aninhados, na qual as populações de áreas nativas apresentaram fluxo gênico restrito com as demais populações. Além disso, os valores elevados de diversidade para agroecossistema em Brotas podem estar associados à proximidade do ponto de coleta à região de vegetação da Cachoeira do Martelo, mostrando a existência de fluxo gênico entre fragmentos e matriz, porém apenas em curtas distâncias. Dessa forma, sugere-se que os agroecossistemas podem não ser eficientes como corredores, que permitem o amplo fluxo gênico entre os remanescentes florestais e a homogeneização das populações. Assim, áreas de agroecossistemas se comparam à ambientes exóticos para espécies introduzidas, que sofrendo os efeitos do gargalo populacional e deriva genética, tendem a sofrer perda de alelos e, conseqüentemente, de variabilidade, como já observado em várias espécies invasoras (TSUTSUI et al., 2000; TSUTSUI; CASE, 2001; HUFBAUER; BOGDANOWICZ; HARRISON, 2004; EALES; THORPE; MALHOTRA, 2008; MORALES; LAVAGNINI; FREITAS, 2013).

Apesar da redução de locus polimórficos, os valores de diversidade genética (baseados no número de heterozigotos) não diferiram entre populações de áreas nativas e agroecossistemas. Este resultado pode estar associado ao fato de haver fluxo gênico entre as populações, embora este seja baixo, como indicado pelo número de migrantes igual a 1,5457. Segundo McDermott e McDonald (1993), valores de N_m superiores a 1 já seriam suficientes para evitar a fixação de alelos neutros, ou seja, a formação de homozigotos. A pequena distância genética entre todas as populações, fato também constatado por Morales e Freitas (2010), indica isolamento recente entre elas, de modo que os efeitos da endogamia podem ainda

não ter afetado, de forma relevante, o número de heterozigotos nas populações. Outra hipótese está relacionada ao grande crescimento populacional de *C. externa* nos agroecossistemas, evidenciado na NCPA, que proporciona o aumento no número de mutações, podendo elevar a quantidade de heterozigotos nas populações (FUTUYMA, 2005a). Entretanto, mesmo que a heterozigosidade seja mantida na população, a redução do número de alelos por locus pode comprometer a adaptabilidade dos espécimes em ambientes exóticos (NEI; MARUYAMA; CHAKRABORTY, 1975).

Em laboratório observou-se a diminuição de polimorfismos e a redução não significativa da heterozigosidade entre espécimes parentais e da segunda geração. Resultados semelhantes foram observados em afídeos por Michel, Zhang e Rouf Mian (2010), entre insetos criados em laboratório e coletados em campo. Deste modo, nossos resultados reforçam a ideia de que a heterozigosidade pode ser mantida mesmo quando as populações estão sob forte gargalo populacional e deriva genética. Porém, as implicações decorrentes desses eventos, adjuntas à seleção artificial ocasionada pela manutenção de condições estáveis em laboratório, tendem a agravar os efeitos sobre a variabilidade genética ao longo das gerações (MACKAUER, 1976). Diversos estudos têm demonstrado perda de variabilidade em linhagens de diferentes espécies de insetos, quando mantidas em laboratório (GIBERT et al., 1998; NORRIS et al., 2001; STOHLER; CURTIS; MINCHELLA, 2004; ARIAS et al., 2005; KAR et al., 2005).

Segundo Reed e Frankram (2003), em estudos com diferentes espécies de invertebrados, a capacidade adaptativa de uma população está associada à sua diversidade genética. Assim, podemos concluir que a alta variabilidade genética de *C. externa* contribui para a sua utilização como agente de controle biológico. Entretanto, para a sua multiplicação em laboratório, as implicações do gargalo populacional, efeito fundador e deriva genética devem ser consideradas, a fim de evitar a perda expressiva de variabilidade genética.

Podemos concluir também que as áreas de vegetação nativa constituem reservatórios de diversidade genética, como já sugerido por Morales, Lavagnini e Freitas (2013). Dessa forma, o isolamento entre os fragmentos florestais e o baixo fluxo gênico entre estes e as matrizes, mostra a necessidade da preservação de

áreas nativas próximas aos agroecossistemas e de corredores que liguem os remanescentes, de modo a impedir que os efeitos da deriva genética afetem a adaptabilidade dos espécimes nas áreas agrícolas.

Agradecimentos

Agradecemos Francisco José Sosa Duque, pela identificação dos espécimes coletados; à CAPES, pela concessão de bolsa de mestrado à NCCPB e à FAPESP (processo nº 2006/03494-0), pelo financiamento de parte do projeto.

Referências

ADAMS, P. A.; PENNY, N. D. Neuroptera of the Amazon Basin. Part 11a. Introduction and Chrysopini. **Acta Amazonica**, Manaus, v. 15, n. 3-4, p. 413-479, 1985.

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

BAKER, D. A.; LOXDALE, H. D.; EDWARDS, O. R. Genetic variation and founder in the parasitoid wasp, *Diaeretiella rapae* (M'Intosh) (Hymenoptera: Braconidae: Aphidiidae), affecting its potential as a biological control agent. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 12, n. 12, p. 3303–3311, 2003.

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

BANDELT, H-J.; FORSTER, P.; SYKES, B. C.; RICHARDS, M. B. Mitochondrial portraits of human populations. **Genetics**, Austin, v. 141, n. 2, p. 743-753, 1995.

BORBA, R. S.; GARCIA, M. S.; KOVALESKI, A.; OLIVEIRA, A. C.; ZIMMER, P. D.; CASTELO BRANCO, J. S.; MALONE, G. Dissimilaridade genética de linhagens de *Trichogramma* Westwood (Hymenoptera: Trichogrammatidae) através de marcadores moleculares ISSR. **Neotropical Entomology**, Londrina, v. 34, n. 4, p. 565-569, 2005.

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

BROOKS, S. J.; BARNARD, P. C. The green lacewings of the world: a generic review (Neuroptera: Chrysopidae). **Bulletin of the British Museum Natural History (Entomology)**, London, v. 59, n. 2, p. 117-286, 1990.

EALES, J.; THORPE, R. S.; MALHOTRA, A. Weak founder effect signal in a recent introduction of Caribbean *Anolis*. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 17, n. 6, p. 1416-1426, 2008.

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

FERREIRA, D. F. Sisvar: a computer statistical analysis system. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 35, n. 6, p. 1039-1042, 2011.

FLUXUS TECHNOLOGY LTD. Free Phylogenetic Network Software. Version 4.6.1.1. [S.I.]: Fluxus Technology Ltd, 1999-2012. Disponível em: <<http://www.fluxus-engineering.com/sharenet.htm>>. Acesso em: 17 mar. 2013.

FREITAS, S. **Criação de crisopídeos (Bicho lixeiro) em laboratório**. Jaboticabal: Funep, 2001a. 20 p.

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

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

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

FUTUYMA, D. J. Genetic drift: evolution at random. In: _____. **Evolution**. Sunderland: Sinauer Associates, 2005a. cap. 10, p. 225-246.

FUTUYMA, D. J. Variation. In: _____. **Evolution**. Sunderland: Sinauer Associates, 2005b. cap.9, p. 189-224.

GIBERT, P.; MORETEAU, B.; MORETEAU, J-C.; DAVID, J. R. Genetic variability of quantitative traits in *Drosophila melanogaster* (fruit fly) natural populations: analysis of wild-living flies and of several laboratory generations. **Heredity**, London, v. 80, n. 3, p. 326-335, 1998.

GOOGLE. Google Earth. Versão 7.0.1.8244. [S. I.]: Google Inc., 2013. Disponível em: <<http://www.google.com/earth/index.html>>. Acesso em: 09 abril 2013.

HAGEN, H. A. Synopsis of the Neuroptera of North America, with a list of the South American species. **Smithsonian Miscellaneous Collections**, Washington, v. 4, n. 1, p. 1-347, 1861.

HARTL, D. L.; CLARK, A. G. Endocruzamento, subdivisão populacional e migração. In: _____. **Princípios de genética de populações**. 4. ed. Porto Alegre: Artmed, 2010. cap. 6, p. 271-330.

HELMI, A.; KHAFAGA, A. F.; EL-FATIH, M. M. Molecular fingerprinting of certain cereal aphids in Egypt (Hemiptera: Sternorrhyncha: Aphididae) using RAPD and ISSR markers. **Journal of Entomology**, New York, v. 8, n. 4, p. 327-340, 2011.

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**, Oxford, v. 13, n. 2, p. 337–348, 2004.

HUFBAUER, R. A.; RODERICK, G. K. Microevolution in biological control: mechanisms, patterns and processes. **Biological Control**, Orlando, v. 35, n. 3, p. 227–239, 2005.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA – IBGE (Rio de Janeiro, RJ). **Índice de nomes geográficos**. Rio de Janeiro, 2011. 1 Base Cartográfica Contínua do Brasil ao Milionésimo. Escala 1: 1.000.000.

JUNIOR, O. F. GPS Track Maker. Versão 13.8. [S. l.]: Geo Studio Technology Ltda, 2012. Disponível em: <<http://www.trackmaker.com>> Acesso em: 29 out. 2012.

KAR, P. K.; VIJAYAN, K.; MOHANDAS, T. P.; NAIR, C. V.; SARATCHANDRA, B.; THANGAVELU, K. Genetic variability and genetic structure of wild and semi-domestic populations of tasar silkworm (*Antheraea mylitta*) ecorace Daba as revealed through ISSR markers. **Genetica**, Dordrecht, v. 125, n. 2-3, p. 173–183, 2005.

KEHLMAIER, C.; ASSMANN, T. Molecular analysis meets morphology-based systematics: a synthetic approach for Chalarinae (Insecta: Diptera: Pipunculidae). **Systematic Entomology**, Oxford, v. 35, n. 1, p. 181–195, 2010.

KUMAGAI, A. F. Os Ichneumonidae (Hymenoptera) da Estação Ecológica da Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, com ênfase nas espécies de Pimplinae. **Revista Brasileira de Entomologia**, São Paulo, v. 46, n. 2, p. 189-194, 2002.

LEWONTIN, R. C. The apportionment of human diversity. **Evolutionary Biology**, New York, v. 6, p. 381-398, 1972.

LOUZADA, J. M.; BEARZOTI, E.; CARVALHO, D. Avaliação e aplicação de testes para a detecção da autocorrelação espacial usando marcadores genéticos. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 30, n. 2, p. 206-213, 2006.

MACKAUER, M. Genetic problems in the production of biological control agents. **Annual Review of Entomology**, Stanford, v. 21, p 369-385, 1976.

MANTEL, N. The detection of disease clustering and a generalized regression approach. **Cancer Research**, Baltimore, v. 27, n. 2 (part 1), p. 209-220, 1967.

McDERMOTT, J. M.; McDONALD, B. A. Gene flow in plant pathosystems. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 31, p. 353-73, 1993.

MICHEL, A. P.; ZHANG, W.; ROUF MIAN, M. A. Genetic diversity and differentiation among laboratory and field populations of the Soybean Aphid, *Aphis glycines*. **Bulletin of Entomological Research**, Farnham Royal, v. 100, n. 6, p. 727-734, 2010.

MILLER, M. P. Tools for population genetic analyses (TFPGA) 1.3: A Windows program for the analyses of allozyme and molecular population genetic data. [S. l.]: Software de computador distribuído pelo autor, 1997. Disponível em: <<http://www.marksgeneticsoftware.net/tfpga.htm>>. Acesso em: 17 jun. 2012.

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

MORALES, A. C.; LAVAGNINI, T. C.; FREITAS, S. Loss of genetic variability induced by agroecosystems: *Chrysoperla externa* (Hagen) (Neuroptera: Chrysopidae) as a case study. **Neotropical Entomology**, Londrina, v. 42, n. 1, p. 32-38, 2013.

NEI, M.; MARUYAMA, T.; CHAKRABORTY, R. The bottleneck effect and genetic variability in populations. **Evolution**, Lancaster, v. 29, n. 1, p. 1-10, 1975.

NEI, M. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. **Genetics**, Austin, v. 89, n. 3, p. 583-590, 1978.

NORRIS, D. E.; SHURTLEFF, A. C.; TOURÉ, Y. T.; LANZARO, G. C. Microsatellite DNA polymorphism and heterozygosity among field and laboratory populations of *Anopheles gambiae* s.s. (Diptera: Culicidae). **Journal of Medical Entomology**, Lanham, v. 38, n. 2, p. 336-340, 2001.

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

REED, D. H.; FRANKHAM, R. Correlation between fitness and genetic diversity. **Conservation Biology**, Boston, v. 17, n. 1, p. 230-237, 2003.

ROUX, O.; GEVREY, M.; ARVANITAKIS, L.; GERS, C.; BORDAT, D.; LEGAL, L. ISSR-PCR: Tool for discrimination and genetic structure analysis of *Plutella xylostella* populations native to different geographical areas. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, Orlando, v. 43, n. 1, p. 240-250, 2007.

SCOTT, A. J.; KNOTT, M. A. A cluster analysis method for grouping means in the analysis of variance. **Biometrics**, Washington, v. 30, n. 3, p. 507-512, 1974.

SLATKIN, M. Gene flow and the geographic structure of natural populations. **Science**, Washington, v. 236, n. 4803, p. 787-792, 1987.

SOUZA, B.; COSTA, R. I. F.; LOUZADA, J. N. C. Influência do tamanho e da forma de fragmentos florestais na composição da taxocenose de crisopídeos (Neuroptera: Chrysopidae). **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 75, n. 3, p. 351-358, 2008.

SOUZA, G. A.; CARVALHO, M. R. O.; MARTINS, E. R.; GUEDES, R. N. C.; OLIVEIRA, L. O. de. Diversidade genética estimada com marcadores ISSR em populações brasileiras de *Zabrotes subfasciatus*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 43, n. 7, p. 843-849, 2008.

STOHLER, R. A.; CURTIS, J.; MINCHELLA, D. J. A comparison of microsatellite polymorphism and heterozygosity among field and laboratory populations of *Schistosoma mansoni*. **International Journal for Parasitology**, Oxford, v. 34, n. 5, p. 595-601, 2004.

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

TAYLOR, S. J.; DOWNIE, D. A.; PATERSON, I. D. Genetic diversity of introduced populations of the water hyacinth biological control agent *Eccritotarsus catarinensis* (Hemiptera: Miridae). **Biological Control**, Orlando, v. 58, n. 3, p. 330-336, 2011.

TEMPLETON, A. R. Statistical phylogeography: methods of evaluating and minimizing inference errors. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 13, n. 4, p. 789-809, 2004.

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

TSUTSUI, N. D.; CASE, T. J. Population genetics and colony structure of the Argentine ant (*Linepithema humile*) in its native and introduced ranges. **Evolution**, Lancaster, v. 55, n. 5, p. 976-985, 2001.

TSUTSUI, N. D.; SUAREZ, A. V.; HOLWAY, D. A.; CASE, T. J. Reduced genetic variation and the success of an invasive species. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 97, n. 11, p. 5948-5953, 2000.

VELU, D.; PONNUVEL, K. M.; MUTHULAKSHMI, M.; SINHA, R. K.; QADRI, S. M. H. Analysis of genetic relationship in mutant silkworm strains of *Bombyx mori* using inter simple sequence repeat (ISSR) markers. **Journal of Genetics and Genomics**, Peiping, v. 35, n. 5, p. 291-297, 2008.

WELLS, M. M. Small genetic distances among populations of green lacewings of the genus *Chrysoperla* (Neuroptera: Chrysopidae). **Annals of the Entomological Society of America**, College Park, v. 87, n. 6, p. 737-744, 1994.

WOLFE, A. D.; LISTON, A. Contributions of PCR-based methods to plant systematics and evolutionary biology. In: SOLTIS, D. E.; SOLTIS, P. S.; DOYLE, J. J. (Ed.). **Molecular systematics of plants II: DNA sequencing**. Boston: Kluwer, 1998. cap. 2, p. 43-86.

WRIGHT, S. Genetic variability in natural populations methods. In: _____. **Evolution and the genetics of populations: variability within and among natural populations**. Chicago: The University of Chicago Press, 1978. cap. 3, p. 78- 103.

YEH, F. C.; CHONG, D. K. X.; YANG, R. C. RAPD variation within and among natural populations of trembling aspen (*Populus tremuloides* Michx.) from Alberta. **Journal of Heredity**, Washington, v. 86, n. 6, p. 454-460, 1995.

YEH, F.; YANG, R.; BOYLE, T. POPGENE: Population Genetic Analysis. Versão 1.32. [S. I.]: Molecular Biology and Biotechnology Center, University Alberta; Center for International Forestry Research, 1999. Disponível em: <http://www.ualberta.ca/~fyeh/popgene_download.html>. Acesso em: 12 nov. 2011.

CAPÍTULO 4 - Considerações finais

A espécie *Chrysoperla externa* apresentou variabilidade genética elevada, como mostrado neste estudo tanto para o marcador molecular ISSR quanto para o gene mitocondrial COI. Este fato pode contribuir para a utilização desta espécie como agente de controle em programas de Manejo Integrado de Pragas, uma vez que a alta variabilidade genética minimiza os efeitos negativos decorrentes de deriva genética de modo a manter elevada sua capacidade adaptativa em campo.

Entretanto, antes de se iniciar uma criação massal para liberação de insetos em campo, deve-se considerar que a manutenção de espécies em laboratório sob condições estáveis tende a reduzir a variabilidade genética contida nas populações, sendo necessários cuidados em relação ao número de espécimes utilizados para iniciar a criação e que estes não apresentem elevado grau de endogamia.

Outro fato a ser considerado é de que algumas populações podem ser geneticamente distintas das demais, como apontado neste estudo pela presença de bandas exclusivas observadas na população de Presidente Prudente. Dessa forma, uma alternativa para a utilização de *C. externa* em campo, seria multiplicar os indivíduos estabelecidos nesses agroecossistemas, incrementando a variabilidade genética populacional com espécimes advindos de áreas nativas próximas com as quais apresentem fluxo gênico.

A maior variabilidade genética associada aos espécimes coletados em áreas nativas ressalta a importância de preservação dessas áreas, as quais por meio do fluxo gênico tendem a aumentar a variabilidade dentro das populações estabelecidas nos agroecossistemas, sem a necessidade de intervenções.

Diante deste quadro, ressaltamos a necessidade de estudos em relação à eficiência de *C. externa* como agente de controle biológico em campo, pois diversas pesquisas já foram realizadas em condições de laboratório e em casas de vegetação, de modo que a comprovação de sua eficiência em campo poderia contribuir para a real utilização desta espécie em programas de manejo.

Estudos genéticos mais amplos para a espécie *C. externa* também são interessantes, tais como a análise temporal da variabilidade genética e estudos que englobem toda a sua distribuição geográfica.