

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

**CARACTERIZAÇÃO CITOGENÉTICA DE POPULAÇÕES
DE CRISOPÍDEOS (NEUROPTERA: CHRYSOPIDAE) DE
OCORRÊNCIA EM JABOTICABAL, SP.**

Amália Torrezan Lopes

Bióloga

JABOTICABAL – SÃO PAULO – BRASIL
Março de 2012

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

**CARACTERIZAÇÃO CITOGENÉTICA DE POPULAÇÕES
DE CRISOPÍDEOS (NEUROPTERA: CHRYSOPIDAE) DE
OCORRÊNCIA EM JABOTICABAL, SP.**

Amália Torrezan Lopes

Orientador: Prof. Dr. Sérgio de Freitas

Co-orientador: Prof. Dr. Sergio Antonio De Bortoli

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

Jaboticabal – SP
Março, 2012

L864c Lopes, Amália Torrezan
Caracterização citogenética de populações de crisopídeos
(Neuroptera: Chrysopidae) de ocorrência em Jaboticabal, SP. / Amália
Torrezan Lopes. -- Jaboticabal, 2012
x, 59 f. : il. ; 28 cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista,
Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2012
Orientador: Sérgio de Freitas
Banca examinadora: Nilza Maria Martinelli, Marielle Cristina
Schneider
Bibliografia

1. cariótipo. 2. *Chrysoperla*. 3. *Ceraeochrysa*. 4. *Chrysopodes*. 5.
Leucochrysa. 6. taxonomia. 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

AMÁLIA TORREZAN LOPES – Nascida em Saltinho, SP em 09 de Maio de 1986; é Bióloga graduada pela Universidade Metodista de Piracicaba em Fevereiro de 2008. No mesmo ano iniciou o curso de Especialização em Bioecologia e Conservação na mesma universidade, finalizando em Julho de 2009. Em Março de 2010 iniciou o curso de Mestrado em Agronomia Entomologia Agrícola na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – UNESP, sendo bolsista da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) no período de março de 2010 a fevereiro de 2012.

*“Ando devagar porque já tive pressa
e levo esse sorriso por que já chorei demais...”*

Almir Sater

*A Deus, por me acompanhar e me
proteger em todos os momentos,*

*Ao Professor Dr. Sérgio de Freitas, por me desafiar,
me orientar e me fazer buscar caminhos para que
conseguísse chegar até aqui
agradeço.*

*A meus pais, Iriana e Edison, pelo amor infinito
pelo apoio, carinho e compreensão,
ofereço.*

AGRADECIMENTOS

Muitas vezes, as palavras não são suficientes para expressar o que sentimos, mas gostaria de agradecer a todas as pessoas que de alguma maneira me ajudaram, incentivaram e acreditaram para a realização deste trabalho, em especial:

A Deus por jamais ter me desamparado nos momentos mais difíceis e nunca deixar desanimar.

Aos meus pais Edison e Iriana, pelo exemplo de vida, por sempre terem compartilhado meus sonhos e por todo amor, incentivo, e confiança durante toda minha vida.

Ao Ramon, querido irmão, por estar presente em minha vida, pelo carinho e incentivo e pelos momentos de muita felicidade.

À minha avó Dulce por me acompanhar em todos os momentos da minha vida, até em minha adaptação em Jaboticabal!

Ao meu namorado Felipe Corte Eleuterio, pelo carinho, compreensão e paciência dedicados.

Ao professor Dr. Sérgio de Freitas, orientador e exemplo profissional, pela atenção, orientação e ensinamentos de vida.

Às professoras Dra. Doralice Maria Cella e Dra. Marielle Cristina Schneider por todos os ensinamentos, pelo tempo dedicado, incentivo e críticas na realização deste trabalho.

Aos professores Dr. Sergio Antonio De Bortoli e a Dra. Nilza Maria Martinelli pela leitura crítica e correção do artigo científico.

Á todos os professores do Curso de Pós-graduação em Agronomia – Entomologia agrícola pelos ensinamentos e contribuições profissionais.

Á todos os colegas do Laboratório de Biossistemática, Biologia e Ecologia Molecular de Neurópteros, André Maurício Múscari, Francisco Sosa, Patrícia Schwartz, Nara Barbosa, Caleb Martins, e as que já passaram Taís Lavagnini e Adriana Morales, pela amizade, incentivo, apoio e discussões profissionais.

Á todos os colegas de Pós-graduação, em especial, ao Diego Felisbino Fraga, Leandro Aparecido de Souza, Vanessa Paes, Juliana Nais, Marina Viana, Andréa Varella, Joseane Souza, Tatiana Ramos pelos momentos inesquecíveis de amizade, pelas discussões científicas.

Ás amigas de casa, Patricia Schwartz e Vanessa Paes, pelos grandes momentos de amizade e companheirismo, pelas risadas e pelos ensinamentos de vida!

Ás minhas grandes amigas Mariana Furlan, Cláudia Rizzo e Marília Giovanni por toda a força e companheirismo sempre!

Á CAPES pela concessão da bolsa de estudo.

Ao programa de Pós-graduação em Agronomia – Entomologia Agrícola e à Universidade Estadual Paulista pela oportunidade e apoio na realização do trabalho.

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS	1
REFERENCIAS	8
CAPÍTULO 2 - DIFERENCIAÇÃO DE ESPÉCIES INTRAGENÉRICA E ESTRATÉGIAS DE EVOLUÇÃO CROMOSSÔMICA EM CHRYSOPIDAE: NEUROPTERA ATRAVÉS DA CARIOTIPAGEM	12
Introdução.....	13
Material e Métodos	16
Resultados e Discussão	17
REFERÊNCIAS	26
CAPÍTULO 3 - ANÁLISE CITOGENÉTICA DE SETE ESPÉCIES NEOTROPICAIS DE CHRYSOPIDAE (NEURÓPTERA) DO GÊNERO <i>CERAEOCHRYSA</i> (ADANS, 1982).....	30
Introdução.....	30
Materiais e Métodos.....	32
Resultados e discussão.....	33
REFERÊNCIAS	41
CAPÍTULO 4 - CARACTERÍSTICAS CROMOSSÔMICAS DE QUATRO ESPÉCIES DE CHRYSOPIDAE	46
Introdução.....	46
Material e métodos	49
Resultados e discussão	50
Gênero <i>Chrysoperla</i>	50
Gênero <i>Chrysopodes</i>	51
REFERÊNCIAS	56

CARACTERIZAÇÃO CITOGENÉTICA DE POPULAÇÕES DE CRISÓPÍDEOS (NEUROPTERA: CHRYSOPIDAE) DE OCORRÊNCIA EM JABOTICABAL, SP.

RESUMO – A família Chrysopidae, pertencente à ordem Neuroptera, é a mais numerosa, compreendendo mais de 1200 espécies válidas, distribuídas em várias regiões do mundo, principalmente na Neotropical. A classificação desta família em gêneros e espécies é baseada em estudos da morfologia externa e da genitália de machos e fêmeas adultos. No entanto tem-se buscado novas metodologias para auxiliar tanto na taxonomia, quanto no conhecimento da evolução. A citogenética é uma ferramenta bastante importante para o conhecimento da extensão da biodiversidade, pois a partir de diferenças presentes nos cromossomos podem-se distinguir grupos, bem como padrões de evolução. Assim, o objetivo deste estudo foi caracterizar citogeneticamente 18 espécies de crisópídeos de ocorrência em Jaboticabal – SP., quanto ao número diplóide, morfologia e tamanho dos cromossomos, sistema cromossômico sexual, e quando possível, analisar o comportamento meiótico. Os cromossomos foram obtidos a partir de preparações gonadais masculinas e femininas de indivíduos adultos e de embriões, submetidos à coloração convencional e fotografados com câmara MOTICAM acoplada a microscópio e software IMAGE da Motic. Das 18 espécies analisadas, somente em *Chrysoperla defreitasi* não foi possível observar o par heteromórfico, no entanto as demais espécies exibiram sistema sexual do tipo XY/XX. O número diplóide variou entre $2n=16$ nas espécies do gênero *Leucochrysa* a $2n=6$ em *Chrysopodes delicata*, e esta diferença refletiu na morfologia cromossômica e permitiu diferenciar algumas das espécies. Nas espécies em que foram obtidas células meióticas observou-se a formação de bivalentes autossômicos com quiasmas terminais e univalentes sexuais assinápticos e aquiasmáticos.

Palavras-chave: cariótipo, *Chrysoperla*, *Ceraeochrysa*, *Chrysopodes*, *Leucochrysa*, taxonomia.

**CYTOGENETIC CHARACTERIZATION OF POPULATIONS OF GREEN
LACEWINGS (NEUROPTERA: CHRYSOPIDAE) THAT OCCUR IN
JABOTICABAL, SP.**

SUMMARY - The family Chrysopidae, belonging to the Neuropteran order, is the most numerous, comprising more than 1200 valid species, distributed in various regions of the world, mainly in the Neotropical. The classification of this family into genera and species is based on the study of external morphology and male and female adults genitalia. However, new methods to assist the taxonomy and the evolution have been studied. The cytogenetic is a very important tool for to understand the extent of biodiversity, because the differences in the chromosomes can be distinguished group, and pattern of evolution. The objective of this study was to perform cytogenetic analysis of 18 species of green lacewings of occurrence in the city of Jaboticabal – SP, characterizing them as to the diploid number, shape and size of chromosomes, and when was possible, analyzed the meiotic behavior. The chromosomes preparations were obtained from adults male and female gonodals and embryos that were conventional stained and photographed with a MOTIC camera coupled in a microscope and software IMAGE from Motic. Of the 18 species analyzed, only *Chrysoperla defreitasi* was not possible to observe the heteromorphic pair, however the other species exhibited sexual system of the type XY / XX. The diploid number varied from $2n = 16$ in the genus *Leucochrysa* to $2n = 6$ in *Chrysopodes delicata*, and this difference reflected in chromosome morphology and allowed to differentiate some of the species. In the species in which meiotic cells had obtained it was possible observed the formation of autosomal bivalents with terminal chiasmata and univalents sex without chiasmata and synaptic.

Key-words: karyotype, *Chrysoperla*, *Ceraeochrysa*, *Chrysopodes*, *Leucochrysa*, taxonomy.

CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS

A primeira abordagem sistemática baseada, principalmente, na especialização alimentar da fase larval realizada por ASPÖCK et al. (2001) resultou na divisão dos neuropteros em três sub-ordens: Novrorthiformia, Myrmeleontiformia e Hemerobiiformia. Os hemerobiiformia incluem os Neurópteros mais primitivos, que se caracterizam por possuírem mandíbulas levemente curvadas e sem dentes, cabeça medianamente esclerotizada e se alimentarem tipicamente de presas de corpo mole (FREITAS 2001). A este grupo pertence à família Chrysopidae, que é considerada a segunda maior família da Ordem Neuróptera, incluindo mais de 1200 espécies divididas em aproximadamente 86 gêneros distribuídos em todos os continentes com exceção da Antártida (BROOKS & BARNARD 1990; BROOKS 1997). Os crisopídeos ocorrem tanto em ecossistemas nativos como em agroecossistemas cultivados e, portanto, possuem elevado potencial de exploração em programas de controle biológico de pragas agrícolas (FREITAS 2001).

Os Chrysopidae encontram-se agrupados em três subfamílias, Notochrysinæ e Apochrysinæ que correspondem a apenas 3% das espécies descritas, e Chrysopinæ, que se destaca devido ao elevado número de espécies distribuídas em quatro tribos: Ankylopterigini, Belonopterigini, Chrysopini e Leucochrysinini (BROOKS & BARNARD 1990).

Os Notochrysinæ, de acordo com NEW (1984), podem ser considerados grupo irmão da família Chrysopidae, isto porque, morfologicamente possui algumas características que não são verificadas nos Chrysopinæ. Além disso, é a mais primitiva das três subfamílias, e a menor em relação à diversidade, com cerca de 20 espécies incluídas em sete gêneros, onde muitos destes são limitados quanto à sua distribuição (BROOKS & BARNARD 1990).

De acordo com BROOKS & BARNARD (1990), a subfamília Apochrysinæ pode ser um grupo derivado da tribo Leucochrysinini (subfamília Chrysopinæ), e por isso, não deveria ter mais que um *status* de tribo. No entanto faltam diversas características que estão presentes em Chrysopinæ, o que sugere que os Apochrysinæ tenham surgido

antes dos Chrysopinae e por isso são alocados em um grupo monofilético e distinto dos Chrysopinae (NEW 1984).

Chrysopinae é a maior subfamília de Chrysopidae, compreendendo 97% das espécies descritas (WINTERTON & FREITAS 2006). Pertencem a este grupo todas as espécies utilizadas em programas de controle biológico (BROOKS & BARNARD 1990). Os Chrysopinae possuem ampla distribuição geográfica, o que acaba por gerar aumento na disposição sistemática, em que algumas vezes, por exemplo, a mesma espécie é descrita como uma distinta (NEW 1984).

Os crisopídeos são insetos holometábolos, em que os adultos diferem na aparência e nos hábitos das formas larvais, e isto lhes confere grande vantagem evolucionária, uma vez que, larvas e adultos exploram diferentes nichos ecológicos (FREITAS 2001, 2002).

Os adultos são pequenos e apresentam envergadura variando de 1,2 a 3,0 cm, o corpo frequentemente é verde e as asas são hialinas e reticuladas por nervuras verdes. Podem se alimentar de pólen de várias flores, substâncias açucaradas produzidas por insetos e plantas (*honeydew*) e alguns podem também apresentar o hábito predador (FREITAS 2001). Os ovos são esféricos e colocados na extremidade de um pedicelo, e a oviposição é realizada nas folhas ou substratos de alimentação (PENNY 2005). As larvas são campodeiformes e possuem pernas ambulatórias, o que lhes confere movimentos rápidos e facilidade na captura da presa. Muitas delas utilizam os restos alimentares, bem como exoesqueletos das presas para se cobrir, sendo por isso, popularmente conhecidas como bicho-lixeiro; apresentam três instares, cuja duração depende de fatores como temperatura e qualidade de alimento. Após o terceiro instar as larvas tecem um casulo onde empupam e do qual emergem os indivíduos adultos (FREITAS 2001, 2002).

Desde o final do século XX o uso dos crisopídeos no controle biológico de pragas tem despertado a atenção, e a sua utilização partiu não só de criações massais para liberações, mas também do controle biológico natural (FREITAS 2001).

Segundo FREITAS (2001), tanto larvas como alguns adultos são predadores, e a capacidade de alimentação desses insetos é realmente entusiasmante. MEGAHED &

ABOU-ZEID (1982) e ADAMS & PENNY (1987) verificaram que as larvas de crisopídeo podem chegar a consumir 405 ovos de *Sitotroga cerealella* (Oliver) (Lepidoptera: Gelechiidae), 553 ovos de *Anagastha kuehniella* (Zeller) (Lepidoptera: Pyralidae), 2000 pulgões, 3780 cochonilhas ou 6487 ovos de cochonilhas em 14 dias.

Assim, sua importância está na utilização de determinadas espécies no controle biológico de pragas. Hoje, o gênero com maior potencial de uso tem sido *Chrysoperla*, cujas espécies são comercializadas há muito tempo, sendo *Chrysoperla carnea* na região Palearctica (HENRY 2001) e *Chrysoperla externa* na região Neotropical (FREITAS 2001) as mais produzidas pelas biofábricas.

A taxonomia da família Chrysopidae é pouco estável. De acordo com CADENA et al. (2007), muitas espécies constantemente são descritas e outras são reexaminadas, resultando em novas atribuições genéricas e reconhecimento de sinônimas.

Inicialmente a classificação das espécies da família Chrysopidae baseava-se na morfologia externa, principalmente nos padrões de venação das asas, mas devido à alta similaridade entre certas espécies e gêneros, bem como registros de variação intra-específicas, outras formas de distinção precisaram ser adotadas, como a utilização de estudos que evidenciam as diferenças na genitália de machos e fêmeas adultos, bem como características da cabeça do inseto (BROOKS & BARNARD 1990).

Na região Neotropical, a grande maioria das descrições das espécies foram contribuições de Banks e Návas, e eram realizadas apenas com base nos caracteres morfológicos externos e sem o uso das genitálias. Além disso, muitas descrições baseavam-se em fêmeas, machos tenerais ou em apenas um espécime em que algumas vezes relatava-se ausência de abdome (ADAMS & PENNY 1987). Posteriormente outros estudos utilizando a genitália foram incorporados, como o de FREITAS & PENNY (2001).

De acordo com ALMEIDA & STOWTHAMER (2003), embora existam chaves para classificação da família, a diferenciação das espécies exige exames cuidadosos, pois alguns gêneros são muito uniformes morfológicamente. Levando-se em conta sua importância ambiental e econômica como agentes de controle biológico, tal uniformidade pode se tornar um sério problema, ou seja, o êxito de um programa de

controle depende da liberação de espécies conhecidas, pois quando liberadas incorretamente podem não associar-se a praga ou mesmo não se adaptar às condições locais do sítio de liberação.

Assim, a utilização de diferentes métodos de identificação, além da morfologia convencional, é importante para auxiliar na resolução de problemas taxonômicos, principalmente, quando se quer determinar se espécies filogeneticamente próximas que apresentam similaridade morfológica são compostas por duas ou mais espécies crípticas (ROTHFELS 1988).

Por isso, várias pesquisas utilizando-se outras metodologias de avaliação foram estimuladas, a fim de reconhecer o maior número de espécies possíveis e estabelecer suas relações evolutivas. Como por exemplo, estudos da biologia molecular, uma vez que a partir desta é possível responder questões acerca da filogenia, evolução e dinâmica populacional (HOY 1994). A primeira análise molecular em espécies de Chrysopidae foi apresentada por WINTERTON & FREITAS (2006) baseada no estudo do DNA mitocondrial e do gene nuclear, em que concluiu-se que a tribo Chrysopini é monofilética, no entanto as relações evolutivas entre certos gêneros não corroboraram os dados anteriores baseados nos caracteres morfológicos.

A citogenética é outra ferramenta bastante importante para o conhecimento da extensão da biodiversidade, pois a partir das diferenças presentes nos cromossomos, como no número, tamanho e morfologia, que são características presentes e exclusivas de determinados grupos, pode se diferenciar espécies, bem como o padrão de sua evolução (GUERRA 1988).

De acordo com SPEAR (1982), os insetos apresentam maior diversidade cromossômica que qualquer outra classe de animais, sendo representada pela grande variedade no número de cromossomos, quantidade de DNA nuclear, variação no sistema cromossômico para determinação do sexo e na multiplicidade de forma dos cromossomos.

Em função disto, cada vez mais tem-se estudado este grupo de invertebrados a fim de acrescentar dados citogenéticos e taxonômicos e, principalmente, buscar resultados que demonstrem os processos evolutivos que ocorreram na diferenciação

das espécies. Como, por exemplo, as pesquisas com a Ordem Coleoptera, que exibiram uma grande variedade de número cromossômico e sistema de determinação do sexo (PETITPIERRE 1996), o que permitiu diferenciá-las em grupos de espécies que apresentam cariótipos semelhantes, além disso, a utilização recente de técnicas de coloração diferencial esta permitindo estabelecer estratégias sobre a evolução cromossômica do grupo, como observado por SCHNEIDER et al. (2007) no trabalho com a família Elateridae.

Na família Chrysopidae, os estudos citotaxonômicos são ainda incipientes, uma vez que das cerca de 1200 espécies descritas (BROOKS & BARNARD 1990) apenas 24 foram caracterizadas citogeneticamente, sendo uma porção muito pequena do total de espécies. Além disso, os estudos são limitados à subfamília Chrysopinae (NEW 1984).

As primeiras observações citológicas em crisopídeos foram realizadas por OGUMA & ASANA (1932) no Japão e NAVILLE & DE BEAUMONT (1933, 1936) na Europa, em que os últimos autores publicaram a primeira descrição do cariótipo com o total de 12 espécies estudadas (NEW 1984). A estas, foram adicionados dados de mais nove espécies estudadas no Japão, das quais seis foram analisadas por KICHIJO (1934), e três por HIRAI (1957). Posteriormente, SUOMALAINEN (1958) avaliou mais três espécies, totalizando assim 24 examinadas.

Em todos os estudos foram utilizadas preparações citológicas das gônadas, principalmente de tecidos masculinos, uma vez que estes contem células que se encontram em constantes divisões para a produção de espermatozoides. Contudo, observações de ambos os sexos foram imprescindíveis para distinguir os cromossomos sexuais (NEW 1984). NAVILLE & DE BEAUMONT (1933, 1936) observaram que na maioria dos exemplares estudados o cromossomo Y era notavelmente menor que o X, apresentando-se algumas vezes na forma de ponto; no entanto esta não é uma regra geral, visto que em *Chrysopa vulgaris* ambos os cromossomos sexuais possuíam tamanho semelhante (NEW 1984).

Dos estudos realizados por NAVILLE & DE BEAUMONT (1933, 1936), as espécies de Chrysopini examinadas citogeneticamente foram reunidas em quatro

grupos de acordo com as diferentes fórmulas cariotípicas (HIRAI 1957 e NEW 1984), e são eles: 1-) $2n=12$ em que todos os cromossomos possuem a morfologia telocêntrica, no entanto, alguns são descritos com terminações em forma de gancho, ou seja, com morfologia acrocêntrica; estas características foram observadas nas espécies *Chrysoperla carnea carnea* (descrita como *Chrysopa vulgaris*), *Chrysopa perla*, *Mallada prasina* (descrita como *Chrysopa aspersa* e *Chrysopa prasina*), *Mallada ventralis* (descrita como *Chrysopa ventralis*), *Chrysopa formosa* (descrita também como *Chrysopa japana*), *Mallada flavifrons* (descrita como *Chrysopa flavifrons*), *Mallada venosa* (descrita como *Chrysopa venosa*), *Chrysopa viridana*; 2-) $2n=10$, em que em relação aos cromossomos autosômicos 6 cromossomos apresentaram a morfologia telocêntrica e 2 submetacêntrica/metacêntrica, provavelmente devido a alguma fusão cêntrica. Neste grupo se encontra somente a espécie *Chrysopa pallens* (descrita como *Chrysopa septempunctata* e sua subespécie *cognata*); 3-) $2n=12$, cromossomos parte telocêntricos e parte fusionados, formando 2 pares submetacêntricos/metacêntricos, sendo dois maiores e dois menores, verificado nas espécies *Chrysopidia (Chrysotropia) ciliata* (descrita como *Chrysopa alba*), *Chrysopidia (Chrysotropia) japonica* (descrita como *Chrysopa japônica*); 4-) $2n=14$ em que todos os cromossomos são pequenos e possivelmente telocêntricos, observado nas espécies *Nineta vittata* (descrita como *Chrysopa (Nineta) vittata*, *Nineta flava* (descrita como *Chrysopa (Nineta) flava*), *Italochrysa italica*.

A partir dos dados acima, sugeriu-se uma possível evolução cromossômica para os Chrysopini. Assim, primeiramente inferiu-se sobre a possibilidade de relacionar as fórmulas cromossômicas do grupo 1 e 2 sendo que o par submetacêntrico do cariótipo do grupo 2 pode ter sido formado pela fusão cêntrica de dois elementos telocêntricos pertencentes ao grupo 1. No entanto, houve dificuldades na avaliação dos cariótipos das espécies dos grupos 3 e 4 em relação aos outros dois grupos (NEW 1984).

Além disso, outras observações sobre diferenças cromossômicas que podem vir a distinguir as espécies foram feitas, mas estas precisam ser analisadas com cautela, pois um número muito pequeno de exemplares foi analisado, e erros de identificação das espécies também foram posteriormente reconhecidos. Verificou-se, por exemplo,

que em *Chrysopa septempunctata* primeiramente foram analisados machos e posteriormente as fêmeas e constatou-se que a espécie tem 10 cromossomos, destes dois são submetacêntricos, seis telocêntricos e pequenos e dois são heteromórficos, designados como o par sexual, em que o Y possui a morfologia de um ponto (NEW 1984). Na espécie *Chrysopa vulgaris*, houve confusão entre espécies próximas devido a diferenças no tamanho do cromossomo Y, não ficando claro tratar-se da mesma espécie ou de espécies distintas. No entanto sabe-se que estas diferenças no tamanho dos cromossomos entre indivíduos da mesma espécie pode ocorrer em consequência do acréscimo ou perda de heterocromatina (SUMNER 1990).

Embora houvesse dúvida no reconhecimento das espécies *Chrysopa aspersa* e *Chrysopa prasina*, devido provavelmente a diferença no grau de condensação dos cromossomos, tornando o conjunto cromossômico com morfologia mais robusta em *Chrysopa prasina*, além da presença de um par autossômico com tamanho grande (NEW 1984), sabe-se que hoje ambas tratam-se da mesma espécie, que é *Mallada prasina*. Por outro lado os cromossomos de *Chrysopa ventralis* são sempre idênticos ao de *Chrysopa prasina*, porém com ausência do par autossômico de tamanho grande (NEW 1984), e neste caso sabe-se que hoje ambas as espécies são reconhecidas como distintas.

Realmente é complicado estabelecer os mecanismos de diferenciação cromossômica dos Chrysopinae. Assim, foram propostas duas hipóteses sobre qual a fórmula cariotípica ancestral para as espécies analisadas: a primeira hipótese diz que a fórmula básica é $2n = 12$, e as demais são derivadas desta (HIRAI 1957), e que um possível resultado para a redução no número cromossômico foram rearranjos do tipo fusão ($2n=12$ torna-se $2n=10$) e o aumento no número ocorreu devido a fissões ($2n=14$ torna-se $2n=12$); a segunda hipótese aceita duas fórmulas cariotípicas: $2n=12$ e $2n=14$, em que a diminuição no número é devido a rearranjos cromossômicos do tipo fusão cêntrica. No entanto, levando-se em consideração somente os dados obtidos com a subfamília Chrysopinae, a primeira hipótese reflete melhor a relação evolutiva dentro da família Chrysopidae e sugere uma modificação mais lógica para a provável filogenia (NEW 1984).

Ambas as hipóteses não levam em consideração dados obtidos em outras famílias de Neurópteros, que foram estudadas citogeneticamente, tampouco análises citogenéticas mais detalhadas que levem em consideração os cromossomos individualmente, e, além disso, foram analisadas muito antes do novo agrupamento dos crisopídeos, como por exemplo, o surgimento do gênero *Ceraeochrysa*. Assim, as hipóteses tem de ser interpretadas com cautela, e novos estudos, utilizando técnicas de coloração que avaliam os cromossomos individualmente precisam a ser adotadas para se estabelecer com maior clareza as estratégias que levaram a uma possível evolução cromossômica, e que permitem diferenciar as espécies citogeneticamente.

Assim, considerando a importância da família Chrysopidae, o elevado número de espécies neotropicais, as incertezas relacionadas à taxonomia, bem como a escassez de dados citogenéticos, o presente estudo teve o objetivo de caracterizar 18 espécies de Chrysopidae pertencentes à subfamília Chrysopinae e tribos Leucochrysi e Chrysopini, visando estabelecer as principais estratégias de diferenciação cromossômica, agregar dados citogenéticos e auxiliar a taxonomia da família.

REFERÊNCIAS

ADAMS, P.A.; PENNY, N.D. Neuroptera of the Amazon Basin. Part 11a. Introduction and Chrysopini. **Acta Amazonica**, Manaus, v.15, p. 413 – 479, 1987.

ALMEIDA, R.P.; STOUTHAMER, R. Molecular identification of *Trichogramma cacoeciae* Marchal (Hymenoptera: Trichogrammatidae): A new record for Peru. **Neotropical Entomology**, Londrina, v. 32, p. 269-272, 2003.

ASPÖCK, U; PLANT, J.D.; NEMESCHKAL, H.L. Cladistic analysis of neuroptera and their systematic position within Neuropterida (Insecta: Holometabola: Neuropterida: Neuroptera). **Systematic Entomology**, Oxford, v.26, n.1, p. 73-86, 2001.

BROOKS, S.J. An overview of the current status of Chrysopidae (Neuroptera) systematic. **Deutsche Entomologische Zeitschrift**, Berlin, v. 44, p. 267–275, 1997.

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

CADENA, P.; ÁNGEL, F.; GÓMEZ, L.A.; GONZÁLEZ, R. Diferenciación morfológica y molecular de especies de crisópidos (Neuroptera: Chrysopidae). **Revista Colombiana de Entomología**, Santafe de Bogota, v. 33, n. 2, p. 171-177, 2007.

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.(Ed.), **Controle biológico no Brasil: parasitóides e predadores**. São Paulo: Editora Manole, 2002. p.209-224.

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

GUERRA, M. **Introdução à Citogenética Geral**. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan S.A., 1988. 142p.

HENRY, C. S. The common green lacewing (*Chrysoperla carnea* s. lat.) and the sibling species problems). In: MCEWEN, P.; NEW, T.R.; WHITTINGTON, A.E. HEWITT, G.M., **Animal Cytogenetics 3. Insecta 1.**, Berlin: Gebrüder Borntraeger, 1979. 170p.

HIRAI, H. A cytotaxonomic study of the Chrysopidae (Neuroptera). **Journal of the Faculty of Science Hokkaido University**, Sapporo v. 13, n. 1-4, p. 219-223, 1957.

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

KICHIJO, H. The chromosomes of some Neuropterous insects of the family Chrysopidae. **Journal of the Faculty of Science Hokkaido University**, Sapporo, v. 3, p. 55 – 65, 1934.

MEGAHED, M.M.; ABOUD-ZEID, N.A. The predating efficiency of *Chrysopa carnea* Stephens on certain hosts. **Agricultural Research Review**, Cairo, v. 1, p. 201 – 207, 1982.

NAVILLE, A.; BEAUMONT, J de. Recherches sur les chromosomes des Nèvroptères. **Archives d'anatomie microscopique**, Paris, v. 29, p. 199 – 243, 1933.

NAVILLE, A.; BEAUMONT, J de. Recherches sur les chromosomes des Nèvroptères. **Archives d'anatomie microscopique**, Paris, v. 32, p. 271 – 302, 1936.

NEW, T.R. Taxonomic problems. In: CARNARD, M.; SEMÉRIA, Y.; NEW, T.R. **Biology of Chrysopidae**. (eds). 1984. cap 3, p.37-56.

OGUMA, K.; ASANA, J.J. Additional data on the dragonfly chromosome, with a note on occurrence of X – Y chromosome in the ant lion (Neuroptera). **Journal of the Faculty of Science Hokkaido University**, Sapporo, v.1, 1932.

PENNY, N. P. Order Neuroptera. In: TRIPLEHORN, C.; JOHNSON, N. **Borror and Delong's introduction to the study of insects**. Belmont: Thomson Brooks/Cole, 2005. p. 469-480.

PETITPIERRE E. Molecular cytogenetics and taxonomy of insects, with particular reference to the Coleoptera. **International Journal of Insect Morphology Embryology**, v. 25, p.115 – 134, 1996.

ROTHFELS, K.H. Cytological approaches to Black fly taxonomy. In: KIM, K.C.; MERRITT, R.W. (Eds.). **Black flies- Ecology, Population, management and Annotated world list**. Pennsylvania State University, University Park and London, 1988. p. 39 - 52.

SCHNEIDER, M.C.; ROSA, S.P.; ALMEIDA, M.C.; COSTA, C.; CELLA, D.M. Chromosomal similarities and differences among four Neotropical Elateridae (Conoderini and Pyrophorini) and other related species, with comments on the NOR patterns in Coleoptera. **Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research**, Berlin, v. 45, n. 4, p. 308 – 316, 2007.

SPEARS, B.B. The chromosomes of insects. **Science**, Champaign, v. 215, n. 4532, p. 498, 1982.

SUAMALAINEN, H. Chromosomal evolution in the Neuroptera. **Congres. Genet., Montreal.**, v. 2, p. 283, 1958.

SUMNER, A.T. **Chromosome banding**. London: Unwin Hyman, 1990.

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

CAPÍTULO 2 – DIFERENCIAÇÃO DE ESPÉCIES INTRAGENÉRICA E ESTRATÉGIAS DE EVOLUÇÃO CROMOSSÔMICA EM CHRYSOPIDAE: NEUROPTERA ATRAVÉS DA CARIOTIPAGEM

RESUMO – A família Chrysopidae inclui insetos predadores que são eficientes agentes de controle biológico de pragas. São descritas cerca de 1200 espécies de crisopídeos, em que a taxonomia se baseia em diferenças nos caracteres morfológicos externos e, mais recentemente no estudo da genitália. Em termos citogenéticos apenas 2% dos crisopídeos foi analisado. Assim, o presente estudo teve como objetivo realizar a análise citogenética de sete espécies do gênero *Leucochrysa* McLachlan, 1868 de ocorrência em Jaboticabal – SP, Brasil, através da técnica de coloração convencional a fim de acrescentar dados citogenéticos ao grupo, auxiliar a taxonomia e discutir os dados obtidos com as demais espécies citogeneticamente estudadas anteriormente, buscando estabelecer o processo de evolução cromossômica. As sete espécies analisadas exibiram número diplóide $2n=16$ e sistema de determinação sexual do tipo XY/XX, com exceção de *Leucochrysa (Nodita) marquezii* em que foram avaliados somente embriões. Foram verificadas diferenças interespecíficas quanto à morfologia dos cromossomos, o que permitiu, neste caso, realizar a distinção das espécies através da citogenética. As células diplotênicas meióticas obtidas em *Leucochrysa (Nodita) azevedoi*, *Leucochrysa (Nodita) cruentata*, *Leucochrysa (Nodita) lancala* e *Leucochrysa (Nodita) rodriguezii* exibiram sete bivalentes autossômicos com quiasmas terminais e dois univalentes sexuais assinápticos e aquiasmáticos.

Palavras-chave: características cromossômicas, citotaxonomia, crisopídeos.

Introdução

Chrysopidae é a segunda maior família da ordem Neuroptera, incluindo mais de 1200 espécies alocadas em aproximadamente 86 gêneros. Os crisopídeos estão distribuídos em todos os continentes, com exceção da Antártida (BROOKS & BARNARD 1990; BROOKS 1997) e muitas das espécies caracterizam-se como eficientes predadores e agentes de controle biológico de pragas (FREITAS 2001).

A classificação genérica e hierárquica da família foi, por muito tempo, baseada em caracteres morfológicos externos, seguido do estudo da genitália (BROOKS & BARNARD 1990). Recentemente, outras metodologias, como estudos baseados no DNA mitocondrial e nuclear estão sendo utilizados para a identificação das espécies, bem como para estabelecer as estratégias evolutivas na família Chrysopidae (WINTERTON & FREITAS 2006).

Taxonomicamente a família Chrysopidae está subdividida em três subfamílias: APOCHRYSAE, CHRYSOPINAE e NOTOCHRYSINAE. A subfamília Chrysopinae é a mais representativa em número de espécies, apresenta ampla distribuição geográfica, e inclui quatro tribos: Ankylopterygini Navás, 1910, Belonopterygini Navás, 1913, Chrysopini Schneider, 1851 e Leucochrysinini Adams, 1978 (BROOKS & BARNARD 1990).

A tribo Leucochrysinini é a mais abundante entre os crisopídeos (PENNY 2002), incluindo sete gêneros, dos quais *Leucochrysa* é o que possui maior número de espécies válidas (FREITAS & PENNY 2001). Segundo TAUBER et al. (2008), a identificação das espécies que pertencem a este gênero é difícil, devido ao elevado número de espécies, a semelhança das características externas entre espécies e a elevada variação intraespecífica.

Os dados citogenéticos da família são restritos a somente 24 espécies, o que equivale a apenas 2% de todo grupo. Estão limitados a tribo Chrysopini (OGUMA & ASANA 1932; NAVILLE & DE BEAUMONT 1933, 1936).

O número diplóide dos crisopídeos varia entre $2n=10$ a $2n=14$, sendo o $2n=12$ o número mais frequente, estando presente em 68% das espécies analisadas.

Adicionalmente, todas as espécies investigadas são portadoras do sistema cromossômico sexual do tipo XY/XX e naquelas em que a morfologia cromossômica foi descrita, verifica-se predominância de cromossomos telocêntricos (Tabela 1).

A alta frequência no número diploide $2n=12$ acarretou na formulação da hipótese de que talvez essa seja a fórmula cariotípica base para a família Chrysopidae (NEW 1984) e que as variações no número diploide e conseqüentemente na morfologia cromossômica é resultado de rearranjos cromossômicos.

Devido ao pequeno número de espécies de Chrysopidae analisadas não é ainda possível estabelecer os mecanismos da evolução cromossômica para o grupo. Em função disto e do grande número de espécies existentes na fauna brasileira, o objetivo deste estudo foi analisar citogeneticamente sete espécies de crisopídeos do gênero *Leucochrysa* (*Nodita*) tribo Leucochrysini através da técnica de coloração convencional visando realizar a primeira descrição de espécies desta tribo, acrescentar dados citogenéticos à família quanto ao número diplóide, o sistema cromossômico sexual e a morfologia cromossômica, e buscar estabelecer as estratégias de evolução cromossômica para o grupo. Além disto, os dados obtidos poderão contribuir para a taxonomia dos crisopídeos.

Tabela 1. Espécies de Chrysopinae caracterizadas citogeneticamente, com seus respectivos números diplóides, sistema cromossômico sexual e morfologia cromossômica. A- acrocêntrico; S- submetacêntrico; T- telocêntrico; a- todos os cromossomos pequenos.

Nomenclatura atual	Espécies estudadas	Fórmula cromossômica (2n-♂)	Morfologia cromossômica (autossômicos)	Referência
<i>Chrysopa abbreviata</i> (Curtis, 1834)	<i>Chrysopa abbreviata</i>	12 = 10 + XY	-	Suomalainen (1958)
<i>Chrysopa dorsalis</i> (Burmeister, 1839)	<i>Chrysopa dorsalis</i>	12 = 10 + XY	-	Suomalainen (1958)
<i>Chrysopa formosa</i> (Brauer, 1851)	<i>Chrysopa formosa</i>	12 = 10 + XY	10 ^a	Naville e de Beaumont (1936)
<i>Chrysopa formosa</i> (Brauer, 1851)	<i>Chrysopa japana</i> (Okamoto, 1919)	12 = 10 + XY	10 ^a	Kichijo (1934); Hirai (1957)
<i>Chrysopa intima</i> (McLachlan, 1893)	<i>Chrysopa intima</i>	12 = 10 + XY	-	Kichijo (1934); Hirai (1957)
<i>Chrysopa pallens</i> (Rambur, 1838)	<i>Chrysopa septempunctata</i> (Wesmael, 1841)	10 = 8 + XY	6T + 2S	Naville e de Beaumont (1933); Hirai (1957); Suomalainen (1958)
<i>Chrysopa pallens</i> (Rambur, 1838)	<i>Chrysopa cognatella</i>	10 = 8 + XY	6T + 2S	Kichijo (1934)
<i>Chrysopa perla</i> (Linnaeus, 1758)	<i>Chrysopa perla</i>	12 = 10 + XY	10 ^a	Naville e de Beaumont (1933)
<i>Chrysopa phyllochroma</i> (Wesmael, 1841)	<i>Chrysopa phyllochroma</i>	12 = 10 + XY	-	Kichijo (1934)
<i>Chrysopa sapporensis</i> Okamoto, 1914)	<i>Chrysopa sapporensis</i>	12 = 10 + XY	-	Kichijo (1934)
<i>Chrysopa viridana</i> (Schneider, 1845)	<i>Chrysopa viridana</i>	12 = 10 + XY	10 ^a	Naville e de Beaumont (1936)
<i>Chrysoperla carnea carnea</i> (Stephens, 1836)	<i>Chrysopa vulgaris</i> (Schneider, 1851)	12 = 10 + XY	10 ^a	Naville e de Beaumont (1933); Suomalainen (1958)
<i>Chrysoperla carnea carnea</i> (Stephens, 1836)	<i>Chrysopa kurisakiana</i> (Okamoto, 1914)	12 = 10 + XY	-	Kichijo (1934)
<i>Chrysopidia</i> (<i>Chrysotropia</i>) <i>ciliata</i> (Wesmael, 1841)	<i>Chrysopa alba</i> (Linnaeus, 1767)	12 = 10 + XY	T + A+ 4M	Naville e de Beaumont (1936)
<i>Chrysopidia</i> (<i>Chrysotropia</i>) <i>japonica</i> (Nakahara, 1915)	<i>Chrysopa japonica</i> (Nakahara, 1915)	12 = 10 + XY	T + A+ 4M	Kichijo (1934)
<i>Cunctochrysa albolineata</i> (Killington, 1935)	<i>Chrysopa albolineata</i>	12 = 10 + XY	-	Suomalainen (1958)
<i>Italochrysa italica</i> (Rossi, 1790)	<i>Italochrysa italica</i>	14 = 12 + XY	12A ^a	Seméria (New, 1984)
<i>Mallada cognatella</i> (Okamoto, 1914)	<i>Chrysopa cognatella</i>	12 = 10 + XY	-	Kichijo (1934)
<i>Mallada flavifrons</i> (Brauer)	<i>Chrysopa flavifrons</i>	12 = 10 + XY	10 ^a	Naville e de Beaumont (1933; 1936)
<i>Mallada formosana</i> (Brauer, 1851)	<i>Chrysopa yamamurae</i> (Nakahara, 1915)	12 = 10 + XY	-	Hirai (1957)
<i>Mallada parabola</i> (Okamoto, 1914)	<i>Chrysopa parabola</i>	12 = 10 + XY	-	Kichijo (1934)
<i>Mallada prasina</i> (Burmeister)	<i>Chrysopa aspersa</i> (Wesmael, 1841)	12 = 10 + XY	10 ^a	Naville e de Beaumont (1933; 1936)
<i>Mallada prasina</i> (Burmeister)	<i>Chrysopa prasina</i>	12 = 10 + XY	10 ^a	Naville e de Beaumont (1933; 1936); Suomalainen (1958)
<i>Mallada venosa</i> (Rambur, 1838)	<i>Chrysopa venosa</i>	12 = 10 + XY	10 ^a	Naville e de Beaumont (1933; 1936)
<i>Mallada ventralis</i> (Curtis, 1834)	<i>Chrysopa ventralis</i>	12 = 10 + XY	10 ^a	Naville e de Beaumont (1933; 1936); Suomalainen (1958)
<i>Nineta flava</i> (Scopoli, 1763)	<i>Chrysopa (Nineta) flava</i>	14 = 12 + XY	12A ^a	Suomalainen (1958)
<i>Nineta vittata</i> (Wesmael, 1841)	<i>Chrysopa (Nineta) vittata</i>	14 = 12 + XY	12A ^a	Naville e de Beaumont (1936)
<i>Semachrysa matsumarae</i> (Okamoto, 1914)	<i>Chrysopa matsumarae</i>	12 = 10 + XY	-	Hirai (1957); Suomalainen (1958)

Material e Métodos

Todos os espécimes do gênero *Leucochrysa* (*Nodita*) examinados neste trabalho (Tabela 2) foram coletados com o auxílio de redes entomológicas em pomares de citros e macadâmia, no *Campus* da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (UNESP), na cidade de Jaboticabal, São Paulo – Brasil durante o período de Junho de 2010 a Maio de 2011. Os “vouchers” foram depositados no Museu do Laboratório de Biossistemática, Biologia e Ecologia Molecular de Neurópteros, da mesma universidade.

Tabela 2. Espécies estudadas e número de exemplares analisadas

Espécie	Número de espécimes
<i>Leucochrysa</i> (<i>Nodita</i>) <i>azevedoi</i> Navás, 1913	2 machos
<i>Leucochrysa</i> (<i>Nodita</i>) <i>cruentata</i> Schneider, 1851	6 embriões/ 2 fêmeas/ e machos
<i>Leucochrysa</i> (<i>Nodita</i>) <i>ictericus</i> Freitas e Penny, 2001	2 fêmeas/ 3 machos
<i>Leucochrysa</i> (<i>Nodita</i>) <i>lancala</i> Banks, 1944	2 embriões/ 3 machos
<i>Leucochrysa</i> (<i>Nodita</i>) <i>marquezi</i> Navás, 1913	3 embriões
<i>Leucochrysa</i> (<i>Nodita</i>) <i>melchioni</i> Freitas e Penny, 2001	5 embriões/ 1 fêmea/ 2 machos
<i>Leucochrysa</i> (<i>Nodita</i>) <i>rodriguezii</i> Navás, 1913	11 embriões/ 2 fêmeas/ 3 machos

Após coletados, os exemplares foram levados ao laboratório e identificados quanto à morfologia externa pelo Prof. Dr. Sérgio de Freitas. Os machos foram rapidamente dissecados e as fêmeas mantidas por dois dias em gaiolas de oviposição (tubos de PVC revestidos com papel sulfite e fechados nas extremidades por tecido voile) e então dissecadas. Os ovos foram retirados diariamente e após um dia foram também dissecados para obtenção das preparações citológicas a partir dos embriões.

As preparações cromossômicas foram obtidas de embriões e de gônadas masculinas e femininas de indivíduos adultos seguindo a metodologia de WEBB et al. (1978) com modificações no tempo em que os tecidos permaneciam nas soluções. Os tecidos foram removidos em solução fisiológica (7,5g de NaCl; 2,38g de Na₂HPO₄; 2,72g de KH₂PO₄ em 1000 ml de água destilada), imersos em solução de colchicina (0,05% em solução fisiológica) por 30 minutos e após esse período foi adicionada igual quantidade de solução hipotônica (água de torneira) por 15 minutos. O material foi então fixado em solução de Carnoy I (3 parte de álcool metílico: 1 parte de ácido

acético) por no mínimo 30 minutos e transferido para uma lâmina, onde as gônadas foram maceradas em ácido acético 60% e os embriões em ácido acético 45% até a formação de uma suspensão celular. As lâminas foram secas em placa de metal a 40°C, e coradas em solução de Giemsa a 3% por 15 minutos.

As células gonadais e embrionárias foram observadas em microscópio de luz e as imagens foram obtidas com o auxílio de uma câmara MOTICAM acoplada ao microscópio utilizando o software IMAGE da Motic. Foram analisadas pelo menos 15 metáfases mitóticas de cada espécie, com exceção de *L. (N) azevedoi* e *L. (N) marquezii* em que o pequeno número de exemplares analisados não permitiu a obtenção de um alto número de metáfases. A morfologia cromossômica foi determinada de acordo com a nomenclatura proposta por LEVAN et al. (1964).

Resultados e Discussão

A análise das células metafásicas mitóticas de indivíduos machos e fêmeas adultos e de embriões das sete espécies do gênero *Leucochrysa (Nodita)* revelou o número diplóide $2n=16$ (Figuras 1, 2 e 3), o qual é um número inédito para a subfamília Chrysopinae. As demais espécies anteriormente estudadas exibiram pouca variação cariotípica, sendo o cariótipo $2n=12$ com todos os cromossomos com morfologia telocêntrica, registrado em mais da metade das espécies analisadas levantando a hipótese de que possivelmente esta seja a fórmula cariotípica ancestral para a subfamília Chrysopinae (HIRAI 1957; NEW 1984).

No entanto, ASANA & KICHIJO (1936) verificaram que em outros neurópteros estudados citogeneticamente ocorreram números diploides maiores que $2n=12$ e com variação na morfologia cromossômica, como na família Myrmeleotidae (Myrmeleontiformia) e na família Ascalaphidae (Myrmeleontiformia), em que o número foi de $2n=16$ e $2n=22$ respectivamente.

O sistema cromossômico sexual observado nas sete espécies foi do tipo XY/XX, que somente não pode ser efetivamente confirmado em *L. (N) marquezii*, pois foram

analisados apenas embriões, embora devido ao diagnóstico de um par heteromórfico, este foi mencionado no presente trabalho como o par sexual (Figuras 1, 2 e 3). Quanto a morfologia, os cromossomos de todas as espécies foram classificados como telocêntricos (Figura 1 e 2), com exceção do par 3 submetacêntrico de *L. (N) ictericus* (Figura 1) e *L. (N) rodriguezi* (Figura 3), e dos pares 1, 2 e 3 de *L. (N) michelini* (Figura 2) que possuem morfologia metacêntrica, subtlocêntrica e submetacêntrica, respectivamente. Adicionalmente, nesta última espécie o cromossomo sexual X também exibiu morfologia metacêntrica.

As diferenças morfológicas refletiram no número fundamental dos autossomos, em que nas espécies que apresentaram todos os autossomos telocêntricos o número fundamental foi 14, enquanto que em *L. (N) ictericus*, *L. (N) michelini* e *L. (N) rodriguezi* foram de 16, 20 e 16, respectivamente. De acordo com KASAHARA (2009), números fundamentais diferentes observados em espécies próximas com o mesmo número diplóide indicam que o mecanismo responsável pelas diferenças no cariótipo deve ser predominantemente inversões pericêntricas.

O estudo cariotípico de todas as espécies revelou que os cromossomos autossômicos decrescem gradualmente em tamanho, exceto em *L. (N) azevedoi* onde os autossomos puderam ser classificados como de tamanho grande (pares 1, 2 e 3) ou pequeno (pares 4, 5, 6 e 7) (Figuras 1a e 1b). Quanto aos cromossomos sexuais, em todas as espécies o cromossomo X exibiu-se maior que o Y, e em *L. (N) azevedoi* ambos possuem tamanho grande (Figura 1), sendo os maiores elementos do cariótipo, em *L. (N) cruentata*, *L. (N) lancaia* e *L. (N) marquezii* tamanho mediano (Figuras 1 e 2), em *L. (N) michelini* o cromossomo X possui tamanho médio e o Y pequeno (Figuras 2c e 2d) e em *L. (N) ictericus* e *L. (N) rodriguezi* o X possui tamanho médio e o Y é puntiforme (Figuras 1 e 3).

Os cariótipos de *L. (N) ictericus* e *L. (N) rodriguezi* diferiram apenas no tamanho do cromossomo sexual X, que apresentou-se maior em *L. (N) ictericus*. Morfológicamente, ambas as espécies são bastante semelhantes e evolutivamente próximas (BROOKS & BARNARD 1990). Segundo SUMNER (1990, 2003), este tipo de variação no tamanho cromossômico em indivíduos da mesma espécie e mesmo em

homólogos do mesmo indivíduo pode ser devido ao acúmulo ou deleção de heterocromatina, tornando-se uma forma de evolução cromossômica. Desta forma, não se pode descartar, neste caso, a possibilidade de que ambas as espécies são na realidade apenas uma e que possuem variações intraespecíficas em relação à morfologia externa, ou que *L. (N) ictericus* e *L. (N) michelini* sofreram eventos de especiação, sendo, por isso, necessário novas análises.

Foi observado em todos os exemplares analisados de *L. (N) cruentata* a presença de uma constrição secundária em um dos homólogos do par 5 (Figura 4), o que pode estar relacionado a uma região organizadora do nucléolo. Em uma célula metafásica de uma fêmea esta mesma característica foi também observada (Figura 4), o que, no entanto, não ocorreu em todos os exemplares analisados. Além disso, algumas metáfases de fêmeas, machos e embriões exibiram uma região com coloração diferencial em ambos homólogos do par 1 e no cromossomo X (Figura 4), que não ficou claro se tratar de uma constrição secundária ou a presença de um cromossomo supernumerário.

A presença de constrições que podem vir a ser caracterizadas como regiões organizadoras de nucléolo em Neuroptera é uma observação inédita, ou seja, nos demais 33 neurópteros, pertencentes tanto à família Chrysopidae como às famílias Myrmeleontidae e Ascalaphidae anteriormente estudados não foi relatado nenhum caso (ASANA & KICHIJO 1936), E o mesmo acontece com a presença de cromossomos supernumerários. No entanto em grupos próximos, como coleópteros, que foram caracterizados por ASPÖCK et al. (2001) como grupo irmão dos neuropteros, está característica já foi relatada, e de acordo com SMITH & VIRKKI (1978) esta presente em cerca de 50 espécies.

Foram obtidas células diplotênicas testiculares meióticas apenas nas espécies *L. (N) azevedoi*, *L. (N) cruentata*, *L. (N) lancala* e *L. (N) rodriguezii* (Figura 4), que apareceram em baixa frequência. Em todas as espécies observou-se a formação de bivalentes autossômicos com quiasmas terminais e univalentes sexuais assinápticos e aquiasmáticos (Figura 4). Somente em uma célula de *L. (N) lancala* observou-se uma possível formação de um bivalente sexual, que se formou devido a uma pequena

homologia entre os cromossomos, mas que acabaram sofrendo segregação precoce, além disso, neste caso todos os bivalentes exibiram isopicnose.

Em *L. (N) azevedoi* foi observada em um dos bivalentes a presença de uma constrição secundária (Figura 5), que não foi notada na análise das células mitóticas. Esta constrição pode estar relacionada ao centrômero ou a região organizadora do nucléolo, ou mesmo a um tipo especial de cromatina que apresenta diferença quanto à condensação ou coloração, e por isso, é necessária a observação de mais células para confirmar a presença da constrição.

Essas características relacionadas ao comportamento meiótico foram observadas em todos os outros 33 Neurópteros estudados. Contudo, tanto no trabalho de ASANA & KICHIJO (1936) quanto no de HIRAI (1957), os cromossomos sexuais exibiram-se como bivalentes, mas com segregação precoce, e nas espécies aqui estudadas são univalentes sexuais. No entanto, se o bivalente sexual demonstra segregação precoce é porque, provavelmente, os cromossomos possuem pouca homologia e, por isso, num diplóteno mais tardio comportam-se como univalentes, como observado neste trabalho (Figura 5).

As análises cariotípicas realizadas anteriormente por NEW (1984) sugerem duas hipóteses quanto à evolução cromossômica. Na primeira o número diplóide $2n=12$ com cromossomos com morfologia telocêntrica é a fórmula cariotípica ancestral para a família Chrysopidae, a partir da qual os cariótipos das demais espécies foram se originando através de uma série de rearranjos; a segunda hipótese admite duas fórmulas básicas, $2n=12$ e $2n=14$ que provém de um ancestral com número diplóide desconhecido, e que devido a fusões e quebras foram originando as demais fórmulas cromossômicas.

Admitindo-se que o número diplóide $2n=14$ formou-se devido a fissões cromossômicas, fato este comprovado pela diminuição no tamanho dos cromossomos (NEW 1984), provavelmente, os cromossomos das espécies aqui analisadas podem também ter sofrido quebras, uma vez que o tamanho dos cromossomos de *Leucochrysa* são menores quando comparado com os cromossomos das espécies dos gêneros *Chrysoperla* e *Ceraeochrysa*. No entanto, para que isso acontecesse seriam

necessários muitos rearranjos, como inversões, seguidas de fissões e novamente inversões, principalmente nas espécies que apresentaram cromossomos submetacêntricos e metacêntricos como *L. (N) michelini*. Além disso, para que pedaços cromossômicos tornem-se funcionais é necessária a presença de centrômeros, ainda que sejam relatados casos drásticos onde o número diplóide cromossômico foi duplicado devido a fissões (GUERRA 1988).

Assim, neste caso, a evolução cromossômica pode ter ocorrido a partir do número diplóide $2n=16$ em que através de rearranjos como inversões pericêntricas seguidas de fusões se originaram as demais fórmulas, levando-se também em conta que, como já observado, houve diferença no número fundamental e, nas demais espécies anteriormente analisadas por HIRAI (1957) e NEW (1984), houve aumento no tamanho cromossômico.

Nas demais espécies de Neuropteros estudadas, mas que, porém, pertencem à subfamília Myrmelentoformia, este número diploide já havia sido registrado, assim como, números diploides superiores. De acordo com ASPÖCK et al. (2001), a partir de uma análise cladística utilizando-se 36 características morfológicas de adultos e larvas as subfamílias Myrmeleontiformia e Hemerobiiformia são consideradas grupos irmão com algumas características sinaptomórficas.

Além disso, os Neurópteros, juntamente com as ordens Megaloptera e Raphidioptera formam um grupo chamado de Neuropterida (ASPÖCK et al. 2001). Este grupo, de acordo com o mesmo autor, é considerado em função de sua posição sistemática entre os holometábolos como grupo irmão da ordem Coleoptera. Esta ordem está dividida em quatro subordens, em que as relações filogenéticas ainda são pouco conhecidas (SCHNEIDER et al. 2007). No entanto, em relação à citogenética, as subordens Adephaga e Polyphaga são as mais estudadas, em que é relatada grande diversidade de números diploides e sistema de determinação sexual.

A subordem Adephaga possui fórmula cariotípica ancestral $2n = 36 + X_0$ (GALIÁN & LAWRENCE 1993) e a subordem Polyphaga $2n = 18 + X_{y_p}$ (SMITH & VIRKKI 1978), no entanto, nesta última o número diploide varia de $2n = 4$ a $2n = 23$

(FERREIRA et al. 1984 e VIRKKI 1962), em função de uma série de rearranjos cromossômicos.

Estas informações sobre a proximidade das relações filogenéticas entre as ordens Neuroptera e Coleoptera corroboram a hipótese sobre a evolução cromossômica na família Chrysopidae a partir de um número diploide superior a $2n = 12$, como havia sido proposto por NEW (1984).

Estudando a família Buprestidae (Coleoptera), MOURA et al. (2008) verificaram que a variação e evolução cromossômica ocorreu, provavelmente, a partir de um número diplóide maior, que foi sofrendo rearranjos sucessivos originando espécies com diminuição no número cromossômico.

Apenas com técnicas de coloração convencional não é possível afirmar se os cromossomos participantes de todos os rearranjos descritos nas diferentes espécies são homeólogos, tampouco se em cada espécie os rearranjos ocorreram de forma independente. Para isto são necessárias análises mais detalhadas com técnicas de coloração diferencial que permitem identificação individual dos cromossomos.

No entanto, foi possível caracterizar citogeneticamente as espécies analisadas e em alguns casos, como em *L. (N) azevedoi* e *L. (N) cruntata*, utilizar as diferenças cariotípicas para auxiliar na taxonomia. Assim, ainda que baseados apenas em coloração convencional, a citogenética tem se mostrado de grande utilidade para a diferenciação entre espécies, como relatado por WHITE (1973) e HEWITT (1979) em vários grupos de Orthoptera. Além disso, comparando-se os dados obtidos com as demais espécies da ordem Neuroptera anteriormente estudadas, assim como com os dados citogenéticos da ordem Coleoptera foi possível inferir novas hipóteses sobre a evolução cromossômica do grupo.

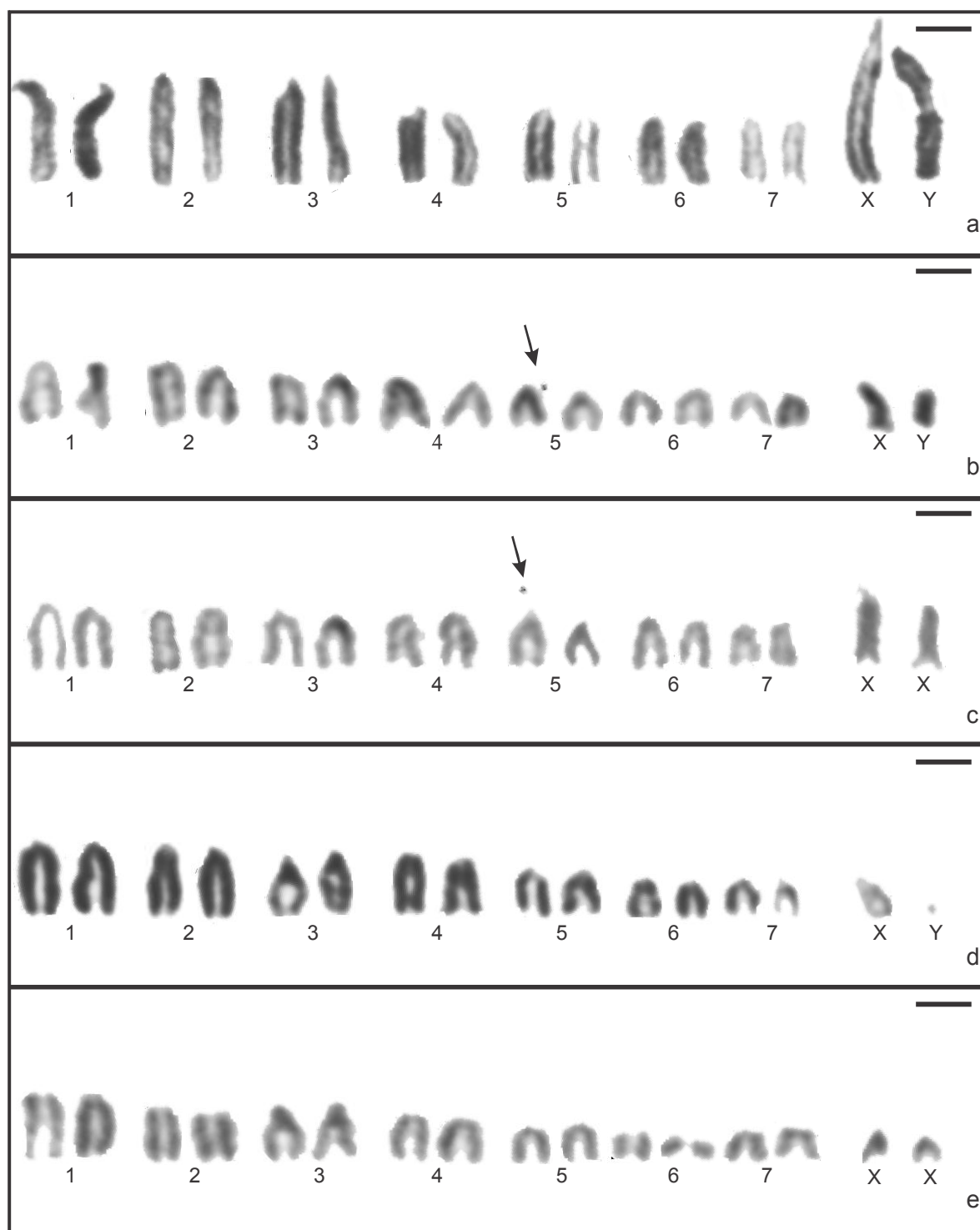


Figura 1. Cariótipos de espécies de *Leucochrysa (Nodita)* submetidos à coloração com Giemsa, mostrando $2n=16$ e sistema cromossômico sexual XY/XX. **a.** *Leu. (N) azevedoi* (♂); **b.** *Leu. (N) cruentata* (♂); **c.** *Leu. (N) cruentata* (♀) **d.** *Leu. (N) ictericus* (♂); **e.** *Leu. (N) ictericus* (♀). A seta indica a presença de constrição secundária em um dos homólogos do par 5. Escala 30µm

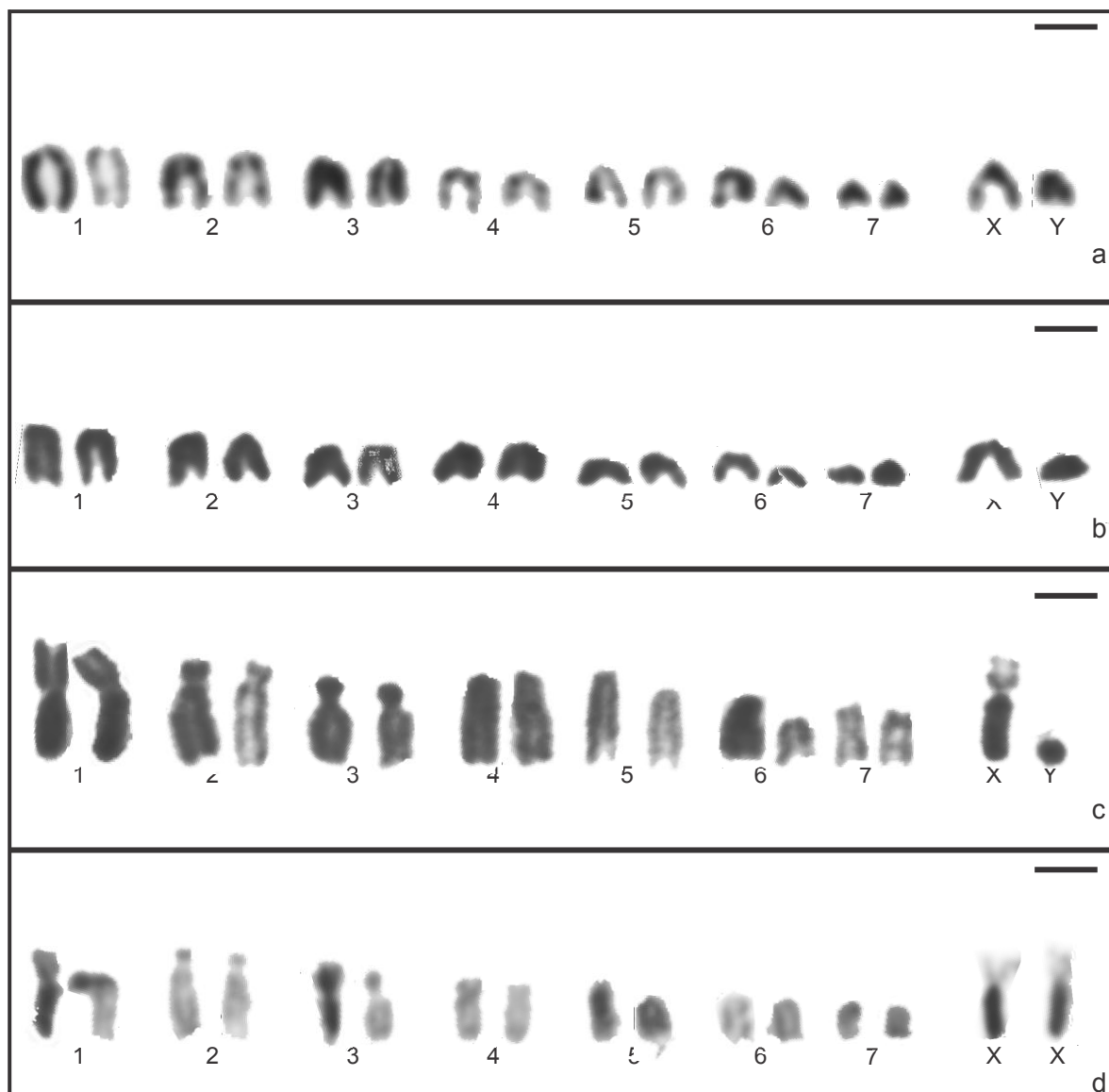


Figura 2. Cariótipos de espécies de *Leucochrysa (Nodita)* submetidos à coloração com Giemsa, mostrando $2n=16$ e sistema cromossômico sexual XY/XX. **a.** *Leu. (N) lancala* (♂); **b.** *Leu. (N) marquezii* (♂); **c.** *Leu. (N) michelini* (♂); **d.** *Leu. (N) imichelini* (♀). Escala 30 μ m.

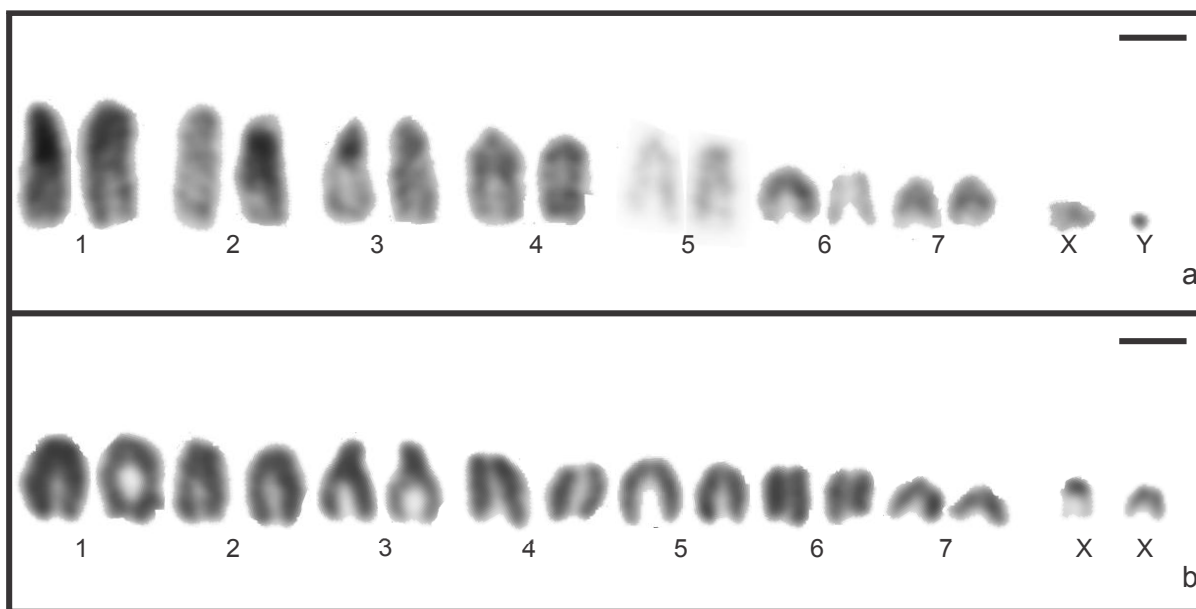


Figura 3. Cariótipo de *Leucochrysa (Nodita) rodriguezi* nos machos (a) e nas fêmeas (b) submetidos à coloração com Giemsa, mostrando $2n=16$ e sistema cromossômico sexual XY. Escala $30\mu\text{m}$.

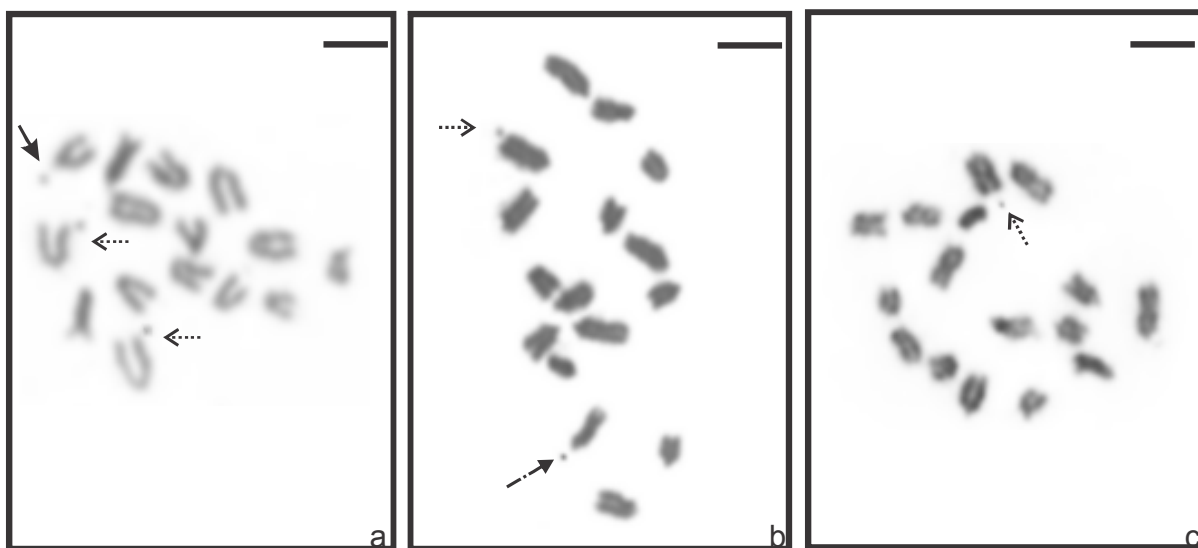


Figura 4. Metáfases mitóticas de fêmea (a) e embriões (b e c) de *Leu. (N) cruentata* coradas com Giemsa. A seta preta exibe a constrição secundária em um dos homólogos do par 5, a seta pontilhada exibe constrição secundária no par 1 e a seta tracejada a presença de constrição secundária no cromossomo sexual X. Escala $30\mu\text{m}$.

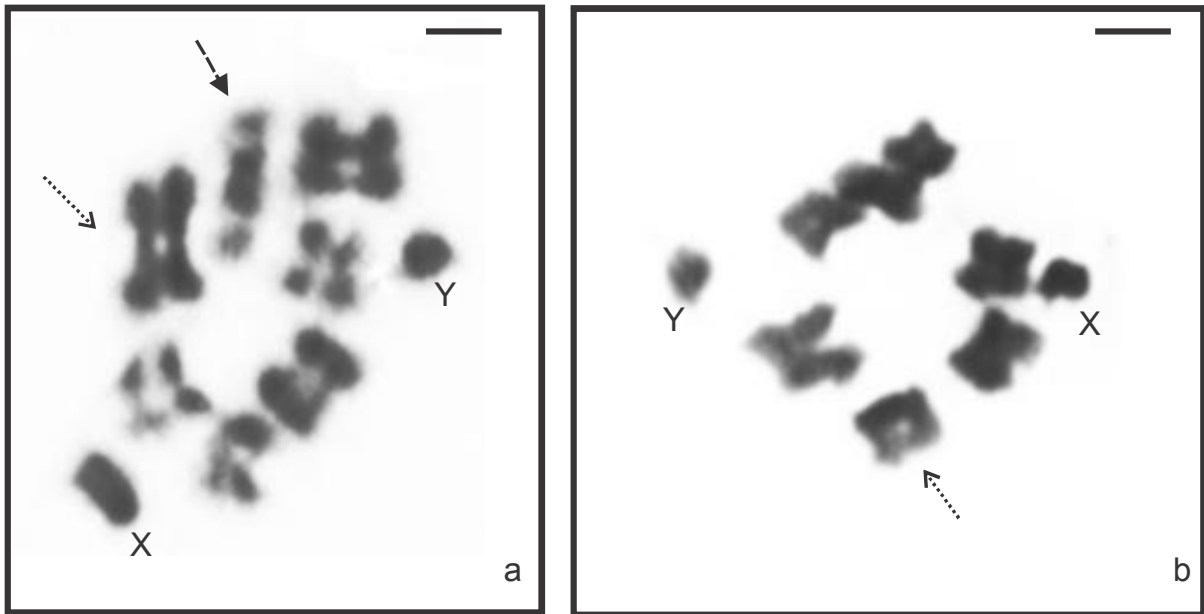


Figura 5. Células diplotênicas coradas com Giemsa. Diplóteno com $2n = 7II + XY$ em **a.** *Leu. (N) azevedoi*; **b.** *Leu. (N) cruentata*; As células diplotênicas exibem bivalentes com um quiasma terminal (seta pontilhada). A seta tracejada exhibe constrição secundária em um bivalente de *Leu. (N) azevedoi*. Escala $30\mu\text{m}$.

REFERÊNCIAS

ASANA, J.J.; KICHIJO, H. The chromosomes of six species of ant-lions (Neuroptera). **Journal of the Faculty of science Hokkaido Imperial University**, Sapporo, v. 5, n. 2, p. 121-136, 1936.

ASPÖCK, U; PLANT, J.D.; NEMESCHKAL, H.L. Cladistic analysis of neuroptera and their systematic position within Neuropterida (Insecta: Holometabola: Neuropterida: Neuroptera). **Systematic Entomology**, Oxford, v.26, n.1, p. 73-86, 2001.

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

BROOKS, S.J. An overview of the current status of Chrysopidae (Neuroptera) systematic. **Deutsche Entomologische Zeitschrift**, Berlin, v. 44, n. 2, p. 267 – 275, 1997.

FERREIRA, A.; CELLA, D.M.; TARDIVO, J.R.; VIRKKI, N. Two pairs of chromosomes: a new low record for Coleoptera. **Revista Brasileira Genética**, Ribeirão Preto, v. 7, p. 231–239, 1984.

FREITAS, S. **O uso de Crisopídeos no controle biológico de pragas**. 1° ed. Jaboticabal: Funep, 2001. 66 p.

FREITAS, S.; PENNY, N.P. 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.

GALIÁN, J.; LAWRENCE, J.F. First karyotypic data on a cupedid beetles (Coleoptera: Archostemata) showing achiasmatic meiosis. **Entomological News**, v. 102, p. 83–87, 1993.

GUERRA, M. **Introdução à Citogenética Geral**. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan S.A., 2001. 142p.

HEWITT, G.M. **Animal Cytogenetics 3. Insecta 1**. Berlin: Gebrüder Borntraeger, 1979. 170p.

HIRAI, H. A cytotaxonomic study of the Chrysopidae (Neuroptera). **Journal of the Faculty of Science Hokkaido University**, Sapporo v. 13, n. 1-4, p. 219-223, 1957.

KASAHARA, S. **Introdução à pesquisa citogenética de vertebrados**. 1° ed. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, 2009. 160p.

LEVAN, A.; FREDGA, K.; SANDBERG, A.A. Nomenclature for centromeric position of chromosomes. **Hereditas**, Lund, v. 52, p. 201-220, 1964.

MOURA, R.C.; MELO, F.N.; SOUZA, M.J. High Levels of Chromosomal Differentiation in *Euchroma gigantean* L. 1735 (Coleoptera, Buprestidae). **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v. 31, n. 2, p. 431-437, 2008.

NAVILLE, A.; BEAUMONT, J de. Recherches sur les chromosomes des Nèvroptères. **Archives d'anatomie microscopique**, Paris, v.29, p. 199 – 243, 1933.

NAVILLE, A.; BEAUMONT, J de. Recherches sur les chromosomes des Nèvroptères **Archives d'anatomie microscopique**, Paris, v. 32, p. 271 – 302, 1936.

NEW, T.R. Taxonomic problems. In CARNARD, M.; SEMÉRIA, Y.; NEW, T.R. (eds). **Biology of Chrysopidae**. 1984. p.37-56.

OGUMA, K.; ASANA, J.J. Additional data on the dragonfly chromosome, with a note on occurrence of X – Y chromosome in the ant lion (Neuroptera). **Journal of the Faculty of science Hokkaido Imperial University**, Sapporo, Serie VI, v.1, 1932.

PENNY, N.P. A guide to the lacewings (Neuroptera) of Costa Rica. **Proceedings of the California Academy of Sciences**, São Francisco, v.53, n. 12, p. 161 - 457, 2002.

SCHNEIDER, M.C.; ROSA, S.P.; ALMEIDA, M.C.; COSTA, C.; CELLA, D.M. Chromosomal similarities and differences among four Neotropical Elateridae (Conoderini and Pyrophorini) and other related species, with comments on the NOR patterns in Coleoptera. **Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research**, Berlin v. 45, n. 4, p. 308 – 316, 2007.

SMITH, S.G.; VIRKKI, N. **Animal Cytogenetics 3. Insecta 5. Coleoptera**. Berlin: Gebrüder Borntraeger, 1978. 366p.

SUMNER, A.T. **Chromosome banding**. London: Unwin Hyman, 1990.

SUMNER, A.T. **Chromosomes Organization and Function**. North Berwick: Blackwell Publishing, 2003. 287p.

TAUBER, C.A.; ALBUQUERQUE, G.S.; TAUBER, M.J. A new species of *Leucochrysa* and a redescription of *Leucochrysa (Nodita) clepsydra* Banks (Neuroptera: Chrysopidae). **Zootaxa**. v. 1781, p. 1 – 19, 2008.

VIRKKI, N. On the cytology of some neotropical elaterids (Coleoptera), with special reference to the neo-XY of the Pyrophorini. **Annales Academiae Scientiarum Fennicae**, Helsinki, v. 61, p. 1–21, 1962.

WHITE, M.J.D. **Animal Cytology and Evolution**. London: Cambridge University Press, 1973. 961p.

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

CAPITULO 3 - ANÁLISE CITOGENÉTICA DE ESPÉCIES NEOTROPICAIS DE *CERAEOCHRYSA* (NEUROPTERA: CHRYSOPIDAE)

RESUMO – O gênero *Ceraeochrysa* (Adams, 1982) inclui insetos conhecidos por sua potencialidade no controle biológico de pragas. No entanto, a taxonomia do grupo apresenta muitas lacunas, isto porque as espécies que o compõem exibem semelhança interespecífica. O objetivo deste estudo foi realizar a análise citogenética através do método de coloração convencional em que foi observado o número diplóide, morfologia, tamanho e rearranjos cromossômicos, sistema de determinação sexual e comportamento meiótico em células diplotênicas de sete espécies de crisopídeos do gênero *Ceraeochrysa*. Os resultados demonstraram que neste caso foi possível fazer a distinção das espécies através de métodos citogenéticos, no entanto análises mais detalhadas necessitam ser feitas para concluir sobre as estratégias de evolução cromossômica do grupo.

Palavras-chave: crisopídeos, cromossomo, taxonomia.

Introdução

Ceraeochrysa (ADAMS1982) caracteriza-se por apresentar coloração verde e manchas vermelhas ou marrons na lateral do pronoto (TAUBER et al. 2000). As espécies distribuem-se desde o Canadá até a Argentina (SOSA & FREITAS 2010), e exibem sua maior diversidade e abundância nos trópicos, sendo considerado nesta região o maior gênero da tribo Chrysopini (FREITAS & PENNY 2001).

Anteriormente, as espécies de *Ceraeochrysa* faziam parte do grupo *Chrysopa*, sendo a descrição baseada na morfologia externa (FREITAS et al. 2009). Em 1982, ADAMS observou diferenças na genitália e instituiu o gênero *Ceraeochrysa*.

FREITAS et al. (2009) fez uma nova revisão do gênero baseada nos caracteres externos e, principalmente, na genitália. Neste estudo foram listadas 63 espécies Neotropicais. No entanto, ainda existem sérias complicações quanto à alocação das espécies no gênero *Ceraeochrysa*, principalmente, daquelas que foram descritas exclusivamente a partir de espécimes femininos e de machos tenerais (SOSA & FREITAS 2011).

De acordo com FREITAS & PENNY (2001), o estudo do gênero é bastante importante, pois, grande número destas espécies habitam agroecossistemas e contribuem para o controle biológico de pragas. A liberação incorreta de espécies de crisopídeos pode constituir um sério problema, pois o inseto pode não estar associado à praga ou mesmo às condições ambientais do sítio de liberação, resultando no fracasso de um programa de controle biológico (DE ALMEIDA & STOUTHAMER 2003).

Novas metodologias vêm sendo adotadas a fim de auxiliar nas descrições taxonômicas das espécies, o que conseqüentemente irá minimizar possíveis falhas em programas de controle biológico, bem como estabelecer estratégias de evolução do grupo. Como, por exemplo, estudos da biologia molecular, a partir de genes mitocondriais e nucleares (WINTERTON & FREITAS 2006; MORALES & FREITAS 2010) e da citogenética.

Em relação à citogenética dos crisopídeos, os estudos são bastante escassos e incipientes. De acordo com NEW (1984), das cerca de 1200 espécies válidas, apenas 24 foram descritas citogeneticamente por NAVILLE & DE BEAUMONT (1933, 1936) na Europa e por OGUMA & ASANA (1932) no Japão.

A fim de agregar dados citogenéticos, de auxiliar a taxonomia, e ajudar a compreender a evolução cromossômica do grupo, o objetivo deste estudo foi caracterizar sete espécies do gênero *Ceraeochrysa* quanto ao número, morfologia e tamanho dos cromossomos, sistema de diferenciação do sexo e possíveis rearranjos cromossômicos.

Materiais e Métodos

Os espécimes de *Ceraeochrysa* analisados neste trabalho (Tabela 1) foram coletados com o auxílio de redes entomológicas, em pomares de citros e macadâmia, no *Campus* da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (UNESP), na cidade de Jaboticabal, São Paulo – Brasil, durante o período de Junho de 2010 a Maio de 2011. A identificação foi realizada em laboratório pelo Prof. Dr. Sérgio de Freitas, levando-se em conta características da morfologia externa e também o estudo da genitália. Os “vouchers” foram depositados no Museu do Laboratório de Biossistemática, Biologia e Ecologia Molecular de Neurópteros da mesma faculdade.

Após a coleta, os machos foram primeiramente dissecados e as fêmeas foram mantidas por cerca de dois dias em gaiolas de criação (tubos de PVC revestidos com papel sulfite e fechados nas extremidades por tecido voile) para realizarem a oviposição, e após este período foram dissecadas. Os embriões foram obtidos de ovos de dois dias.

As preparações cromossômicas foram obtidas de embriões e de gônadas masculinas e femininas de indivíduos adultos (WEBB et al. 1978, adaptado). Os tecidos foram removidos em solução fisiológica (7,5g de NaCl; 2,38g de Na₂HPO₄; 2,72g de KH₂PO₄ em 1000ml de água destilada) e imersos em solução de colchicina (0,05% em solução fisiológica) por 30 minutos e depois foi acrescentado igual quantidade de solução hipotônica (água de torneira) por 15 minutos. O material foi então fixado em solução de Carnoy I (3 parte de álcool metílico: 1 parte de ácido acético) por pelo menos 30 minutos e transferido para uma lâmina, onde as gônadas foram maceradas em ácido acético 60%, e os embriões em ácido acético 45% até a formação de uma suspensão celular. As lâminas foram secas em placa de metal a 40°C, e coradas em solução de Giemsa a 3%, por 15 minutos.

As metáfases foram observadas em microscópio de luz e as imagens foram obtidas com o auxílio de uma câmara MOTICAM acoplada ao microscópio, utilizando o software IMAGE da Motic. Foram analisadas pelo menos 15 metáfases mitóticas de cada espécie, com exceção de *Ceraeochrysa claveri*, em que se analisaram apenas

cinco metáfases. A morfologia cromossômica foi determinada de acordo com a nomenclatura proposta por LEVAN et al. (1964).

Tabela 1. Espécies estudadas e número de exemplares analisados

Espécie	Número de indivíduos/embriões analisados
<i>Ceareochrysa caligata</i> (Banks, 1946)	3 fêmeas/ 7 machos/ 6 embriões
<i>Ceraeochrysa cincta</i> (Schneider, 1851)	4 fêmeas/ 10 machos/ 17 embriões
<i>Ceraeochrysa claveri</i> (Navás, 1911)	3 machos
<i>Ceraeochrysa displepis</i> (Freitas & Penny, 2001)	2 machos
<i>Ceareochrysa everes</i> (Banks, 1920)	3 fêmeas/ 6 machos/ 8 embriões
<i>Ceraeochrysa sanchezi</i> (Navás, 1924)	1 macho
<i>Ceraeochrysa tucumana</i> (Navás, 1919)	2 fêmeas/ 2 machos/ 8 embriões

Resultados e Discussão

A análise de metáfases mitóticas de células do testículo e ovários de indivíduos adultos e de embriões revelou que as sete espécies estudadas possuem sistema de determinação sexual do tipo XY/XX (Figura 1), característica observada nas demais 33 espécies de neuropteros investigados anteriormente (ASANA & KICHIJO 1936; HIRAI 1957). Em todas as espécies o cromossomo X exibiu-se maior que o Y, onde em *Ce. caligata*, *Ce. cincta*, *Ce. displepis*, *Ce. everes* e *Ce. sanchezi* (Figuras 1a – e) ambos os sexuais são os menores elementos do conjunto, e em *Ce. tucumana* (Figura 1f) o cromossomo X possui tamanho grande e o Y tamanho mediano.

Com exceção de *Ce. sanchezi*, que exibiu número diploide $2n = 8$ (Figura 1e), as demais espécies possuem número diploide $2n=12$ e morfologia cromossômica do tipo telocêntrica, semelhante ao observado em 68% das espécies de crisopídeos já estudadas (NEW 1984; HIRAI 1957). Em *Ce. sanchezi* a diminuição no número diploide refletiu na morfologia cromossômica, que é submetacêntrica (par 1), metacêntrica (par 2) e telocêntrica (par 3 e cromossomos sexuais).

O número diploide $2n = 12$ foi o mesmo observado em espécies dos gêneros *Chrysoperla*, *Chrysopa*, *Chrysopidia* e *Mallada* (NEW 1984), mas somente sabe-se com certeza que o gênero *Chrysoperla* possui todos os cromossomos telocêntricos. Em

Chrysopidia há presença de cromossomos metacêntricos e em *Mallada* os resultados não são precisos, uma vez que não foi definida a morfologia cromossômica de todas as espécies estudadas. Quanto ao gênero *Chrysopa* algumas das espécies anteriormente analisadas apresentaram número diploide $2n=10$ com variação na morfologia cromossômica. Além disso, no trabalho realizado por WINTERTON & FREITAS (2006) observou-se através de análises moleculares que o gênero *Ceraeochrysa* forma juntamente com *Chrysoperla* um clado e, é grupo irmão de *Chrysopa*, atestando assim por meio de diferentes metodologias a variação observada por dados citogenéticos.

O número diploide $2n = 8$ observado em *Ce. sanchezi* é inédito na família Chrysopidae, no entanto números diploides inferiores foram registrados em outras ordens de insetos, como $2n = 4$ em uma espécie de Coleoptera por FERREIRA et al. (1984), e $2n = 2$ em uma espécie de Hymenoptera (BORGES et al. 2004).

A diminuição no número diploide de *Ce. sanchezi* pode ter sido resultado de rearranjos cromossômicos do tipo fusão cêntrica (SUMNER 2003). Segundo o mesmo autor, estes tipos de rearranjos que geram mudanças na morfologia cromossômica podem ser evidências de processos evolutivos. Embora se tenha observado a redução no número diploide, o mesmo não ocorreu no número fundamental autossômico, que manteve-se igual a dez em todas as espécies analisadas, corroborando a hipótese sobre fusão cêntrica entre os autossomos de *Ce. sanchezi*.

SCHNEIDER et al. (2007a), no trabalho com a família Elateridae, observaram diferenciação cariotípica, com variação no número diploide, e sugeriu que muitas das diferenças cromossômicas ocorreram, provavelmente, devido a rearranjos cromossômicos, como inversões pericêntricas e fusões.

De acordo com PALESTIS et al. (2004), o polimorfismo cromossômico resultante de mudanças cêntricas são comuns em insetos, como exibido por Orthópteros, por isso, são reportados vários casos em que espécies relacionadas diferem entre si por inversões cêntricas, fusões e fissões.

Nas espécies *Ce. caligata* e *Ce. dislepis* (Figuras 1a e 1c) observou-se decréscimo gradual no tamanho dos autossomos; em *Ce. cincta*, *Ce. everes* e *Ce. tucumana* os autossomos puderam ser classificados em grandes (pares 1 a 3) e médios

(pares 4 e 5) (Figuras 1b e 1d) e em *Ce. sanchezi* os pares um e dois possuem tamanho grande e o par três tamanho mediano (Figura 1e).

Observou-se nas espécies *Ce. cincta* e *Ce. everes* cariótipos bastante semelhantes, sendo neste caso necessário realizar uma análise com colorações que permitam identificar os cromossomos longitudinalmente para que seja possível verificar variações interespecíficas.

Em *Ce. everes* (Figura 2) foi registrada a presença de um cromossomo supernumerário ou cromossomo B, que se diferenciou dos demais cromossomos do conjunto devido ao tamanho grande e a heteropicnose positiva, tornando, desta forma, o número diplóide $2n=13$ ($2n = 10$ autossomos + XX + B). A presença de cromossomos supernumerários é, geralmente, resultado de fissões em algum dos cromossomos do conjunto, como relatado por KASAHARA (2009) no gafanhoto *Xyleus rosulentus*, em que a origem foi a partir de fissuras no cromossomo X, e que, por isso, tais cromossomos apresentam o tamanho pequeno. Neste caso, no entanto, o supernumerário exibiu-se com tamanho grande, o que não é comum neste tipo de cromossomo.

A presença deste elemento extra no conjunto cromossômico não foi observada em todos os espécimes estudados. De acordo com CAMACHO (2005) e LEVIN et al. (2005), o cromossomo supernumerário realmente pode não se encontrar em todos os indivíduos de uma espécie ou mesmo numa mesma população, sendo por isso, considerado como um elemento adicional, porém dispensável.

Segundo GUERRA (1988), em alguns insetos há indícios que os cromossomos Bs se originaram a partir do cromossomo X, no entanto, na maioria das espécies a origem ainda é desconhecida. De acordo com TRIVERS et al. (2004), a presença de cromossomos Bs no cariótipo é mais provável em espécies que possuem baixo número diplóide. No entanto, PALESTIS et al. (2010) estudaram 210 espécies de Ortópteros pertencentes a diversas famílias e não observaram tal fato, contudo verificaram relação entre presença de cromossomos Bs e cariótipo com predominância de cromossomos telocêntricos, semelhantes ao exibido nesta espécie de crisopídeo.

Um dos cromossomos sexuais de uma fêmea de *Ce. everes* analisada exibiu uma constrição secundária na região pericentromérica (Figura 2), característica que não se repetiu em todos os exemplares analisados, sendo, desta forma, necessário um estudo adicional com maior número de espécimes, bem como, com a utilização de outras técnicas de coloração. Este tipo de constrição é geralmente observado em pelo menos um cromossomo do conjunto haplóide de cada espécie (GUERRA, 1988) com a localização nas porções finais dos braços cromossômicos.

Foram obtidas células diplotênicas masculinas somente das espécies *Ce. cincta*, *Ce. claveri*, *Ce. dislepis* e *Ce. everes* (Figura 3), que exibiram a presença de 5 bivalentes autossômicos e dois univalentes sexuais ($2n = 5II + XY$). ASANA & KICHIJO (1936) e HIRAI (1957), em seus estudos citogenéticos com espécies de crisopídeos, observaram em células diplotênicas a presença de bivalentes sexuais, que possuíam segregação precoce, o que pode ser resultado da falta de homologia entre os pares. Neste estudo, devido à obtenção de apenas células com diplótenos tardios, o mesmo pode ter acontecido e, por isso, visualizaram-se univalentes sexuais.

Em todos os bivalentes autossômicos foram observados quiasmas terminais, e devido às células apresentarem-se na fase celular de diplóteno tardio, os bivalentes exibiam-se repelindo.

Metáfases mitóticas não foram registradas em *Ce. claveri*, mas o número cromossômico, bem como o sistema de determinação sexual pode ser estabelecido pela análise das células meióticas, concluindo que o número diploide é $2n=12$, em que há 10 autossomos + XY (Figura 3b).

Com exceção de *Ce. sanchezi*, as demais seis espécies analisadas exibiram características semelhantes às descritas anteriormente por OGUMA & ASANA (1932) e NAVILLE & DE BEAUMONT (1933, 1936), e que foram posteriormente analisadas por NEW (1984), que sugeriu duas hipóteses sobre a evolução cromossômica do táxon, das quais a primeira se adequa na descrição do gênero *Cereaeochrysa* e diz que o número diplóide $2n=12$ com cromossomos com morfologia telocêntrica seja a fórmula básica dos crisopídeos e as demais fórmulas foram surgindo a partir de rearranjos cromossômicos, como inversões, fusões e fissões.

Partindo-se do pressuposto que a fórmula básica para este grupo seja $2n = 12$, em *Ce. sanchezi* a evolução cromossômica provavelmente ocorreu através de fusão cêntrica que envolveram quatro pares de autossomos; tal evento reduziu o número diploide de $2n = 12$ para $2n = 8$ e originou autossomos meta/submetacêntricos. SCHNEIDER et al. (2007b) em trabalho realizado com espécies de Coleoptera pertencentes à tribo Conoderini sugeriram a hipótese da existência de uma fórmula básica para a tribo e que os dados discrepantes devem representar diferenciação cromossômica.

No entanto, esta hipótese proposta por NEW (1984) não leva em consideração as demais espécies de neurópteros das famílias Myrmeleontidae e Ascalaphidae que foram estudadas por ASANA & KICHIJO (1936) e que exibiram números diplóides superiores a $2n = 12$, tampouco dados citogenéticos de grupos próximos, como os coleópteros.

As famílias Myrmeleontidae e Ascalaphidae pertencem ao grupo monofilético dos Myrmeleontiformia, mas que, no entanto, possuem características sinaptomórficas com o grupo dos Hemerebiiformia, de acordo com a análise filogenética realizada por ASPÖCK et al. (2001). Além disso, os mesmos autores sugerem que em função de várias características morfológicas que também foram consideradas na análise filogenética, os coleópteros são considerados grupo irmão dos neurópteros.

Assim, a evolução citogenética pode ter ocorrido a partir de uma fórmula cariotípica ancestral que apresentava um número diploide superior a $2n = 12$, mas que, no entanto, apresentava, provavelmente, cromossomos com tamanho pequeno, e através de rearranjos como inversões pericêntricas seguidas de fusões foram se originando as demais fórmulas cromossômicas, como as exibidas pelas espécies de *Ceraeochrysa*.

A partir dos resultados observados nas sete espécies de *Ceraeocrysa* analisados conclui-se que é possível realizar a distinção de algumas espécies a partir das características citogenéticas, principalmente quanto à *Ce. sanchezi* e *Ce. tucumana*. O emprego de técnicas cromossômicas que revelem regiões específicas são

extremamente úteis para se distinguir as espécies que possuem cariótipos semelhantes como *Ce. cincta* e *Ce. everes*, bem como ajudar a estabelecer as estratégias envolvidas na evolução cromossômica do grupo.

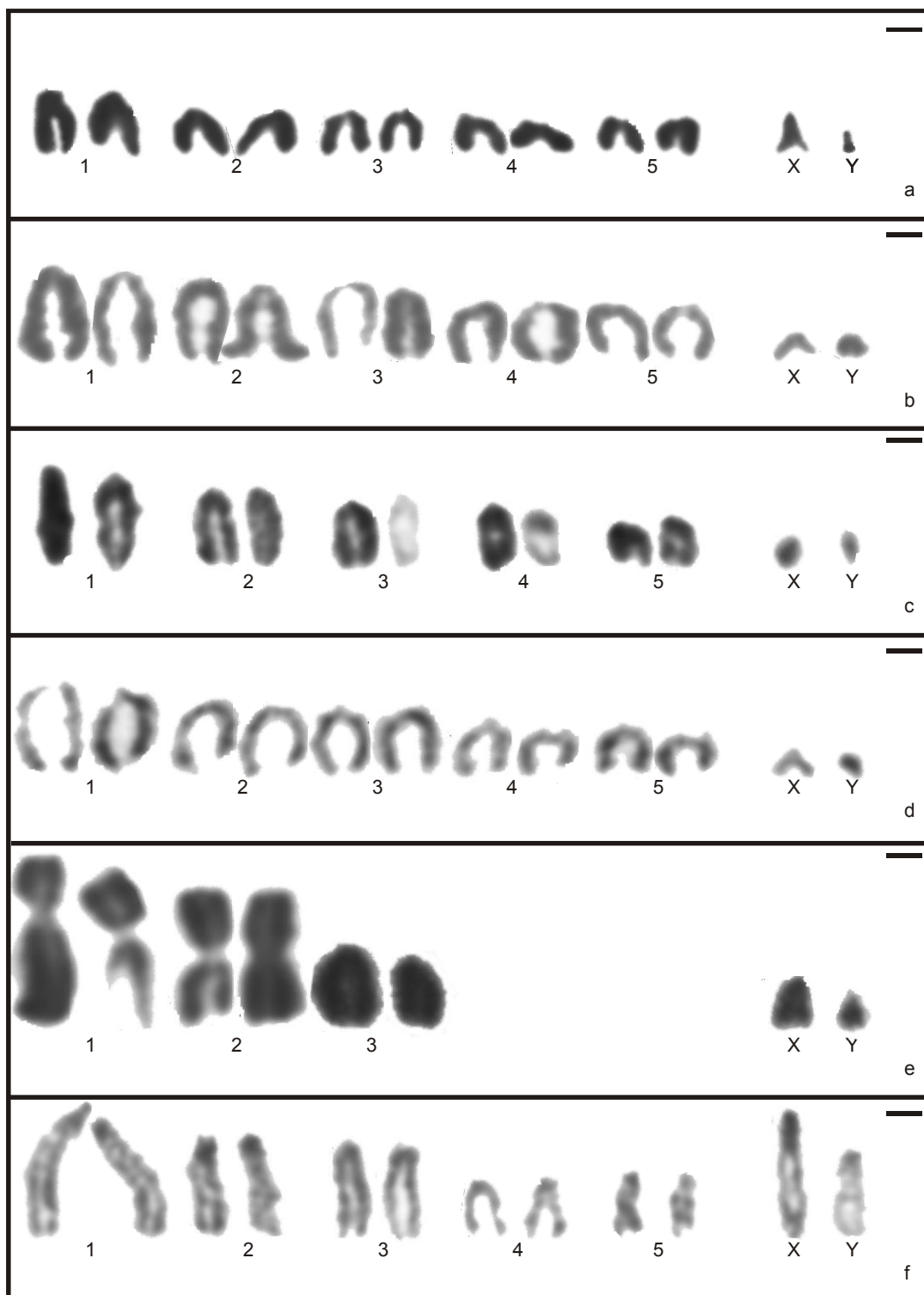


Figura 1. Cariótipos de espécies de *Ceraeochrysa*: **a.** *Ce. caligata*, macho $2n=12$; **b.** *Ce. cincta*, macho $2n=12$; **c.** *Ce. dislepis*, macho $2n=12$; **d.** *Ce. evere*, machos $2n=12$; **e.** *Ce. sanchezi*, macho $2n=8$; **f.** *Ce. tucumana*, embrião $2n=12$. Escala $30\mu\text{m}$.

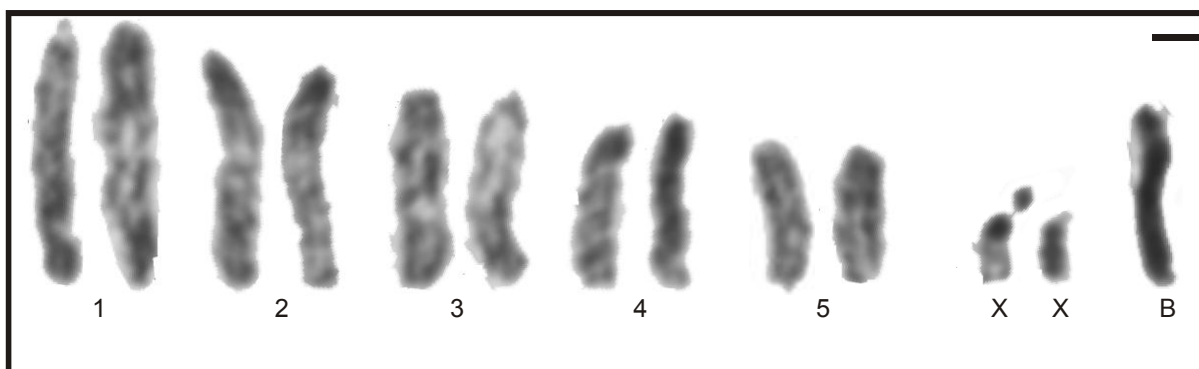


Figura 2. *Ce. everes* coradas com Giemsa, mostrando a presença de um cromossomo supernumerário. Escala 30 μ m.

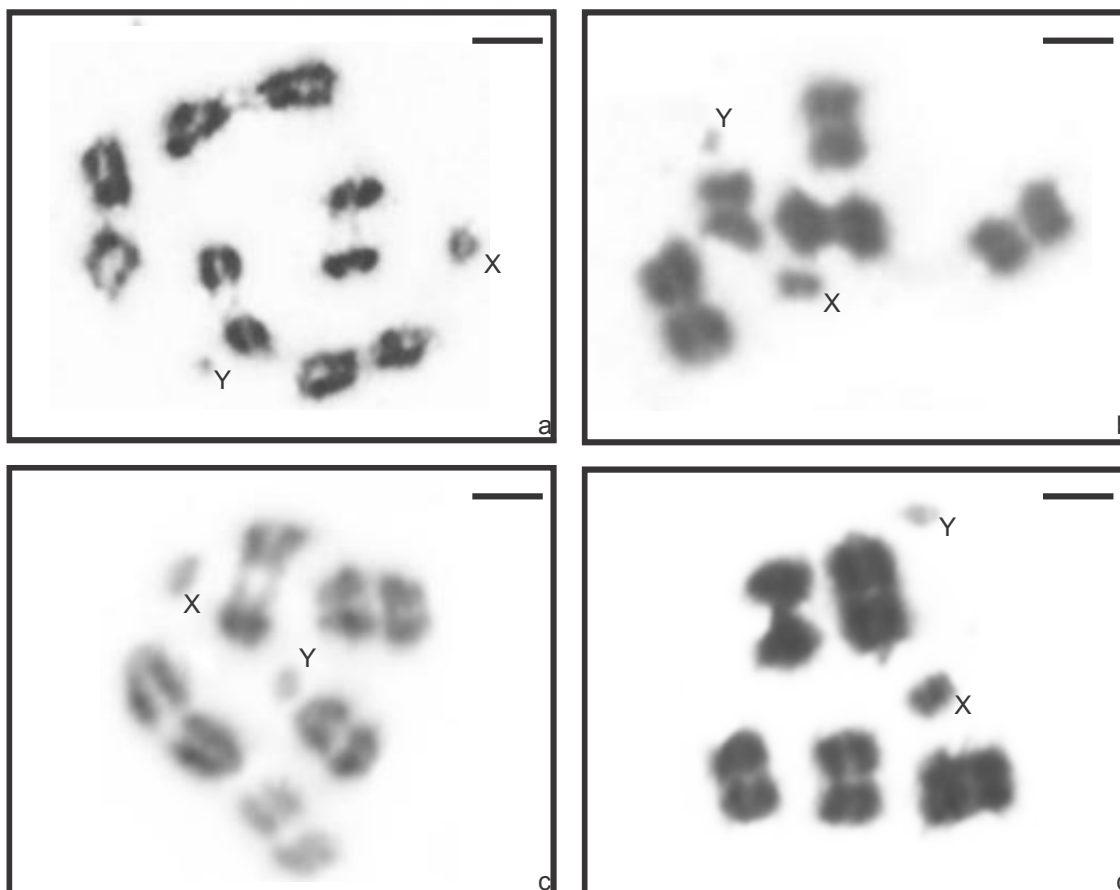


Figura 3. Células testiculares diplotênicas de **a.** *Ce. cincta*; **b.** *Ce. claveri*; **c.** *Ce. displeis*; **d.** *Ce. everes* exibindo fórmula meiótica $2n=5II + XY$. Escala 30 μ m.

REFERÊNCIAS

- ASANA, J.J.; KICHIJO, H. The chromosomes of six species of ant-lions (Neuroptera). **Journal of the Faculty of Science Hokkaido Imperial University**, Sapporo, v. 5, n. 2, p. 121-136, 1936.
- ASPÖCK, U; PLANT, J.D.; NEMESCHKAL, H.L. Cladistic analysis of neuroptera and their systematic position within Neuropterida (Insecta: Holometabola: Neuropterida: Neuroptera). **Systematic Entomology**, Oxford, v.26, n.1, p. 73-86, 2001.
- BORGES, D.S.; MARIANO, C.S.F.; DELABIE, J.H.C.; POMPOLO, S.G. Estudos citogenéticos em formigas neotropicais do gênero *Gnamptogenys* Roger (Hymenoptera, Formicidae, Ectatomminae). **Revista Brasileira de Entomologia**, São Paulo, v.48, n. 4, p.481-484, 2004.
- CAMACHO, J.P.M. B chromosomes. In: GREGORY, T.R. **The evolution of the genome**. San Diego: Elsevier Inc, 2005. p. 223 – 286.
- DE ALMEIDA, R.P.; STOUTHAMER, R. Molecular identification of *Trichogramma cacoeciae* Marchal (Hymenoptera: Trichogrammatidae): A new record for Peru. **Neotropical Entomology**, Londrina, v. 32, p. 269-272, 2003.
- FERREIRA, A.; CELLA, D.M.; TARDIVO, J.R.; VIRKKI, N. Two pairs of chromosomes: a new low record for Coleoptera. **Revista Brasileira Genética**, Ribeirão Preto, v. 7, p. 231–239, 1984.
- FREITAS, S.; PENNY, N.D. The green lacewings (Neuroptera: Chrysopidae) of brazilian agro-ecosystems. **Proceedings of the California Academy of Sciences**, San Francisco, v. 52, n. 19, p. 245-395, 2001.

FREITAS, S.; PENNY, N.D.; ADAMS, P.A. A Revision of the New World Genus *Ceraeochrysa* (Neuroptera: Chrysopidae). **Proceedings of the California Academy of Science IV**, San Francisco, v.60, n. 16, p. 503–610. 2009.

GUERRA, M. **Introdução à Citogenética Geral**. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan S.A., 1988. 142p.

HIRAI, H. A cytotaxonomic study of the Chrysopidae (Neuroptera). **Journal of the Faculty of Science Hokkaido University**, Sapporo, v. 13, n. 1- 4, p. 219 - 223, 1957.

KASAHARA, S. **Introdução à pesquisa citogenética de vertebrados**. 1° ed. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, 2009. 160p.

LEVAN, A.; FREDGA, K.; SANDBERG, A.A. Nomenclature for centromeric position of chromosomes. **Hereditas**, Lund, v. 52, p. 201 - 220, 1964.

LEVIN, D.A.; PALESTIS, B.G.; JONES, R.N. AND TRIVERS, R. Phyletic hot spots for B chromosomes in angiosperms. **Evolution**, Lancaster, v. 59, p. 962 – 969, 2005.

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 Carlo, v. 70, n. 4, p. 1115-1121, 2010.

NAVILLE, A.; BEAUMONT, J de. Recherches sur les chromosomes des Nèvroptères. **Archives d'anatomie microscopique**, v.29, p. 199 – 243, 1933.

NAVILLE, A.; BEAUMONT, J de. Recherches sur les chromosomes des Nèvroptères **Archives d'anatomie microscopique**, Paris, v. 32, p. 271 – 302, 1936.

NEW, T.R., Taxonomic problems. In CARNARD, M.; SEMÉRIA, Y.; NEW, T.R. (eds). **Biology of Chrisopidae**. 1984. p.37-56.

OGUMA, K.; ASANA, J.J. Additional data on the dragonfly chromosome, with a note on occurrence of X – Y chromosome in the ant lion (Neuroptera). **Journal of the Faculty of Science Hokkaido Imperial University**, Sapporo, Serie VI, v.1, 1932.

PALESTIS, B.G.; TRIVERS, R.; BURT, A.; JONES, R.N. The distribution of B chromosomes across species. **Cytogenetic Genome Research**, Würzburg, v. 106, p. 151 – 158, 2004.

PALESTIS, B.G.; CABRERO, J.; TRIVERS, R. AND, J.P.M. Prevalence of B chromosomes in Orthoptera is associated with shape and number of chromosomes. **Genetica**, v. 138, n. 11-12, p. 1181 - 1189, 2010.

PENNY, N.D., ADAMS, P.A. AND STANGE, L.A. Species catalog of the Neuroptera, Megaloptera, and Raphidioptera of America North of Mexico. **Proceedings of the California Academy of Sciences VI**, San Francisco, v. 50, p. 39 – 114. 1997.

SCHNEIDER, M.C.; ROSA, SP.; ALMEIDA, M.C. COSTA, C.; CELLA, D.M. Strategies of karyotype differentiation in Elateridae (Coleoptera:Polyphaga). **Micron**, New York, v. 38, p. 590-598, 2007a.

SCHNEIDER, M.C., ROSA, S.P., ALMEIDA, M.C., COSTA, C., CELLA, D.M. Chromosomal similarities and differences among four Neotropical Elateridae (Conoderini and Pyrophorini) and other related species, with comments on the NOR patterns in Coleoptera. **Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research**, Berlin, v. 45, p. 308 - 316, 2007b.

SMITH, S.G.; MAXWELL, D.E. Postreduction of the Xchromosome and complete chiasma interference in the Lampyridae (Coleoptera). **Canadian Journal of Zoology**, Ottawa, v. 31, p. 179 – 192, 1953.

SOSA, F.; FREITAS, S. New Neotropical species of *Ceraeochrysa* Adams (Neuroptera: Chrysopidae). **Zootaxa**, v. 2562, p. 57 – 65, 2010.

SOSA, F.; FREITAS, S. A new synonym, a new male description and new geographical records for three *Ceraeochrysa* species (Neuroptera: Chrysopidae). **Zootaxa**, v. 2913, p. 47 – 58, 2011.

SUMNER, A.T. **Chromosomes Organization and Function**. North Berwick: Blackwell Publishing, 2003. 287p.

TAUBER, C.A.; DE LEO, T. N; PENNY, N.D.; TAUBER, M.J. The genus *Ceraeochrysa* (Neuroptera: Chrysopidae) of America North of Mexico: larvae, adults, and comparative biology. **Annals of the Entomological Society of America**, College Park, v. 93, p. 1195 – 1221, 2000.

TJEDER, B. Neuroptera-Planipennia. The Lace-wings of Southern Africa. 5. Family Chrysopidae. In: HANSTROM, B.; BRINCK, P.; RUDEBEC, G. (eds.) **South African Animal Life**. Stockholm: Swedish Natural Science Research Council, 1966. v. 12, p. 228 – 534.

TRIVERS, R.; BURT, A.; PALESTIS, B.G. B-chromosomes and genome size in flowering plants. **Genome**, Ottawa, v. 47, p. 1 – 8. 2004.

VIRKKI, N. On the cytology of some Neotropical Cantharoids (Coleoptera). **Annales Academiae Scientiarum Fennicae A IV Biology**, Helsinki, v. 65, p. 1 – 17, 1963.

WASSERMAN, M.; EHRMAN, L. Firefly chromosomes, II (Lampyridae: Coleoptera). **Florida Entomologis**, Gainesville, v. 69, p. 755 – 757, 1986.

WEBB, G.C.; WHITE, M.J.D.; CONTERAS, N.; CHENEY, J. Cytogenetics of the partenogenetic grasshopper *Warramaba* (formely *Morasa*) *virgo* and its sexual relatives 4: Chromosomes banding studies. **Chromosoma**, Berlin, v. 67, p. 309 – 339, 1978.

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

CAPITULO 4 – ANÁLISE CITOGENÉTICA DE POPULAÇÕES DE *Chrysoperla* STAINMANN, 1964 E *Chrysopodes* NAVÁS, 1913 (NEUROPTERA: CHRYSOPIDAE)

RESUMO – A fauna neotropical de crisopídeos é bastante rica, mas está constantemente necessitando ser revisada, uma vez que muitas das descrições foram baseadas apenas na morfologia externa, e levando-se em consideração o fato de que em alguns grupos há pouca variação interespecífica e em outros há grande variação em indivíduos da mesma espécie, este tipo de descrição pode levar a equívocos. Por isso novos métodos de identificação necessitam ser usados a fim de auxiliar na classificação da família e promover uma análise evolutiva, como através de estudos citogenéticos, que são ainda bastante incipientes na família Chrysopidae. Assim, o objetivo do estudo foi caracterizar citogeneticamente duas espécies do gênero *Chrysoperla* e duas do gênero *Chrysopodes* quanto ao número diploide, morfologia cromossômica, tipo de determinação sexual e comportamento meiótico. Os resultados demonstraram haver diferenciação nos cariótipos, principalmente, entre as espécies do gênero *Chrysopodes*, confirmando que neste caso, a citogenética permite realizar a distinção específica.

Palavras-chave: crisopídeos, cromossomos, evolução cromossômica, taxonomia.

Introdução

A família Chrysopidae é a mais numerosa dentro da ordem Neuroptera, com aproximadamente 86 gêneros e 1200 espécies, onde muitas destas espécies encontram-se distribuídas no território brasileiro (FREITAS & PENNY 2001). Os insetos desta família são caracterizados como benéficos, pois se tratam de predadores vorazes e, que por isso são bastante utilizados em programas de controle biológico de pragas

(ADAMS & PENNY 1987). A esse respeito há uma vasta literatura sobre as espécies que exibem este potencial, como *Chrysoperla externa*.

Na região Neotropical, a maioria das espécies foi descritas por Banks e Navás em um período em que ainda não se utilizava a morfologia da genitália, mas características externas, como a venação das asas, o que resultou em elevado número de espécies (ADAMS & PENNY 1987; BROOKS & BARNARD 1990). Além disso, muitas das espécies descritas por Banks e Navás tinham como holótipos indivíduos fêmeas, machos tenerais ou apenas um espécime em que o abdome era ausente (ADAMS & PENNY 1987).

De acordo TAUBER & ADAMS (1990) e CADENA et al. (2007), a identificação taxonômica de muitas espécies desta família, principalmente da fauna neotropical, é incerta, e por isso há necessidade de revisões sistemáticas a fim de reexaminar as espécies já descritas, gerando novas atribuições genéricas e reconhecendo sinonímias. Tal análise é muito importante sob o ponto de vista ecológico, pois, visando o bom desempenho de um programa de controle biológico é necessária a liberação da espécie correta, ou seja, que esteja associada à presa e ao ambiente de liberação (DE ALMEIDA & STOUTHAMER 2003).

O gênero *Chrysopodes* subgênero *Chrysopodes* é um dos mais diversos da tribo Chrysopini, incluindo cerca de 40 espécies e muitas ainda para serem descritas (BROOKS & BARNARD 1990). Este gênero é caracterizado pela estrutura da genitália masculina, morfologia da mandíbula em forma de foice, antenas geralmente menores que o comprimento das asas (FREITAS & PENNY 2001), assim como pela morfologia externas das larvas, e o hábito das mesmas de jogar sobre o corpo restos da exúvia e da presa, o que lhes confere o nome de bicho-lixeiro (TAUBER et al. 2000, 2001).

No entanto, algumas destas características propostas para diferenciar os *Chrysopodes* são problemáticas, como o baixo valor da morfologia da genitália, a dificuldade de identificação de estruturas em indivíduos jovens tenerais e a presença de traços que são compartilhados por outros gêneros, como os *Ceraeochrysa*, o que pode resultar em erros na identificação (TAUBER 2003).

Quanto ao gênero *Chrysoperla*, este talvez seja o mais estudado na família sob os aspectos morfológicos e, principalmente, quanto a sua utilização em programas de controle biológico. BROOKS (1994) descreveu 35 espécies distribuídas ao redor do mundo, em que todas apresentam como característica a gena vermelha e a lateral do pronoto com cerdas espessadas; no entanto, segundo FREITAS & PENNY (2001), estas características são observadas em outros crisopídeos devendo por isso serem tratadas com cautela. Neste mesmo trabalho de FREITAS & PENNY (2001) sobre a fauna de crisopídeos no agroecossistema brasileiro foram identificadas três espécies do gênero *Chrysoperla* em que as diferenças morfológicas eram muito sutis.

Assim, vê-se a necessidade de outros meios de identificação, como através da técnica da biologia molecular, que já vem sendo estudada por WINTERTON & FREITAS (2006) e MORALES & FREITAS (2010), e técnicas citogenéticas, que ainda que incipiente, em que apenas 2% do complexo Chrysopidae foi analisada (NEW 1984), já tem sido relatado sucesso em outras ordens de insetos, como em Ortópteros (HEWITT 1979).

Os dados citogenéticos em Chrysopidae foram obtidos por NAVILLE & DE BEAUMONT (1933, 1936) na Europa e por OGUMA & ASANA (1932) no Japão e foram posteriormente analisados por HIRAI (1957) e por NEW (1984) e são limitados à subfamília Chrysopinae. Os estudos foram realizados a partir de preparações cromossômicas gonadais de machos e fêmeas, em que o número diploide variou de $2n=10$ a $2n=14$, sendo $2n=12$ o número mais frequente, estando presente em 68% das espécies analisadas; tal fato levou NEW (1984) a sugerir que esta é a fórmula base ancestral para os crisopídeos.

No entanto, tanto os dados obtidos, como as hipóteses levantadas sobre a evolução cromossômica do grupo são muito incipientes, uma vez que o número de espécies e exemplares analisados, bem como de tribos é muito pequeno. Assim, o objetivo deste estudo foi determinar o número diploide, o tipo de sistema cromossômico sexual e morfologia cromossômica de duas espécies do gênero *Chrysoperla* e duas espécies do gênero *Chrysopodes* através da técnica de coloração convencional, a fim

de aumentar os dados citogenéticos do grupo, bem como auxiliar na taxonomia e estabelecer os mecanismos de evolução cromossômica.

Material e Métodos

As amostras de *Chrysoperla defreitasi* (3 embriões), *Chrysoperla externa* (29 embriões, 3 fêmeas e 8 machos), *Chrysopodes delicata* (2 fêmeas e 1 macho) e *Chrysopodes lineafrons* (2 fêmeas e 1 macho) foram coletados na cidade de Jaboticabal, São Paulo – Brasil, em pomares de citros e macadâmia na Fazenda Experimental da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinária (UNESP), durante o período de Junho de 2010 a Maio de 2011. Após a coleta, os espécimes foram identificados em laboratório pelo prof. Dr. Sérgio de Freitas quanto à morfologia externa e estudo da genitália. Os “vouchers” foram depositados no Museu do Laboratório de Biossistemática, Biologia e Ecologia Molecular de Neurópteros da mesma universidade.

As preparações cromossômicas foram obtidas de embriões e de gônadas masculinas e femininas de indivíduos adultos (WEBB et al. 1978, adaptado). Os tecidos foram removidos em solução fisiológica (7,5g de NaCl, 2,38g de Na₂HPO₄, 2,72g de KH₂PO₄ em 1000 ml de água destilada) e imersos em solução de colchicina (0,05% em solução fisiológica) por 30 minutos, a seguir foi adicionado igual quantidade de solução hipotônica (água de torneira) por 15 minutos. O material foi então fixado em solução de Carnoy I (3 parte de álcool metílico: 1 parte de ácido acético), por pelo menos 30 minutos e transferido para a lâmina, onde as gônadas foram maceradas em ácido acético 60% e os embriões em ácido acético 45% até a formação de uma suspensão celular. As lâminas foram secas em placa de metal a 40°C, e coradas em solução de Giemsa a 3% por 15 minutos.

As metáfases foram observadas em microscópio de luz e as imagens foram obtidas com o auxílio de uma câmara MOTICAM acoplada ao microscópio, utilizando o software IMAGE da Motic. A morfologia cromossômica foi determinada de acordo com a nomenclatura proposta por LEVAN et al. (1964).

Resultados e Discussão

Gênero *Chrysoperla*

Ambas as espécies *Chrysoperla defreitasi* e *Chrysoperla externa* exibiram número diploide $2n=12$ e cromossomos com morfologia telocêntrica (Figuras 1 e 2). Em *C. externa* foi possível observar que os cromossomos exibem decréscimo gradual no tamanho e o tipo de sistema cromossômico sexual é XY/XX (Figura 1), sendo o tamanho do cromossomo X intermediário entre os pares 1 e 2 e o Y entre os pares 4 e 5. Contrariamente, em *C. defreitasi*, não foi possível estabelecer o sistema sexual, uma vez que não foi observado o par cromossômico heteromórfico na amostra analisada.

Estas características são bastante semelhantes às espécies de *Chrysoperla*, bem como algumas outras das 24 espécies anteriormente analisadas por HIRAI (1957) e NEW (1984), em que 68% exibiram número diplóide $2n = 12$ e morfologia acrocêntrica (NEW 1984). Além disso, ambas as espécies podem se incluir na primeira hipótese de NEW (1984) sobre a evolução cromossômica, e que diz que o cariótipo $2n = 12$ com todos os cromossomos telocêntricos é a fórmula básica a qual as demais fórmulas se originaram a partir de rearranjos cromossômicos. No entanto, em função de resultados obtidos com o gênero *Leucochrysa* (dados do autor), bem como com outras famílias de Neurópteros analisados por ASANA & KICHIJO (1936), como Myrmeleotidae, que apresentou espécies com número diploide $2n=14$ e $2n=16$, são necessários mais estudos, principalmente, com a utilização de técnicas de coloração diferencial que identificam os cromossomos longitudinalmente, para se estabelecer as estratégias que levaram a evolução cromossômica.

Em *C. defreitasi* observou-se em dois dos indivíduos analisados células portadoras de um cromossomo supernumerário, em que o número diplóide passou nestas células para $2n = 13$ (Figura 2b). De acordo com CAMACHO (2005) e KASAHARA (2009), o cromossomo supernumerário geralmente não se encontra em todos os indivíduos de uma mesma espécie, o que acaba por gerar um polimorfismo intraespecífico. Além disso, a presença do supernumerário pode variar dentro de uma

população, bem como em células do mesmo indivíduo, sendo por isso, considerado um elemento adicional, mas não essencial.

A origem do cromossomo B é ainda desconhecida, mas GUERRA (1988) acredita que em alguns insetos se originaram a partir do cromossomo X. No entanto, PALESTIS et al. (2010) observaram que em Ortópteros a presença de supernumerário está relacionada com a predominância de cromossomos telocêntricos/acrocêntricos.

Em uma célula foi observada uma metáfase com uma região de constrição secundária, no entanto, assim como no cromossomo supernumerário, para se diagnosticar tais eventos são necessárias análises de maior número de exemplares.

Foram obtidas somente células diplotênicas de *C. externa* (Figura 1c e 1d) que exibiram 5 bivalentes autossômicos e dois univalentes sexuais. Esta característica é semelhante aos demais neurópteros estudados, que, no entanto, exibiam bivalentes sexuais no início do diplóteno, mas com segregação precoce, que é, provavelmente, consequência da falta de homologia (OGUMA & ASANA 1932; NAVILLE & DE BEAUMONT 1933, 1936; ASANA & KICHIJO, 1936).

Nos bivalentes autossômicos ocorreram quiasmas terminais e, em uma das células diplotênicas, foi observada a presença de um bivalente na forma de anel, o que é característico da ocorrência de dois quiasmas.

Gênero *Chrysopodes*

Fêmeas de *Chrysopodes delicata* exibiram metáfases mitóticas com número diploide $2n = 6$. Esse número foi até agora o menor número diploide em Neuroptera, além de ser relativamente baixo comparado com outros grupos de insetos.

Embora as imagens das metáfases testiculares obtidas não tenham exibido boa qualidade, permitiram inferir que o tipo do sistema cromossômico sexual é XY/XX (Figura 3a - b), em que o par sexual é telocêntrico e o menor do conjunto, enquanto que os pares autossômicos possuem morfologia metacêntrica e tamanho grande.

Este cariótipo, observado em *Chr. delicata*, provavelmente originou-se a partir da fusão cêntrica e em tandem entre autossomos telocêntricos, podendo ser considerada, de acordo com SUMNER (2003), como uma forma de evolução cromossômica.

Em *Chrysopodes lineafrons* a análise cariotípica baseou-se num pequeno número de espécimes, em que a fêmea exibiu número diplóide $2n = 10$, onde o primeiro par apresentou tamanho grande e morfologia submetacêntrica e os demais autossômicos exibiram morfologia acrocêntrica e decréscimo gradual de tamanho (Figura 4).

Não foi possível distinguir qual par do conjunto cromossômico é o sexual, uma vez que apenas uma célula diplotênica espermatozoal e com má qualidade de imagem foi analisada e, exibiu 5 bivalentes, fato este que também não permitiu concluir se a meiose está incompleta, ou seja, com ausência de um univalente sexual, ou se como observado nos demais trabalhos com Neurópteros os cromossomos sexuais se exibem como bivalentes no início da prófase (OGUMA & ASANA 1932; NAVILLE & DE BEAUMONT 1933, 1936; ASANA & KICHIJO 1936), sendo, por isso, necessário um estudo com um maior número de exemplares, bem como se utilizando diferentes técnicas de coloração diferencial.

Embora pertencentes ao mesmo gênero, *Chr. delicata* e *Chr. lineafrons* exibem diferenças na morfologia externa e na genitália que permitem diferenciá-las (FREITAS & PENNY, 2001), e as diferenças entre ambas as espécies são também marcantes na citogenética, em relação ao número diploide, à morfologia cromossômica, e número fundamental de braços cromossômicos que foi de 10 e 12 em *Chr. delicata* e *Chr. lineafrons*, respectivamente. Estas diferenças podem ser resultados de processos de evolução cromossômica, em que através de rearranjos cromossômicos, como fusões cêntricas foram se originando diferentes fórmulas.

Até o presente, nenhum estudo relacionado à citogenética deste gênero foi realizado, e desta forma, não é ainda possível inferir hipóteses sobre a partir da fórmula de qual das duas espécies o rearranjo pode ter ocorrido. Mas de acordo com os estudos moleculares realizados por WINTERTON & FREITAS (2006), o gênero *Chrysopodes* é grupo irmão dos gêneros *Chrysoperla* e *Ceraeochrysa*, em que o

primeiro foi anteriormente analisado quanto a sua citogenética, e exibiu número diplóide $2n = 12$ com cromossomos com morfologia telocêntrica (NEW 1984).

Analisando os cariótipos e comparando-os com os resultados obtidos anteriormente com *Chrysoperla*, verifica-se que um dos possíveis rearranjos pode ter ocorrido a partir da fusão de um par autossômico em *Chr. lineafrons*, em que o número diploide foi reduzido e houve a formação de um par submetacêntrico. Este fato corrobora a primeira hipótese sugerida por NEW (1984) sobre a evolução cromossômica do grupo, de que a fórmula cromossômica $2n=12$ com todos os cromossomos com morfologia acrocêntrica é a fórmula base para a família Chrysopidae, a partir da qual as demais se originaram.

No entanto, levando-se em consideração dados citogenéticos obtidos na subordem Myrmeleontiformia que exibiu números diploides superiores a $2n = 12$, e a análise filogenética dos Neuropteridas realizada por ASPÖCK et al. (2001), que diz que as subordens Myrmeleontiformia e Hemerobiiformia são sinaptomórficas em relação à algumas características morfológicas, não pode-se descartar a possibilidade de que na família Chrysopidae a fórmula cariotípica ancestral seja $2n = 16$ ou superior a este número, levando-se em conta também o fato de que quanto maior o número diploide menor o tamanho dos cromossomos e vice-versa, e que rearranjos dos tipos inversões pericêntricas e fusões cêntricas originaram os demais cariótipos.

Contudo, para se confirmar estas novas hipóteses, são necessários mais estudos, principalmente, utilizando outros tipos de coloração que permitam identificar os cromossomos individualmente para se inferir sobre os rearranjos envolvidos no processo de evolução cromossômica, bem como para auxiliar os estudos citotaxonômicos.

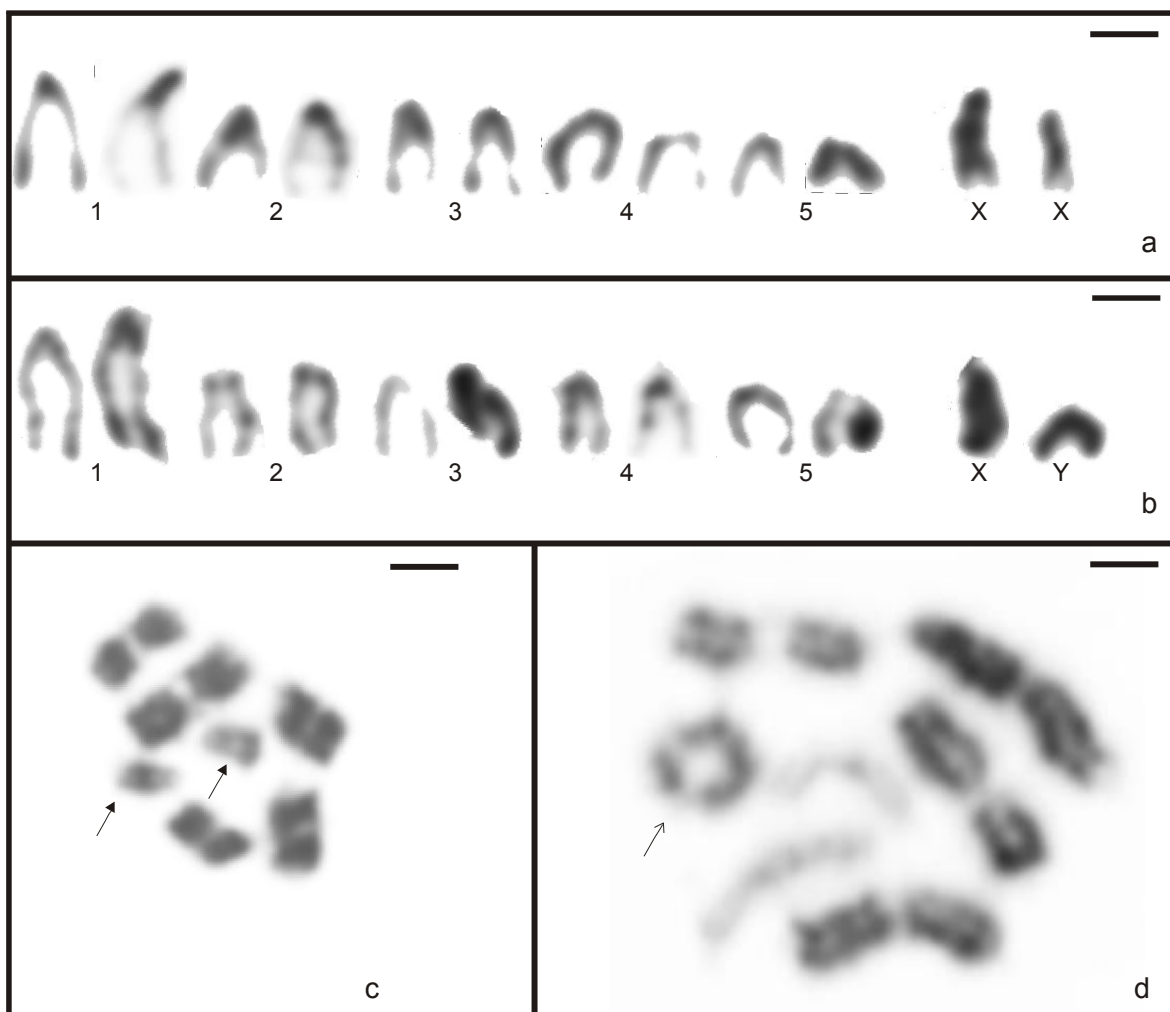


Figura 1. Cromossomos de células gonadais de fêmea (a) e macho (b - d) de *Chrysoperla externa* submetidos à coloração Giemsa. a. e b. exibem o cariótipo com $2n=12$ e cromossomos com morfologia telocêntrica; c - d Diplótenos tardios com 5 II autossômicos e 2 univalentes sexuais. A seta pontilhada indica os cromossomos sexuais e a seta pontilhada vazia um bivalente com dois quiasmas em forma de anel. Escala $30\mu\text{m}$.

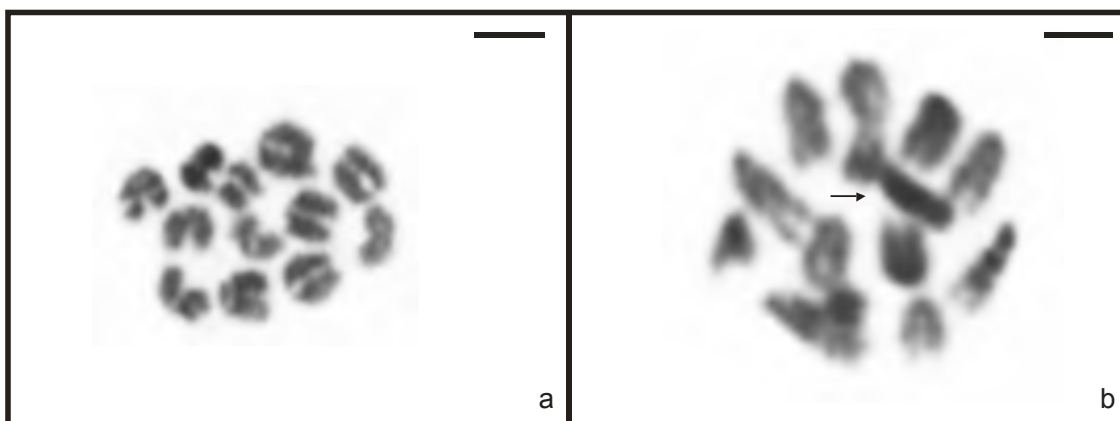


Figura 2. Metáfase mitótica de *Chrysoperla defreitasi* submetido à coloração Giemsa. **a.** embrião $2n=12$; **b.** embrião com presença de supernumerário $2n=13$. A seta indica o cromossomo supernumerário. Escala $30\mu\text{m}$.

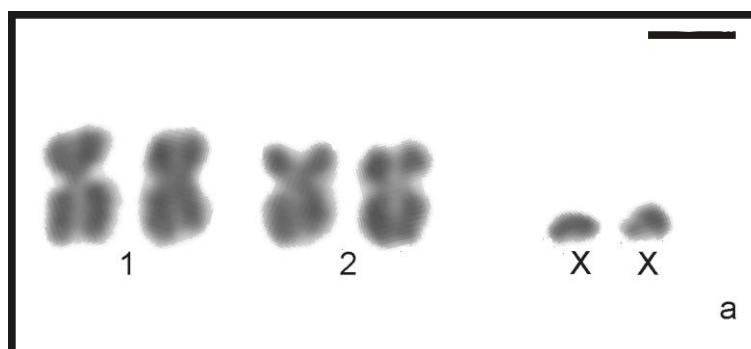


Figura 3. Cromossomos de células gonadais de fêmea (**a** e **b**) de *Chrysopodes delicata* coradas com Giemsa. **a.** Cariótipo com $2n=6$; **b.** Metáfase com $2n=6$. Escala $30\mu\text{m}$.



Figura 4. Cariótipo obtido de células gonadais de fêmea de *Chrysopodes lineafrons* corados com Giemsa, mostrando $2n = 10$. Escala $30\mu\text{m}$.

REFERÊNCIAS

ADAMS, P.A.; PENNY, N.D. Neuroptera of the Amazon Basin. Part 11a. Introduction and Chrysopini. **Acta Amazonica**, Manaus, v.15, p. 413 – 479, 1987.

ASANA, J.J.; KICHIJO, H. The chromosomes of six species of ant-lions (Neuroptera). **Journal of the Faculty of Science Hokkaido Imperial University**, Sapporo, v. 5, n. 2, p. 121-136, 1936.

ASPÖCK, U; PLANT, J.D.; NEMESCHKAL, H.L. Cladistic analysis of neuroptera and their systematic position within Neuropterida (Insecta: Holometabola: Neuropterida: Neuroptera). **Systematic Entomology**, Oxford, v.26, n.1, p. 73-86, 2001.

BROOKS, S. J. A taxonomic review of the common green lacewing genus *Chrysoperla* (Neuroptera: Chrysopidae). **Bulletin of the British Museum of Natural History**, 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)**, Londres, v. 59, n. 2, p. 117- 286, 1990.

CADENA, P.; ÁNGEL, F.; GÓMEZ, L.A.; GONZÁLEZ, R. Diferenciación morfológica y molecular de especies de crisópidos (Neuroptera: Chrysopidae). **Revista Colombiana de Entomología**, Satafe de Bogota, v. 33, n. 2, p. 171-177, 2007.

CAMACHO, J.P.M. B chromosomes. In: GREGORY, T.R. (ed). **The evolution of the genome**. San Diego: Elsevier Inc, pp 223–286. 2005.

DE ALMEIDA, R.P.; STOUTHAMER, R. Molecular identification of *Trichogramma cacoeciae* Marchal (Hymenoptera: Trichogrammatidae): A new record for Peru. **Neotropical Entomology**, Londrina, v. 32, p. 269-272, 2003.

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

GUERRA, M. **Introdução à Citogenética Geral**. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan S.A., 142p. 1986

HEWITT, G.M., **Animal Cytogenetics 3. Insecta 1.**, Berlin: Gebrüder Borntraeger, 170p, 1979.

HIRAI, H. A cytotaxonomic study of the Chrysopidae (Neuroptera). **Journal of the Faculty of Science Hokkaido University**, Sapporo, v. 13, n. 1- 4, p. 219-223, 1957.

KASAHARA, S. **Introdução à pesquisa citogenética de vertebrados**. 1° ed. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, 160p. 2009.

LEVAN, A.; FREDGA, K.; SANDBERG, A.A. Nomenclature for centromeric position of chromosomes. **Hereditas**, Lund, v. 52, p. 201-220, 1964.

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.

NAVILLE, A.; BEAUMONT, J de. Recherches sur les chromosomes des Nèvroptères **Archives d'anatomie microscopique**, Paris, v. 32, p. 271 – 302, 1936.

NAVILLE, A.; BEAUMONT, J de., 1933. Recherches sur les chromosomes des Nèvroptères. **Archives d'anatomie microscopique**, Paris, v.29, p. 199 – 243, 1933.

NEW, T.R. Taxonomic problems. In CARNARD, M.; SEMÉRIA, Y.; NEW, T.R. (eds). **Biology of Chrisopidae**. 1984. p.37-56.

OGUMA, K.; ASANA, J.J. Additional data on the dragonfly chromosome, with a note on occurrence of X – Y chromosome in the ant lion (Neuroptera). **Journal of the Faculty of Science Hokkaido Imperial University**, Serie. VI, Sapporo, v.1, 1932.

PALESTIS, B.G.; CABRERO, J.; TRIVERS, R.; J.P.M. Prevalence of B chromosomes in Orthoptera is associated with shape and number of a chromosomes. **Genetica**, v. 138, n. 11-12, p. 1181 - 1189, 2010.

SUMNER, A.T. **Chromosomes Organization and Function**. North Berwick: Blackwell Publishing, 2003. 287p.

TAUBER, C.A.; ADAMS, P.A. Systematics of the Neuropteroidea: present status and future needs. In: KOSZTARAB, M.; SCHAEFER, C.W. Systematics of the North American Insects and Arachnids: Status and Needs. **Virginia Agricultural Experiment Station Information**, Series 90–1. Virginia Polytechnic Institute and State University, Blacksburg, p.151–164. 1990.

TAUBER, C.A. Generic Characteristics of *Chrysopodes* (Neuroptera: Chrysopidae), with New Larval Descriptions and a Review of Species from the United States and Canada. **Annals of the Entomological Society of America**, College Park, v. 96, n. 4, p. 472 – 490, 2003.

TAUBER, C.A.; DE LEON, T.; LOPEZ-ARROYO, J.I.; TAUBER, M.J. The genus *Ceraeochrysa* (Neuroptera: Chrysopidae) of America North of Mexico: larvae, adults and

comparative biology. **Annals of the Entomological Society of America**, College Park, v. 93, p. 1195 – 1221, 2000.

TAUBER, C.A.; TAUBER, M.J.; ALBUQUERQUE, G.S. *Plesiochrysa brasiliensis* (Neuroptera: Chrysopidae): larval stages, biology, and taxonomic relationships. **Annals of the Entomological Society of America**, College Park, v. 94, p. 858 - 865. 2001.

WEBB, GC.; WHITE, MJD.; CONTERAS, N.; CHENEY, J. Cytogenetics of the partenogenetic grasshopper *Warramaba* (formely *Morasa*) *virgo* and its sexual relatives 4: Chromosomes banding studies. **Chromosoma**, Berlin, v. 67, p. 309 – 339, 1978.

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