

**Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”**

**DNA Barcoding de espécies de *Trichogramma* (Hymenoptera:
Trichogrammatidae) associados a lepidópteros-praga e
filogeografia de *T. pretiosum* no Brasil**

Maria Gabriela Castro da Silva

Dissertação apresentada para obtenção do título de
Mestra em Ciências. Área de concentração:
Entomologia

**Piracicaba
2023**

Maria Gabriela Castro da Silva
Bacharela em Ciências Biológicas

**DNA Barcoding de espécies de *Trichogramma* (Hymenoptera:
Trichogrammatidae) associados a lepidópteros-praga e filogeografia de
T. pretiosum no Brasil**

versão revisada de acordo com a Resolução CoPGr 6018 de 2011

Orientador:
Prof. Dr. **ALBERTO SOARES CORRÊA**

Dissertação apresentada para obtenção do título de
Mestra em Ciências. Área de concentração:
Entomologia

Piracicaba
2023

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
DIVISÃO DE BIBLIOTECA – DIBD/ESALQ/USP

Silva, Maria Gabriela Castro da

DNA Barcoding de espécies de *Trichogramma* (Hymenoptera: Trichogrammatidae) associados a lepidópteros-praga e filogeografia de *T. pretiosum* no Brasil / Maria Gabriela Castro da Silva - - versão revisada de acordo com a Resolução CoPGr 6018 de 2011. - - Piracicaba, 2023.

60 p.

Dissertação (Mestrado) - - USP / Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz".

1. Parasitoide 2. Identificação molecular 3. Marcador mitocondrial 4. Demografia
5. Diversidade genética I. Título

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao Prof. Dr. Alberto Soares Corrêa, pela orientação, apoio, compreensão e amizade. Agradeço também pela oportunidade de desenvolver esse projeto, confiança em meu trabalho, incentivo e por todos os ensinamentos adquiridos ao longo do Mestrado.

À Universidade de São Paulo (USP), em especial à Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, pela oportunidade de ter um ensino de excelência na pós-graduação, permitindo o meu crescimento profissional.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES), pelo fornecimento da bolsa de estudos que foi imprescindível para realização desse projeto.

Ao Departamento de Entomologia e Acarologia da ESALQ/USP, em especial aos professores, pelas disciplinas de altíssima qualidade lecionadas e transmissão de conhecimento nesses anos de mestrado. Agradeço também aos colegas e funcionários que contribuíram de formas diversas.

À equipe do Laboratório de Ecologia Molecular de Artrópodes da ESALQ/USP (ENTOMOL), pelas boas amizades e crescimento profissional: Alan Saldanha, Ana Wengrat, Daniela Maggio, Davi Fernandes, Denise Alves, Frederico Hickmann, Frederico Nanini (agradeço por toda ajuda na realização das análises do projeto), Larissa Muniz, Mateus Aurélio, Tais Cabrera e Victória Rossetti.

A Ana Wengrat, por todo o apoio e colaboração que foram essenciais para o desenvolvimento desse trabalho, e por ter se tornado uma grande amiga nesse processo. Agradeço por todos os ensinamentos, toda ajuda, disponibilidade e paciência.

Agradeço também aos colaboradores Dr. Aloísio Coelho Jr e Dra. Tamara Takahashi (Laboratório de Biologia de Insetos ESALQ/USP), a Dra. Nadja Nara (UNESP/Botucatu), ao Prof. Dr. Fabricio Fagundes Pereira (UFGD), a Prof^a. Dra. Professora Alessandra Regina Butnariu (UNEMAT), e a Prof^a Dra. Vanda Pietrowski e Dr. Diandro Barilli (UNIOESTE) pelo fornecimento dos insetos utilizados nesse projeto.

À minha melhor amiga e companheira Sarah Garcia, por todo apoio, carinho e suporte em todos os momentos, que foram essenciais para mim. Por me ajudar a manter o equilíbrio e sempre me incentivar a alcançar meus objetivos.

À minha família, em especial à minha mãe Cristina, meu pai Bento, meus irmãos (Priscila, Guilherme, Aline e Joaquim), meus sobrinhos (Fernando, Murilo, Arthur, Lavínia e Theo) por tudo que fizeram por mim até aqui. Agradeço aos meus amigos Gabriel Galiano e Pedro Valério pelo companheirismo e amizade, mesmo que à distância, e Frederico Nanini, Victória Rossetti, Larissa Muniz e Tais Cabrera pela grande amizade dentro do laboratório.

E, por fim, a todos que de alguma forma contribuíram, seja direta ou indiretamente, para que eu chegasse até aqui.

Meus sinceros agradecimentos.

EPÍGRAFE

O DNA não sabe e nem se importa. O DNA apenas é.
E nós dançamos de acordo com a sua música.

Richard Dawkins - O Rio que Saía do Éden

SUMÁRIO

RESUMO.....	7
ABSTRACT.....	8
1. INTRODUÇÃO.....	9
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	15
2.1. <i>Trichogramma</i> e sua importância agrícola.....	15
2.2. Taxonomia e identificação de <i>Trichogramma</i>	16
2.3. Identificação molecular e DNA Barcoding.....	18
2.4. Identificação molecular por PCR-RFLP.....	19
2.5. Diversidade genética.....	19
2.6. Filogeografia.....	20
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	23
3.1. Obtenção do material.....	23
3.2. Extração total de DNA não-destrutiva.....	26
3.3 Identificação morfológica.....	26
3.4. Amplificação e sequenciamento do gene COI.....	27
3.5. Alinhamento e análise dos dados para DNA Barcoding.....	28
3.6. PCR-RFLP para <i>T. pretiosum</i> e <i>T. galloi</i>	29
3.7. Filogeografia de <i>T. pretiosum</i>	29
4. RESULTADOS.....	33
4.1 Identificação morfológica.....	33
4.2 DNA Barcoding e filogenia.....	34
4.3. Marcador espécie-específico para <i>T. galloi</i> e <i>T. pretiosum</i>	37
4.4. Filogeografia de <i>T. pretiosum</i>	38
5. DISCUSSÃO.....	43
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	49
REFERÊNCIAS.....	51

RESUMO

DNA Barcoding das espécies de *Trichogramma* (Hymenoptera: Trichogrammatidae) associados a lepidópteros-praga e filogeografia de *T. pretiosum* no Brasil

Os parasitoides de ovos pertencentes ao gênero *Trichogramma* Westwood (Hymenoptera: Trichogrammatidae) são comumente empregados em programas de Controle Biológico para o controle de lepidópteros-praga. Com isso, é evidente a importância da identificação correta das espécies, bem como informações sobre a dinâmica populacional histórica desse parasitoide no Brasil. Dessa forma, os objetivos deste trabalho foram: (i) produzir DNA Barcoding para espécies de *Trichogramma* economicamente importante; (ii) produzir um marcador molecular espécie-específico para diferenciação das espécies *T. pretiosum* e *T. galloi*; e (iii) estimar a diversidade genética populacional e os parâmetros demográficos da espécie *T. pretiosum*. O sequenciamento do gene *citocromo c oxidase subunidade I* (COI) foi utilizado como base para todos os estudos. Setenta e seis DNA Barcodes foram produzidos para as espécies *T. atopovirilia*, *T. bruni*, *T. foersteri*, *T. galloi*, *T. manicobai*, *T. pretiosum* e *T. rojasi*, sendo 4 deles inéditos. As espécies *T. galloi* e *T. pretiosum* apresentam problemática na identificação morfológica, porém foi concluído que possuem 9% de distância genética. O DNA Barcoding foi eficiente para separar todas as espécies com exceção de *T. bruni* e *T. foersteri*, que não apresentaram distância genética interespecíficas, ou seja, ausência de “barcoding gap”. Utilizando como base uma divergência nucleotídica comum entre as espécies de *T. pretiosum* e *T. galloi*, foi produzida com sucesso um marcador PCR-RFLP para rápida, barata e precisa identificação entre as espécies, que se torna útil para uma avaliação rápida de eventos de mistura entre as espécies em condições de laboratório. As populações de *T. pretiosum* apresentaram uma baixa diversidade haplotípica e alta estruturação genética. No entanto, as populações estão estruturadas na paisagem, mas sem seguir um padrão de distribuição espacial. Além disso, as análises apontaram para uma recente expansão demográfica e espacial da espécie. Todos os resultados obtidos, apontam para uma grande influência antrópica na demografia de *T. pretiosum*, seja pela liberação de insetos por programas de controle biológico ou pela expansão de cultivos agrícolas e consequentemente disponibilidade de hospedeiros.

Palavras-chave: Parasitoide, Identificação molecular, Marcador mitocondrial, Demografia, Diversidade genética

ABSTRACT

DNA Barcoding of *Trichogramma* species (Hymenoptera: Trichogrammatidae) associated with lepidopteran pests and phylogeography of *T. pretiosum* in Brazil

Egg parasitoids belonging to the genus *Trichogramma* Westwood (Hymenoptera: Trichogrammatidae) are commonly employed in Biological Control to control lepidopteran pests. Thus, the importance of correct species identification and information on the historical population dynamics of this parasitoid in Brazil is evident. Thus, the objectives of this work were: (i) to produce DNA Barcoding for economically important *Trichogramma* species; (ii) to produce a species-specific molecular marker for differentiating *T. pretiosum* and *T. galloi* species; and (iii) to estimate the population genetic diversity and demographic parameters of the *T. pretiosum* species. *Cytochrome c oxidase subunit I* (COI) gene sequencing was used as the basis for all studies. Seventy-six DNA Barcodes were produced for the species *T. atopovirilia*, *T. bruni*, *T. foersteri*, *T. galloi*, *T. manicobai*, *T. pretiosum*, and *T. rojasi*, 4 of them unpublished. The species *T. galloi* and *T. pretiosum* present problems in morphological identification, but it was concluded that they have a 7% of genetic distance. DNA Barcoding efficiently separated all species except *T. bruni* and *T. foersteri*, which did not show the interspecific genetic distance, that is, the absence of a “barcoding gap”. Using as a basis a common nucleotide divergence between *T. pretiosum* and *T. galloi* species, a PCR-RFLP marker was successfully produced for fast, cheap, and precise identification between species, which becomes useful for a rapid evaluation of events of mixing between species under laboratory conditions. Populations of *T. pretiosum* showed low haplotypic diversity and high genetic structure. However, populations are structured in the landscape without following a spatial distribution pattern. In addition, the analysis pointed to a recent demographic and spatial expansion of the species. All the results suggest a tremendous anthropic influence on the demography of *T. pretiosum*, either through the release of insects by biological control programs or through the expansion of crops and, consequently, the availability of hosts.

Keywords: Parasitoid, Molecular identification, Mitochondrial marker, Demography, Genetical diversity

1. INTRODUÇÃO

A demanda mundial por alimentos é uma das consequências do aumento populacional significativo que vem ocorrendo no mundo. Com isso, os países produtores devem aumentar as áreas agrícolas, através da disponibilização de novas áreas aptas à agricultura, ou expandir a produtividade. A Organização das Nações Unidas (ONU) estima que a população mundial será de 9,7 bilhões de habitantes em 2050, podendo alcançar 11 bilhões em 2100 (UNITED NATIONS, 2019). Os impactos gerados por esse aumento na população afetam o consumo dos recursos naturais e, a longo prazo, geram grande desequilíbrio nos ecossistemas. Tendo em vista a sustentabilidade do agroecossistema, os esforços de intensificação agrícola devem ser baseados em princípios ecológicos, de modo que o sistema possa ser mais resiliente, ou seja, com maior capacidade de suportar estresses bióticos e abióticos (CASSIOLATO et al., 2022).

A humanidade precisa enfrentar uma série de desafios para expandir a produção agrícola, e um problema que se destaca é a perda de safras causada por organismos nocivos (principalmente artrópodes, ervas daninhas e patógenos de plantas). O registro da batalha contra as pragas remonta à antiguidade, desde problemas durante a dinastia egípcia, Grécia e Roma Antiga, continuando na Idade Média e no período do Renascimento (ORDISH, 1976). Ao longo da história, a devastação de pragas agrícolas resultou em períodos de fome e turbulência econômica e social. Diante disso, é de vital importância que as causas das perdas de safras causadas por pragas sejam identificadas e sua magnitude avaliada (CULLINEY, 2014).

O início da Entomologia Agrícola no Brasil teve forte influência do uso de pesticidas, que foi muito aceito pelos produtores brasileiros. O controle químico prevaleceu e, com a síntese do DDT em 1939, foi utilizado em massa até meados de 1960 (PARRA, 2014). O uso indiscriminado de agroquímicos pode, potencialmente, dar origem a modificações ambientais significativas à longo prazo e destruição potencial devido à sua capacidade de penetrar nos tecidos dos vegetais, além do desenvolvimento de resistência em insetos e ácaros, efeitos nocivos nos humanos, presença de resíduos nos alimentos e água e também o surto de pragas secundárias (LEONG et al., 2020). Por essas razões, o uso de alternativas de controle mais seguras e sustentáveis aos pesticidas sintéticos tem sido de grande

interesse em vários ecossistemas agrícolas ao redor do mundo (CHERIF et al., 2021).

Entre as décadas de 50 e 60, o Manejo Integrado de Pragas (MIP) foi estabelecido como uma resposta da comunidade científica a tais problemas. A abordagem MIP é definida como uma combinação de táticas de controle com o objetivo de manter as densidades populacionais de pragas abaixo do limite econômico, levando em consideração critérios econômicos, ecológicos e sociais (BUENO et al., 2021; PARRA, 2014; SMITH et al., 1976).

O uso de organismos vivos como agentes de controle é hoje bem estabelecido como um importante componente do Manejo Integrado de Pragas. O Controle Biológico (CB) ocupa uma posição importante no MIP, pois os inimigos naturais são grandes responsáveis pelo equilíbrio do agroecossistema. O uso de artrópodes benéficos, com base na importação, aumento ou conservação de parasitoides e/ou predadores generalistas ou específicos da espécie, podem ser adotadas com sucesso contra uma ampla gama de pragas que danificam seriamente as culturas (CHERIF et al., 2021). Atualmente, os parasitoides são os inimigos naturais mais empregados no controle biológico ao redor do mundo, sendo sua maioria pertencente ao grupo Hymenoptera (COLMENAREZ, 2018).

Parasitoides de ovos pertencentes ao gênero *Trichogramma* Westwood (Hymenoptera: Trichogrammatidae) são comumente empregados em programas de Controle Biológico para controlar lepidópteros pragas (CÔNSOLI et al., 2010; PARRA; ZUCCHI, 1997; WAJNBERG; HASSAN, 1994). No Brasil, existem casos de sucesso utilizando *Trichogramma* para controlar diferentes pragas, como o tratamento de aproximadamente 3 milhões ha de cana-de-açúcar com o parasitoide *T. galloi* no controle de *Diatraea saccharalis* Fabricius (Lepidoptera; Crambidae), *T. pretiosum* controlando *Chrysodeixis includens* Walker (Lepidoptera: Noctuidae) e *Helicoverpa armigera* Hübner (Lepidoptera: Noctuidae) em soja, além da importância deste parasitoide em áreas de tomate, feijão, abacate e também algodão (COELHO JR et al., 2018). O grupo possui espécies olígofagas e polígafas, com hospedeiros associados a diversas ordens, como Hemiptera, Lepidoptera, Coleoptera e Neuroptera (QUERINO et al., 2010).

Para obter sucesso nos programas de controle biológico utilizando espécies de *Trichogramma*, é necessário a correta identificação das mesmas, a fim de selecionar a espécie e linhagem do parasitoide que controle mais eficientemente a

praga alvo (BORBA et al., 2005). Um dos desafios no estudo desse grupo é a sua complexidade taxonômica, visto que estes insetos possuem tamanho diminuto (<1 mm), variação intraespecífica e espécies crípticas, além de haver discussão na literatura acerca do nome de diversas espécies (QUERINO et al., 2010).

Inicialmente, a identificação de *Trichogramma* era baseada na morfologia externa dos adultos, e utilizava-se caracteres como a coloração, a densidade das cerdas na asa e o comprimento das cerdas na antena para a separar as espécies, porém, havia pouca confiabilidade nesses caracteres, visto que poderiam variar com o tamanho do corpo e fatores ambientais. A taxonomia moderna desse táxon iniciou com o trabalho de Nagarkatti & Nagaraja (1968, 1971), que utilizava a genitália do macho para diferenciar as espécies (PINTO; STOUTHAMER, 1994), facilitando a identificação de maneira precisa, ainda que muitas espécies importantes compartilham estruturas genitais semelhantes (STOUTHAMER et al., 1999). A maior limitação dessa nova técnica é que as fêmeas de *Trichogramma* não são possíveis de identificar, visto que não foram definidos caracteres que as diferem, e existem algumas populações dentro das espécies desse grupo que consistem apenas em fêmeas. Isso é um exemplo de reprodução por telitoquia, em que ovos não fertilizados dão origem a fêmeas e elas também podem produzir fêmeas a partir de ovos não fertilizados (STOUTHAMER; KAZMER, 1994).

Desse modo, a biologia molecular cresceu expressivamente sendo utilizada em auxílio à identificação taxonômica. Abordagens genômicas para diagnóstico de táxons exploram a diversidade entre sequências de DNA para identificar organismos, tais sequências são consideradas um “código de barras” genético inserido em cada célula do organismo, assim, o uso de técnicas com marcadores moleculares permite uma identificação mais rápida e que não exige extraordinário conhecimento especializado (HEBERT et al., 2003). Além disso, auxilia a determinar posições sistemáticas e avaliar a diversidade no ecossistema, pois esses métodos fornecem uma compreensão mais aprofundada das variações e semelhanças entre os insetos e podem fornecer explicações evolutivas entre diferentes espécies. Análises moleculares e análises filogenéticas utilizando marcadores moleculares também podem explicar as relações entre diferentes estágios de desenvolvimento, polimorfismo de castas em insetos sociais, rastrear os movimentos dos indivíduos, medir a endogamia, caracterizar novas espécies e refazer os padrões históricos de dispersão (MANDAL et al., 2014).

A região padrão do DNA barcoding, fragmento do gene mitocondrial COI (*citocromo c oxidase subunidade I*), é usada em estudos filogenéticos em espécies de animais e mostrou-se extremamente eficiente para a identificação de aves, peixes, moscas (HEBERT et al., 2003). As características desse marcador o fizeram ser selecionado como barcoding universal, como: transmissão materna estrita com alta taxa de mutação (geralmente mostra níveis relativamente altos de polimorfismo e pode revelar múltiplas linhagens genéticas dentro e entre as populações), ausência de recombinação (haploide, então as linhagens mitocondriais podem ser identificadas de maneira muito mais direta do que as linhagens nucleares), alta variação intraespecífica, facilidade em manejar e interpretar os resultados, altos eventos de deleção de inserção e alta taxa de substituição de nucleotídeos (JINBO et al., 2011; MANDAL et al., 2014; RICCHLY; LEISTER, 2004).

Junto com a identificação correta das espécies, um programa de controle bem-sucedido conta com informações sobre a diversidade genética das populações. É importante obter um conhecimento da diversidade local a fim de conservar um reservatório de parasitoides nativos, já que outras pragas podem surgir no futuro ou ter um surto populacional. E, futuras modificações ambientais podem dar origem a variações intraespecíficas que podem alterar o papel dos parasitoides na regulação de outras populações de insetos (VIANA et al., 2020).

A sequência e estrutura dos genes mitocondriais (mtDNA) fornecem informações evolutivas e comparativas, bem como informações sobre evolução molecular e padrões de fluxo gênico, recursos filogenéticos e genéticos populacionais. Como o mtDNA é haploide e herdado de forma uniparental, possui menos cópias e torna-se relativamente sensível a eventos demográficos, como gargalos genéticos (FREELAND, 2005).

Apesar da importância em programas de manejo e a ampla comercialização de *Trichogramma*, ainda existe uma carência sobre informações da diversidade genética e estrutura populacional desse parasitoide nas diferentes regiões brasileiras. Dessa forma, a filogeografia torna-se uma ferramenta apropriada para explorar aspectos da diversidade das espécies e está rapidamente se tornando um dos campos mais integrados em toda a ecologia e biologia evolutiva (HICKERSON et al., 2010; PAPADOPOULOU; KNOWLES, 2016). Essa abordagem está intimamente relacionada à demografia e possibilita o entendimento de processos da história evolutiva das populações que formou a distribuição geográfica atual de

genes, populações e espécies (AVISE, 2000). Estudos de polimorfismos do mtDNA indicam que muitas espécies são fortemente estruturadas filogeneticamente e que sua evolução não pode ser totalmente compreendida sem referências a essa estrutura filogeográfica intraespecífica (AVISE et al., 1987).

As abordagens moleculares oferecem muito para o estudo e desenvolvimento do controle biológico, porém Chisholm et al. (2014) enfatizaram a necessidade de que seu uso seja adequado à questão específica e que atenção semelhante seja dada a novas abordagens estatísticas e digitais. Estudos usando abordagens inovadoras são necessários para avançar o conhecimento da taxonomia e diversidade genética de espécies economicamente importantes de *Trichogramma*. Desta forma, os objetivos específicos foram: (i) produzir DNA Barcoding das espécies de *Trichogramma* associados a lagartas pragas de grandes culturas no Brasil; (ii) construir um marcador PCR-RFLP, baseado no gene COI, para rápida identificação de *Trichogramma pretiosum* e *T. galloi*; e (iii) estimar a diversidade genética, a estrutura das populações e os parâmetros demográficos de *T. pretiosum* coletados em áreas agrícolas de diferentes regiões brasileiras.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. *Trichogramma* e sua importância agrícola

Trichogramma Westwood (Hymenoptera: Trichogrammatidae) é um gênero de parasitoides de ovos, considerado o maior dentro da família Trichogrammatidae (PINTO, 1999), com cerca de 235 espécies registradas no mundo todo, 41 na América do Sul e, destas, 29 são encontradas no Brasil (QUERINO; ZUCCHI, 2019). Além disso, mais da metade das espécies de *Trichogramma* apresentam distribuição estreita, sendo 18 delas registradas exclusivamente no Brasil (QUERINO; ZUCCHI, 2019). Muitas espécies desse gênero são agentes eficientes e amplamente utilizados no controle contra várias pragas agrícolas e florestais, principalmente porque esse parasitoide elimina a praga antes que o dano seja causado à cultura, pelo fato de ter uma ampla distribuição geográfica, ser altamente especializado e eficiente, e ter sido constatado parasitando ovos de pragas de milho, arroz, soja, cana-de-açúcar, sorgo, algodão, beterraba, tomate, florestas, pomares, hortaliças, oliveira, banana, mandioca e ornamentais (CÔNSOLI et al., 2010; HASSAN, 1993).

A liberação de *Trichogramma* para o controle biológico de lepidópteros-praga vem sendo considerada há mais de 100 anos, e em uma grande diversidade de culturas, incluindo culturas economicamente importantes como, soja, milho, tomateiro, cana-de-açúcar, entre outras (PARRA; ZUCCHI, 2004; WANG et al., 2014). No Brasil, tem crescido o uso de espécies de *Trichogramma* para o controle biológico, devido à maior aceitação e maior disponibilidade desse parasitoide em laboratórios.

Para controlar *Spodoptera frugiperda* J. E. Smith (Lepidoptera: Noctuidae), *T. pretiosum* foi liberado em cerca de 20 mil hectares correspondentes à cultura do milho. Além disso, essa espécie também foi empregada para o controle de *Tuta absoluta* Meyrick (Lepidoptera: Gelechiidae) e *Neoleucinodes elegantalis* Guenée (Lepidoptera: Crambidae) (PARRA, 2010; VASCONCELOS, 2012).

As espécies de *Trichogramma* estão associadas principalmente a lepidópteros economicamente importantes. A grande maioria pertence à família Noctuidae, incluindo as principais pragas agrícolas, como *Alabama argilacea* Hübner no algodão, *Anticarsia gemmatalis* Hübner na soja e *Helicoverpa zea* Boddie e *S. frugiperda* no milho. No entanto, várias borboletas não economicamente importantes, como *Heliconius erato phyllis* Fabricius, *Hamadryas feronia* Linnaeus e

Mechanitis lysimnia Fabricius são atacadas principalmente por *T. bruni* e *T. acacioi*, que ocorrem em habitats florestais (ZUCCHI et al., 2010).

No Brasil, o uso de *Trichogramma* spp. para o manejo de pragas destaca-se principalmente pela facilidade de multiplicação por meio de técnicas de criação em laboratório, sobretudo após a mariposa da farinha *Ephestia kuehniella* Zeller ter sido avaliada como um hospedeiro adequado para a criação em massa de *Trichogramma* (COELHO JR; PARRA, 2013; CÔNSOLI et al., 2010).

Esse fato atraiu o interesse de várias empresas comerciais que hoje produzem esse inimigo natural em grande escala (PARRA, 2019). Em 2010, *T. galloi* foi liberado em 500 mil hectares de cana-de-açúcar para controlar *D. saccharalis* (PARRA et al., 2010) e em 2020 foi já utilizado em três milhões de hectares (PARRA et al., 2021). Da mesma forma, *T. pretiosum* foi liberado em 250 mil hectares de soja para o controle de *Chrysodeixis includens* Walker e *Helicoverpa armigera* Hübner na safra de 2013-2014 e, atualmente, passou a ser utilizado em cultivos protegidos de tomateiro e difundido em áreas irrigadas do nordeste do Brasil. Assim, o uso de *Trichogramma* faz parte de um dos maiores programas de controle biológico do mundo (PARRA, 2019; PARRA; COELHO JR, 2019).

2.2. Taxonomia e identificação de *Trichogramma*

A identificação morfológica de *Trichogramma* teve início com caracteres diagnósticos do macho, como coloração, densidade das cerdas nas asas e padrão e comprimento das cerdas nas antenas (STOUTHAMER et al., 1999). Tais características podem variar com o tamanho do corpo, estação do ano, temperatura de criação e o hospedeiro no qual o adulto foi criado (KNUTSON, 1998). Devido a essas dificuldades e à falta de espécimes-tipo, os nomes das espécies na literatura da América do Norte antes de 1968 foram usados incorretamente e inconsistentemente e, portanto, tornaram-se não confiáveis (PINTO; STOUTHAMER, 1994).

A partir do trabalho realizado por Nagarkatti & Nagaraja (1968, 1971), a genitália masculina passou a ser a base da taxonomia de *Trichogramma*, sendo o principal meio de identificação atualmente. Diferenças na cor do corpo, nervuras das asas e nas características das antenas servem como caracteres de suporte na diagnose das espécies (KNUTSON, 1998). Utilizando esta técnica, cerca de 200 espécies foram descritas (PINTO, 1999). Entretanto, ao utilizar características da

genitália apenas de machos para identificação, as fêmeas tornam-se impossíveis de identificar. Isso apresenta um problema particular para formas completamente partenogéticas nas quais os machos não estão presentes (STOUTHAMER et al., 1990). Algumas linhagens de insetos pertencentes à ordem Hymenoptera se reproduzem por telitoquia (LUCK et al., 1993). Na telitoquia, ovos não fertilizados dão origem a fêmeas e as mesmas também podem produzir filhas a partir de ovos não fertilizados, o que pode ocasionar em linhagens de telitoquia que persistem por várias gerações na ausência de machos e reprodução sexual (STOUTHAMER; KAZMER, 1994). A reprodução por telitoquia foi reportada em espécies de *Trichogramma*, incluindo as importantes espécies para o Controle Biológico (CB) no Brasil, *T. pretiosum* e *T. galloi* (BERTIN et al., 2018; CÔNSOLI et al., 2001; STOUTHAMER et al. 1990; 1994).

Conhecidas como vespas diminutas, esses insetos possuem cerca de 0,25mm de comprimento, fator que também torna a identificação morfológica complicada. As características morfológicas diagnósticas requerem conhecimento especializado para interpretação, visto que muitas espécies importantes compartilham estruturas genitais semelhantes e os caracteres muitas vezes são intraespecificamente variáveis e sujeitos à plasticidade fenotípica (STOUTHAMER et al., 1999). Aliada a isso, a preparação do espécime para identificação morfológica é demorada e requer muito treinamento, pois para analisar detalhadamente o espécime deve ser montado em lâminas (CIOCIOLA et al., 2001; PLATNER et al, 1998).

A espécie *T. pretiosum* é amplamente utilizada e comercializada para programas de C. B. no Brasil, bem como *T. galloi*, com 11 empresas cadastradas no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) para comercializar esses agentes no Brasil (PARRA; COELHO JR, 2022). De modo geral, essas espécies são vistas como complexas de se identificar e ocasionam em problemas práticos em sua utilização. Caracteres como comprimento e espessura das cerdas flageliformes, extensão da lâmina dorsal, distinção do processo intervolselar e comprimento da carena ventral são difíceis de se analisar e, geralmente, requerem um especialista para fazer a diferenciação. Por fim, a separação dessas duas espécies é de grande interesse para estratégias de controle e programas de MIP.

2.3. Identificação molecular e DNA Barcoding

Técnicas utilizando marcadores moleculares têm contribuído significativamente para a nossa compreensão da genética populacional, taxonomia, biologia da conservação e diversidade genética dentre as populações naturais de insetos (VAN OOSTERHOUT; VAN HEUVEN; BRAKEFIELD, 2004). Estudos sobre variações intraespecíficas e diferenciação de espécies de *Trichogramma* vêm sendo feitos através do sequenciamento das regiões do DNA ribossomal do espaço transcrito interno (ITS1 e ITS2) (CIOCIOLA et al., 2001; ORREGO; AGUDELO-SILVA, 1993; POLASZEK, et al., 2012; STOUTHAMER et al., 1999; VIANA et al., 2020).

A escolha de um marcador molecular em uma determinada análise é crucial, e o mtDNA possui muitas vantagens em estudos filogenéticos. Possuem transmissão materna específica com alta taxa de mutação devido ao sistema de reparo limitado (5-10 vezes o do DNA nuclear), estrutura simples conservada e facilidade de replicação dos resultados (BROWN et al., 1979; JINBO et al., 2011). Com isso, é possível desenvolver primers universais e simplifica a obtenção de DNA de amostras biológicas pequenas ou degradadas devido ao seu alto número de cópias na maioria das células com uma taxa de evolução diferente em diferentes regiões do DNA mitocondrial (MANDAL et al., 2014).

O gene *citocromo c oxidase subunidade I* (COI) do DNA mitocondrial tem sido amplamente utilizado como marcador popular para o entendimento das relações evolutivas em Trichogrammatidae (VENKATESAN et al., 2016). Venkatesan et al. (2016) também constaram a importância da região COI para discriminar espécies no estudo do DNA Barcoding de Trichogrammatídeos, revelando que esse gene possui regiões mais variáveis que permitem melhor discriminação entre as diferentes espécies de *Trichogramma*, e que tem potencial para gerar DNA Barcodings para esse grupo. Recentemente, um estudo de Ivezić et al. (2020) identificou espécies de *Trichogramma* pelo sequenciamento do gene COI e essas sequências foram posteriormente utilizadas para investigar a estrutura genética de populações coletadas em diferentes partes da Sérvia. Portanto, ressalta-se que, atualmente, têm sido utilizadas ferramentas moleculares através do COI para a identificação e para o entendimento das relações evolutivas de *Trichogramma*.

2.4. Identificação molecular por PCR-RFLP

Devido às altas taxas de mutação, o DNA mitocondrial evolui muito mais rápido que o DNA nuclear e, portanto, contém mais diversidade de sequência em comparação com o DNA nuclear, facilitando a identificação de espécies intimamente relacionadas. Um dos primeiros marcadores difundidos que quantificaram a variação nas sequências de DNA foi o Restriction Fragment Length Polymorphisms (RFLP) (WOLF et al., 1999).

O método de PCR-RFLP, com visualização rápida em gel, é uma ferramenta rápida e eficiente para identificação molecular e confirmação de espécies crípticas. Os dados são gerados usando enzimas de restrição, que cortam o DNA em sequências específicas curtas, através da clivagem da dupla fita de DNA (FREELAND, 2005). O PCR-RFLP tem sido amplamente utilizado para diferenciar espécies, raças e haplótipos: como exemplo para as raças milho e arroz de *Spodoptera frugiperda* nos Estados Unidos, México, Brasil e Argentina, e diferenciação entre as espécies de *Helicoverpa zea* e *H. armigera* no Brasil (BEHERE et al., 2008; LEVY et al., 2002).

2.5. Diversidade genética

A variação genética entre os indivíduos de uma população fornece uma base para a plasticidade e adaptabilidade, de modo que uma multiplicidade de genótipos (diversidade genética) fornece uma gama maior de respostas funcionais possíveis (versatilidade fisiológica) e, portanto, uma probabilidade maior de que uma população resistirá de uma perturbação (resiliência ecológica). O conhecimento sobre o papel da diversidade genética na sustentação do desempenho das espécies e da vulnerabilidade do ecossistema é crítico para mitigar com sucesso os impactos das pressões, como a superexploração da população, poluição, espécies invasoras e aquecimento global (WERNBERG et al., 2018).

Nas relações entre pragas e inimigos naturais, as interrupções da interação levam a serviços de controle biológico enfraquecidos e aumento dos riscos de surtos de pragas. Além disso, quando os inimigos naturais não conseguem rastrear com eficiência seu hospedeiro em expansão em áreas recém-colonizadas, os níveis subsequentes de mortalidade da praga tendem a aumentar sua dinâmica populacional e, portanto, sua taxa de expansão (SIMONATO et al., 2019). Inferir rotas de expansão e caracterizar a dispersão de inimigos naturais é uma etapa

essencial para desenvolver métodos eficientes de manejo de espécies invasoras ou em expansão.

Genética de populações e estudos filogeográficos de inimigos naturais são ferramentas necessárias para entender a dinâmica de rastreamento de hospedeiros dessas espécies em áreas recentemente colonizadas por seus hospedeiros (GEBIOLA et al., 2014).

2.6. Filogeografia

Segundo Avise et al. (1987), a filogeografia estuda os princípios e processos que determinam a distribuição geográfica de linhagens genealógicas, abordando as relações filogenéticas entre os táxons estudados, além dos componentes históricos responsáveis pela distribuição espacial das linhagens. Essa abordagem inclui micro e macroevolução e lida com a distribuição espacial de alelos cuja relação filogenética pode ser inferida.

O objetivo principal da filogeografia é compreender como os eventos históricos ajudaram a moldar a atual dispersão geográfica de genes, populações e espécies. Ao comparar as relações evolutivas das linhagens genéticas com suas localizações geográficas, é possível obter um melhor entendimento de que fatores têm maior influência nas distribuições da variação genética. Portanto, abrange aspectos do tempo (relações evolutivas) e do espaço (distribuições geográficas) (FREELAND, 2005).

A filogeografia está rapidamente se tornando um dos campos mais integradores em toda a ecologia e biologia evolutiva (HICKERSON et al., 2010; PAPADOPOULOU; KNOWLES, 2016). Estruturas de pesquisa filogeográfica conceituais recentes defendem uma mudança de paradigma por meio da implementação de abordagens baseadas em modelos informados biologicamente para abordar hipóteses refinadas sobre os processos ecológicos e evolutivos que moldam os padrões de variação genética em larga escala.

Ortego & Knowles (2020) introduzem competição interespecífica e avaliam o ajuste de padrões de dados genômicos a previsões específicas de espécies de acordo com várias hipóteses biologicamente informadas. Mostram, também, que as interações bióticas são importantes para a pesquisa da filogeografia, pois contribuem para moldar as distribuições das espécies e padrões de variação genética em toda a gama.

Pesquisas adicionais nesta direção fornecerão previsões importantes da dinâmica das espécies em face da mudança global, como a identificação de características-chave específicas das espécies para manter o potencial evolutivo ou avaliar as diferenças na vulnerabilidade das espécies dependendo dos padrões espaciais da biodiversidade. Os estudos de filogeografia confirmam a importância dos processos históricos na formação das distribuições atuais de genes e espécies e, portanto, devemos incorporar a história aos fundamentos teóricos da ecologia molecular (FREELAND, 2005).

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Obtenção do material

O material referente a espécies de *Trichogramma* de interesse econômico foi recebido com a ajuda de colaboradores e pesquisadores de diferentes instituições do Brasil, com linhagens de diversas regiões oriundos de criações de laboratórios e coletados em campo. Dentre as espécies, foram amostradas: *Trichogramma atopovirilia*, *Trichogramma bruni*, *Trichogramma foersteri*, *Trichogramma galloi*, *Trichogramma manicobai*, *Trichogramma pretiosum* e *Trichogramma rojasi*, abrangendo oito estados brasileiros (Paraná, Mato Grosso do Sul, São Paulo, Minas Gerais, Espírito Santo, Goiás, Mato Grosso e Bahia), além de uma amostra internacional proveniente do Estado da Califórnia (EUA). Os hospedeiros foram variáveis, com *Trichogramma* encontrado em *Anicla infecta*, *Anticarsia gemmatalis*, *Chrysodeixis includens*, *Diatraea saccharalis*, *Erinnyis ello*, *Helicoverpa zea*, *Manduca* sp., *Spodoptera cosmioides* e *Spodoptera frugiperda* (Tabela 1).

Todas as amostras permaneceram acondicionadas em frasco Eppendorff contendo álcool etílico absoluto e armazenadas em freezer -20°C até a extração do DNA no Laboratório de Ecologia Molecular de Artrópodes (ESALQ/USP).

Tabela 1. Informações sobre as populações de *Trichogramma* spp. coletadas em diferentes localidades.

Espécie	N	Cidade, Estado	Código	Latitude (S)	Longitude (O)	Hospedeiro	Planta associada
<i>T. atopovirilia</i>	1	São José dos Pinhais, PR	Ta_SjpP R	25°32'4.53"	49°12'11.77"	<i>H. zea</i>	<i>Zea mays</i>
<i>T. atopovirilia</i>	2	São José dos Pinhais, PR	Ta_SjpP R	25°32'4.53"	49°12'11.77"	<i>A. gemmatalis</i>	<i>Glycine max</i>
<i>T. bruni</i>	3	Fazenda Rio Grande, PR	Tb_FrgP R	25°38'55.68"	49°18'28.50"	<i>A. gemmatalis</i>	<i>Glycine max</i>
<i>T. bruni</i>	7	Lapa, PR	Tb_LaPR	25°46'9.29"	49°42'57.82"	<i>A. gemmatalis</i>	<i>Glycine max</i>
<i>T. foersteri</i>	7	São José dos Pinhais, PR	Tf_SjpP R	25°32'4.53"	49°12'11.77"	<i>A. gemmatalis</i>	<i>Glycine max</i>
<i>T. manicobai</i>	1	Mar. Cândido Rondon, PR	Tm_MrP R	24°33'22.21"	54° 3'32.43"	<i>E. ello</i>	-
<i>T. rojasi</i>	3	Fazenda Rio Grande, PR	Tr_FrgP R	25°38'55.68"	49°18'28.50"	<i>A. gemmatalis</i>	<i>Glycine max</i>
<i>T. pretiosum</i>	6	Entre Rios do Oeste, PR	Tp_ErPR	24°42'23.62"	54°14'35.92"	<i>A. gemmatalis</i>	-
<i>T. pretiosum</i>	3	Entre Rios do Oeste, PR	Tp_ErPR	24°42'23.62"	54°14'35.92"	<i>C. includens</i>	-
<i>T. pretiosum</i>	1	Entre Rios do Oeste, PR	Tp_ErPR	24°42'23.62"	54°14'35.92"	<i>S. cosmioides</i>	-
<i>T. pretiosum</i>	1	Entre Rios do Oeste, PR	Tp_ErPR	24°42'23.62"	54°14'35.92"	<i>E. ello</i>	-
<i>T. pretiosum</i>	1	Pinhais, PR	Tp_PiPR	25°25'56.52"	49°11'35.97"	<i>H. zea</i>	<i>Zea mays</i>
<i>T. pretiosum</i>	2	Lapa, PR	Tp_LaPR	25°46'9.29"	49°42'57.82"	<i>A. gemmatalis</i>	<i>Glycine max</i>
<i>T. pretiosum</i>	2	Maracaju, MS	Tp_MaM S	21°37'49.21"	55° 9'34.61"	-	<i>Zea mays</i>
<i>T. pretiosum</i>	4	Ivinhema, MS	Tp_IvMS	22°18'28.84"	53°49'34.04"	<i>E. ello</i>	<i>Manihot esculenta</i>
<i>T. pretiosum</i>	2	Pardinho, SP	Tp_PaS P	23° 4'46.76"	48°22'32.02"	-	<i>Brassica</i> sp.
<i>T. pretiosum</i>	2	Botucatu, SP	Tp_BoS P	22°53'12.70"	48°26'35.34"	-	<i>Brassica</i> sp.
<i>T. pretiosum</i>	3	Mogi Mirim, SP	Tp_MoS P	22°25'57.77"	46°57'28.18"	-	<i>Brassica</i> sp.
<i>T. pretiosum</i>	1	Avaré, SP	Tp_AvSP	23° 5'54.51"	48°55'23.26"	<i>S. frugiperda</i>	<i>Zea mays</i>
<i>T. pretiosum</i>	2	Piracicaba, SP	Tp_PiSP	22°44'12.08"	47°38'57.79"	<i>A. infecta</i>	<i>Musa</i> sp.
<i>T. pretiosum</i>	7	Três Corações, MG	Tp_TcM G	21°41'53.66"	45°15'32.23"	-	<i>Persea americana</i>

<i>T. galloi</i>	4	Santa Vitória, MG	Tg_SvM G	18°50'50.19"	50° 7'26.15"	<i>D. sacharalis</i>	-
<i>T. pretiosum</i>	4	Alegre, ES	Tp_AIES	20°45'49.05"	41°32'7.61"	-	<i>Solanum lycopersicum</i>
<i>T. pretiosum</i>	4	Rio Verde, GO	Tp_RvG O	17°47'33.95"	50°55'10.49"	<i>C. includens</i>	<i>Glycine max</i>
<i>T. pretiosum</i>	1	Tangará da Serra, MT	Tp_TsM T	14°37'11.08"	57°29'15.07"	<i>C. includens</i>	<i>Glycine max</i>
<i>T. pretiosum</i>	3	Sorriso, MT	Tp_SoM T	12°32'26.61"	55°43'21.63"	<i>C. includens</i>	<i>Glycine max</i>
<i>T. pretiosum</i>	2	Cocos, BA	Tp_CoB A	14°11'4.82"	44°32'27.13"	-	-
<i>T. pretiosum</i>	1	Irvine, CA, EUA	CA, EUA	33°41'4.44"	117°49'35.42"	<i>Manduca sp.</i>	<i>Solanum lycopersicum</i>
Total	80						

3.2. Extração total de DNA não-destrutiva

O DNA genômico foi extraído de todo o inseto com base no método de extração não-destrutiva proposto por Gilbert et al. (2007) e adaptado para extração de micro-himenópteros (WENGRAT et al., 2021). Para isso, foi colocado um único inseto em tubo Eppendorf de 1,5 ml totalmente imerso em 250µL do tampão de digestão [3µL CaCl₂, 20mg dodecil sulfato de sódio (SDS) 2%, 40µL ditioneitol (DTT), 10µL Tris pH 8 e 100µL NaCl], adicionados 10 µL de proteinase K (20 mg/ml) e as amostras foram incubadas de 16-20h a 65°C em banho-maria. Passado esse período, o inseto foi transferido para um novo tubo contendo etanol 70% e estocado em freezer -20°C para posterior identificação morfológica.

Como continuidade, foi feita a lavagem com solução de clorofórmio (CIA), centrifugado por 20 minutos a 13.000 RPM em temperatura ambiente e o sobrenadante foi transferido para novo tubo Eppendorf, adicionando 1/10 do volume total de acetato de sódio (3M, pH 5,2) e 3 µL de glicogênio (5mg/ml). Foi inserido 0,7X de Isopropanol 100% gelado ao volume de DNA e incubado overnight a -20°C. O DNA obtido ao final do processo foi ressuscitado em 25 µL de água ultrapura e armazenado em freezer a -20 °C até a futura utilização.

A integridade, qualidade e pureza do DNA extraído foram avaliadas via eletroforese em gel de agarose a 0,8%. A visualização foi possível pela coloração das amostras com SYBR Safe (Life Technologies) e posterior visualização em transiluminador UV acoplado a fotodocumentador.

3.3 Identificação morfológica

Após a extração de DNA, os espécimes foram submetidos ao processo de montagem de lâmina permanente adaptado de Platner et al. (1999) e Querino & Zucchi (2011). Como o processo de extração de DNA clarifica os insetos, os indivíduos foram diretamente lavados e desidratados com etanol (70, 80, 90 e 100%) em recipiente de cerâmica, 20 minutos em cada concentração. Após a lavagem, foi adicionado óleo de cravo e deixado por aproximadamente 2 horas até a secagem total do álcool. Passado esse período, foi inserida uma gota de Bálsamo-do-Canadá e os espécimes foram deixados em repouso overnight e posteriormente foi adicionado mais Bálsamo-do-Canadá.

Para a montagem foram utilizadas lâminas de vidro Knittel Glass 76x26mm. O posicionamento é a etapa mais crítica e difícil no processo de montagem, deve ser

garantido que o corpo e, mais importante, a genitália estejam na posição adequada para o estudo. Sendo posicionados corretamente, os insetos foram colocados para secagem em estufa a 37°C por 15 dias e, após esse tempo, foram cobertos com lamínula redonda Knittel Glass 6mm e postos de volta à estufa para finalizar a secagem. Todas as lâminas foram devidamente etiquetadas (NOYES, 1985).

A identificação morfológica seguiu a chave descrita por Querino & Zucchi (2011), utilizando as estruturas anatômicas dos machos. As principais estruturas para a taxonomia de *Trichogramma* são a genitália (lâmina dorsal, processo intervolselar, volselas, carenas, processos ventrais, parâmeros, lâmina dorsal), antenas, escutelo e asas. A terminologia para as estruturas morfológicas foi baseada em Pinto (1999, 2006). Para confirmar as espécies, as lâminas foram enviadas para a Dra. Ranyse Querino (Embrapa Cerrado), que procedeu com a identificação morfológica.

3.4. Amplificação e sequenciamento do gene COI

O gene alvo do estudo foi o gene mitocondrial (mtDNA) *citocromo c oxidase subunidade I* (COI), que foi amplificado através de reação em cadeia da polimerase (PCR), adaptando os procedimentos de Rugman-Jones et al. (2010). A reação teve um volume total de 25µL, sendo 6µL DNA, 2,5µL 10X Buffer Platinum, 1,5µL MgCl₂ (50mM), 0,250µL dNTPs (10mM), 0,5µL primers *forward* e *reverse* (10 pmol/µL), 0,150µL Platinum™ Taq DNA Polymerase (1U) e 11,4µL de água ultrapura. Para amplificação do fragmento do gene COI, foram utilizados os primers específicos Trich-F1: 5' GCAGGAATTRTTGGTTTATC 3' e Trich-R1 5' CCWGAAGGYTCAAAAATGAAG 3' aqui desenvolvidos utilizando sequências previamente produzidas depositadas no banco de dados e nesse trabalho.

Os procedimentos realizados em termociclador seguiram: temperatura de desnaturação inicial de 94°C (5 min) seguido por 3 ciclos de desnaturação a 94°C (45s), temperatura de anelamento a 55°C (45 s), temperatura de alongamento a 72°C (1 min 30s) e extensão final a 72°C (15 min). Os amplicons foram visualizados sob luz ultravioleta, após eletroforese em gel de agarose a 1,5% corado com SYBR Safe.

O produto da PCR foi purificado utilizando a combinação das enzimas Exo I (Exonuclease I) e rSAP (Shrimp Alkaline Phosphatase) e sequenciado pelo método

de Sanger no Laboratório de Biotecnologia Agrícola (CEBTEC), localizado na Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” (ESALQ/USP).

3.5. Alinhamento e análise dos dados para DNA Barcoding

Após o recebimento das sequências, o cromatograma foi analisado utilizando o software Benchling [Biology Software] (2022) para conferir a qualidade do sequenciamento. Posteriormente, as sequências foram editadas para remoção dos fragmentos com qualidade não satisfatória e o tamanho foi padronizado em 556 pb. Um arquivo.FASTA foi criado com as sequências de todas as espécies de *Trichogramma* para alinhamento, cálculo da distância genética e uma análise preliminar no software MEGA 7 (KUMAR et al., 2018). O alinhamento foi realizado utilizando o algoritmo de CrustalW com o default do programa. Posteriormente, foi checada a presença de NUMTs como descrito por Corrêa et al. (2017), e, após o alinhamento, foi realizado o cálculo da distância genética par-a-par utilizando o modelo evolutivo Kimura 2-parâmetros (K2-P), recomendado para DNA barcoding para conferência da homologia entre as identificações morfológicas e moleculares (HEBERT et al., 2003).

Todas as sequências obtidas foram analisadas de maneira conjunta com outras sequências oriundas de indivíduos da mesma espécie (coespecíficas) e de indivíduos de espécies diferentes (interespecíficas) com intuito de testar a presença de linhagens genéticas e espécies crípticas. As análises incluem cálculo de distância genética e análises filogenéticas para testar a monofilia de gêneros e espécies. As análises de distância genética foram realizadas no software MEGA 7 (KUMAR et al., 2018).

Já a filogenia bayesiana foi gerada para identificar as relações entre os espécimes sequenciados. O melhor modelo evolutivo foi calculado no MRMODELTEST v2.3 (NYLANDER et al., 2004). A árvore filogenética bayesiana calculada no MRBAYES (RONQUIST; HUELSENBECK, 2003) foi executada em quatro corridas simultâneas de 10 milhões de gerações cada, com uma cadeia fria e três cadeias aquecidas em cada execução. No final das corridas, os primeiros 25% das árvores foram descartados pelo processo de *burnin*. A árvore de consenso foi obtida com probabilidades posteriores > 0,50. Como outgroup foi utilizado um espécime do gênero *Oligosita* (Hymenoptera: Trichogrammatidae) coletado no BoldSystem (KR786124).

3.6. PCR-RFLP para *T. pretiosum* e *T. galloi*

Baseado nas diferenças nucleotídicas entre as sequências de DNA Barcoding entre os indivíduos de *T. pretiosum* e *T. galloi*, foi desenhado um conjunto de primers para amplificação de um fragmento de 344 pb para ambas as espécies (Tabela 2). O procedimento foi realizado utilizando a mesma reação de PCR para o fragmento barcode do gene COI de *Trichogramma* como descrito acima, diferenciando apenas os primers. Posteriormente, foi utilizada a enzima de restrição *BtsI/MutI* que corta especificamente o sítio CAGTG, presente no fragmento de COI amplificado em *T. galloi* mas não em *T. pretiosum*. Assim, após a PCR o fragmento de *T. galloi* de 344 pb é cortado em dois fragmentos de 223 e 121 pb. A reação utilizada para a enzima de restrição foi uma adaptação do protocolo padrão da enzima: 1,0µL Buffer, 1,5µL enzima, 3µL amplicon de PCR e 4,5µL água ultrapura, seguido de banho-maria a 55°C por 1 hora. A verificação foi feita através de eletroforese em gel de agarose 3%, corado com SYBR Safe e visualizado sob luz ultravioleta (WOLF et al., 1999).

Tabela 2. Primers desenvolvidos para amplificação de um fragmento de 344 pb de *T. galloi* e *T. pretiosum* para implementação da técnica de PCR-RFLP.

Primer	Sequência	pb
IDTri_F	GTCCTGATATAGCTTTTCCTCG	344
IDTri_R	TGCACCTGCTAATACTGGTAAA	

3.7. Filogeografia de *T. pretiosum*

Para a abordagem filogeográfica, as populações de *T. pretiosum* foram divididas em três grupos, de acordo com suas distribuições geográficas e biomas brasileiros que abrangem (Figura 1): Grupo 1, Grupo 2 e Grupo 3.

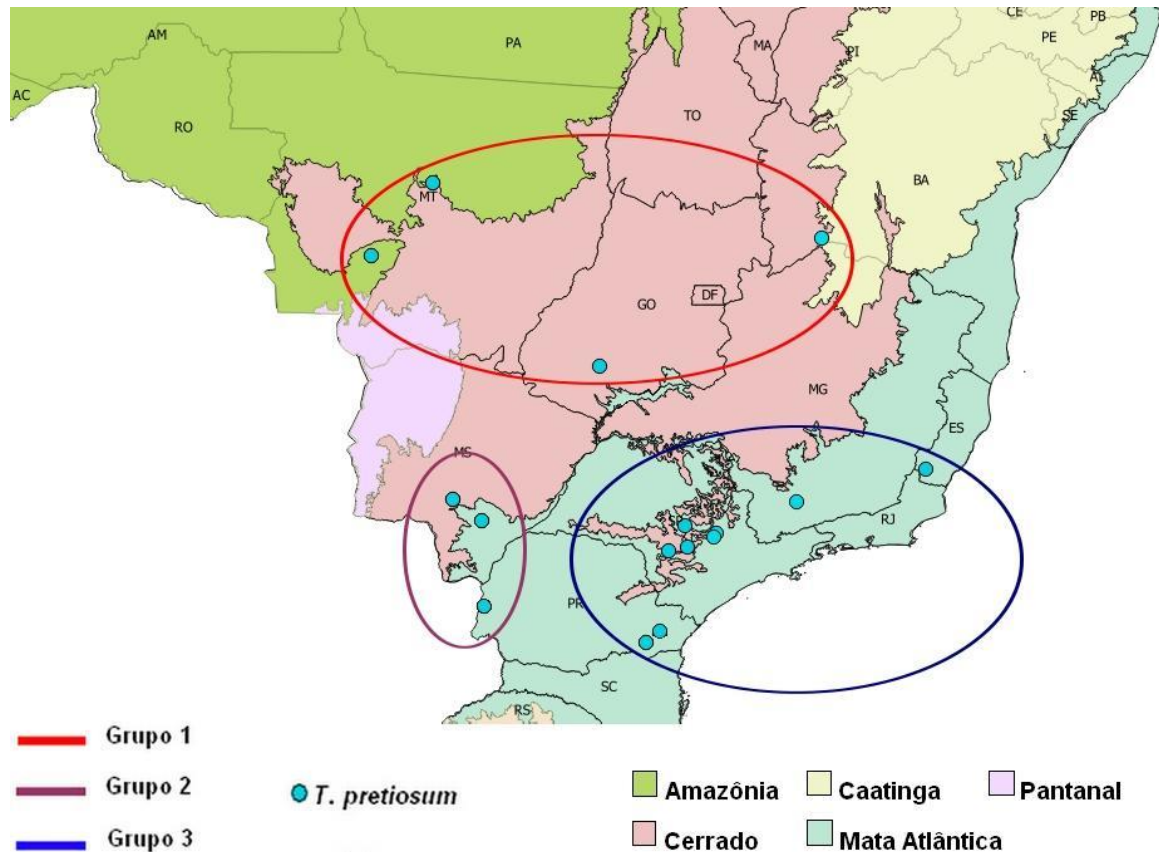


Figura 1. Pontos de coleta de *T. pretiosum* distribuídos em oito estados brasileiros e inseridos em quatro biomas diferentes. Os círculos representam as divisões geográficas dos grupos.

Os índices de diversidade haplotípica (H_d), número de haplótipos (H) e diversidade nucleotídica (π) para as populações de *T. pretiosum* foram calculados utilizando o software DnaSP v6.12.01 (ROZAS et al., 2017). Estabeleceram-se as relações genealógicas entre as sequências de *T. pretiosum* construindo uma rede de haplótipos no software PopArt v1.7 (LEIGH & BRYANT, 2015), utilizando o método Median Joining.

Em seguida, foi realizada uma análise de variância molecular (AMOVA) para as populações em conjunto e para os grupos, através do software Arlequin v3.1 (EXCOFFIER et al., 2005), com 5.000 réplicas para os parâmetros de bootstrap e 5% de significância. Nas análises foram consideradas todas as localidades amostradas e também a divisão por grupos, que examinaram a variância entre as populações conforme os agrupamentos.

A fim de testar a expansão, retração ou equilíbrio populacional, foram realizados os testes de neutralidade D de Tajima (TAJIMA, 1989) e F_s de Fu (FU,

1997), utilizando simulação de coalescência e com 1.000 permutações e significância estatística considerada em um intervalo de 95% de confiabilidade e p-valor menor do que 0,02. Também foram realizadas as análises de distribuição mismatch usando um modelo de expansão espacial, a soma dos desvios quadrados (SSD), o índice Raggedness (R) e seu p-valor associado, todas através do programa Arlequin v.3.1 (EXCOFFIER et al., 2005).

Por fim, foi realizado o cálculo BSP [Bayesian Skyline Plot] (ROGERS; HARPENDING; 1992) a fim de reconstruir a demografia histórica da população. Como não houve estruturação nas etapas anteriores, todos os haplótipos foram utilizados como entrada. Dessa forma, a idade relativa estimada de divergência entre os haplótipos foi realizada com a concatenação dos genes mtDNA no software BEAST v.1.8. (DRUMMOND; RAMBAUT, 2007). O modelo de substituição previamente determinado pelo programa PARTITIONFINDER 1.1.1 foi HKY e a taxa de substituição foi estimada utilizando o tipo de relógio-molecular estrito e modelo evolutivo do tipo árvore de coalescência com tamanho médio populacional normal, e os demais parâmetros nos valores padrão do software e distribuição gama.

4. RESULTADOS

4.1 Identificação morfológica

Um total de sete espécies pré-identificadas foi utilizado para a obtenção do DNA barcoding. Devido ao processo de extração de DNA com exposição dos indivíduos a diferentes reagentes, houve uma desidratação e amolecimento do corpo dos insetos, o que dificultou a manipulação deles para a montagem das lâminas. Apesar disso, ainda foi possível examinar a genitália e realizar a identificação conforme Takahashi et al. (2021) para *T. foersteri* e Querino & Zucchi (2011) para as demais espécies.

Trichogramma atopovirilia: apresentou cápsula genital larga; volselas inchadas com forte constrição lateral; parâmeros arqueados; lâmina dorsal curta, larga e sem extensão posterior distinta; processos ventrais tubulares.

Trichogramma brunii: carena ventral longa, atingindo mais da metade da cápsula genital; cerdas flageliformes longas; processo intervalselar curto, não se estendendo até a base das volselas; lâmina dorsal com constrição basal distinta.

Trichogramma foersteri: cápsula genital mais longa do que larga; extensão posterior da lâmina dorsal longa e estreita com ápice não se estendendo além da volsela; cerdas flageliformes curtas, afinando para o ápice.

Trichogramma galloi: cerdas flageliformes que se afinam no ápice; lâmina dorsal com estreita extensão posterior; processo intervalselar longo, quase alcançando o mesmo nível do ápice da volsela; carena ventral curta, estendendo até o meio da cápsula genital.

Trichogramma pretiosum: cerdas flageliformes alongadas e espessura uniforme; lâmina dorsal alcançando o ápice volselar; processo intervalselar longo e pontiagudo, não atingindo o ápice das volselas; processos ventrais próximos à base do processo intervalselar.

Trichogramma rojasi: carena ventral curta, estendendo-se quase até o meio da cápsula genital; processos ventrais próximos da base do processo intervalselar; asas posteriores possuindo de 12 a 15 cerdas em fileira, alcançando até o ápice da asa.

A sequência referente à espécie *T. manicobai* foi obtida através de um indivíduo fêmea associada, portanto, não foi possível descrever as características morfológicas do macho.

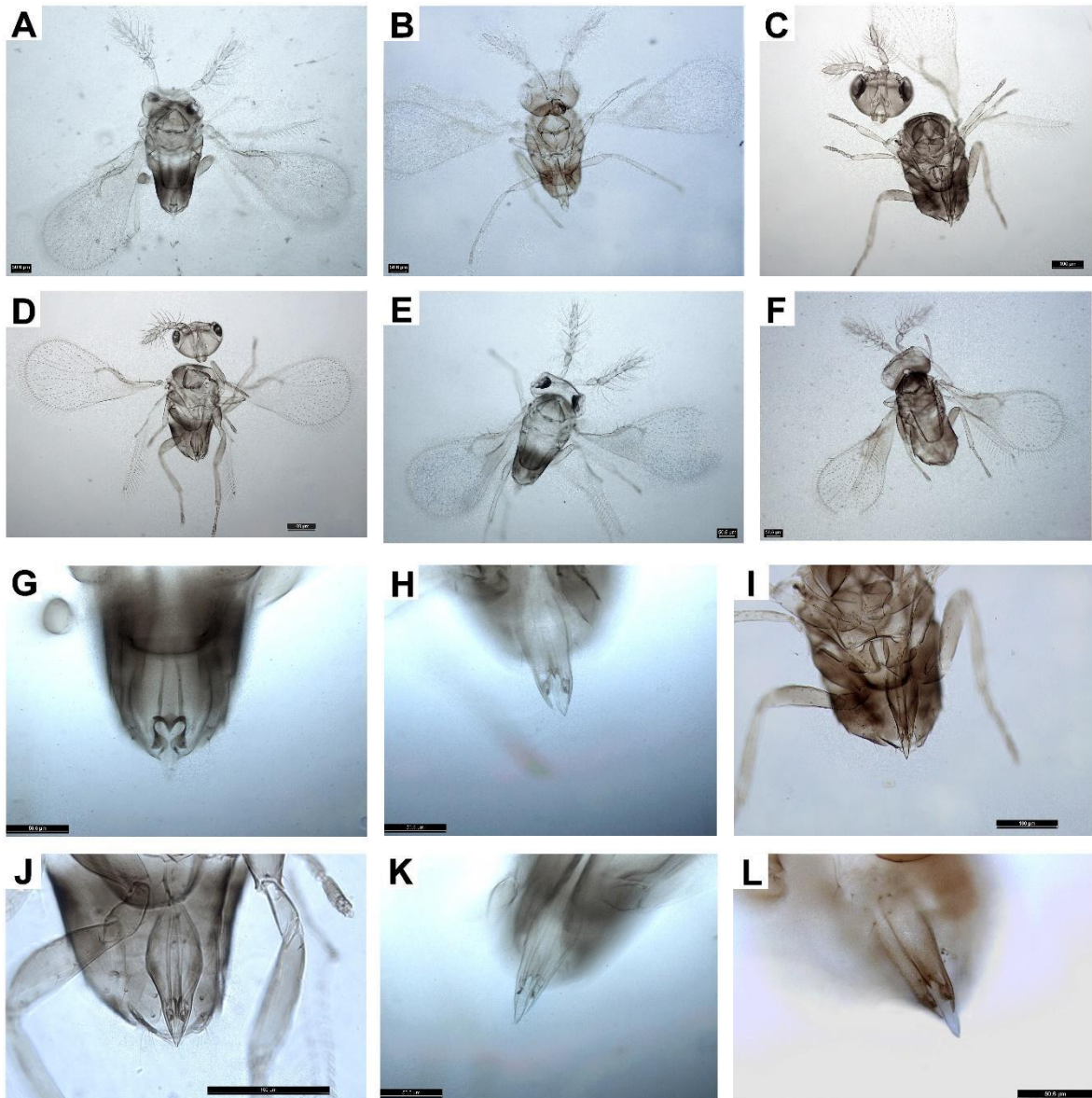


Figura 2. Figura representativa das genitálias analisadas, pertencentes a machos de *Trichogramma* spp. **A-F:** vista ventral do inseto (**A:** *T. atopovirilia*; **B:** *T. bruni*; **C:** *T. foersteri*; **D:** *T. galloi*; **E:** *T. pretiosum*; **F:** *T. rojasi*). **G-L:** Vista ventral da genitália (**G:** *T. atopovirilia*; **H:** *T. bruni*; **I:** *T. foersteri*; **J:** *T. galloi*; **K:** *T. pretiosum*; **L:** *T. rojasi*) [em bálsamo-do-Canadá].

4.2 DNA Barcoding e filogenia

Foram produzidos barcodings para 7 espécies de *Trichogramma*: *T. foersteri*, *T. galloi*, *T. pretiosum*, *T. atopovirilia*, *T. bruni*, *T. manicobai* e *T. rojasi*, sendo os 4 últimos inéditos para essas espécies, o que gerou um total de 76 barcodings. A identificação morfológica foi confirmada para essas espécies e as sequências finais foram padronizadas em 556 pb. A partir da análise filogenética bayesiana foi visto

que o marcador utilizado demonstrou ser uma ferramenta eficiente para a identificação molecular das espécies de *Trichogramma* com distância genética interespecífica maior que 7% (Tabela 3) e ramos monofiléticos entre as espécies (Figura 3).

Tabela 3. Média da distância genética entre as espécies de *Trichogramma* calculadas a partir do alinhamento de um fragmento do gene *citocromo c oxidase subunidade I* (COI) e seu desvio padrão.

	<i>T. atopovirilia</i>	<i>T. bruni</i>	<i>T. foersteri</i>	<i>T. galloi</i>	<i>T. manicobai</i>	<i>T. pretiosum</i>
<i>T. atopovirilia</i>						
<i>T. bruni</i>	0,067 (0,0018)					
<i>T. foersteri</i>	0,066 (0,0013)	0,002 (0,0021)				
<i>T. galloi</i>	0,073 (0,000)	0,091 (0,0024)	0,078 (0,0000)			
<i>T. manicobai</i>	0,058 (0,0016)	0,078 (0,0035)	0,078 (0,0000)	0,092 (0,0000)		
<i>T. pretiosum</i>	0,056 (0,0024)	0,07 (0,0037)	0,071 (0,0022)	0,09 (0,0019)	0,054 (0,0017)	
<i>T. rojasi</i>	0,067 (0,0014)	0,082 (0,0014)	0,081 (0,0000)	0,081 (0,0000)	0,057 (0,0000)	0,068 (0,0019)

Apesar da dificuldade geral na identificação morfológica das espécies *T. galloi* e *T. pretiosum*, esses resultados confirmam que não são espécies próximas filogeneticamente, com distância média de 9% e ramos distintos na árvore. A análise filogenética também revelou que as espécies *T. bruni* e *T. foersteri* não apresentam diferença quando se trata desse fragmento de gene, com distância nula, então são reunidos no mesmo grupo na árvore.

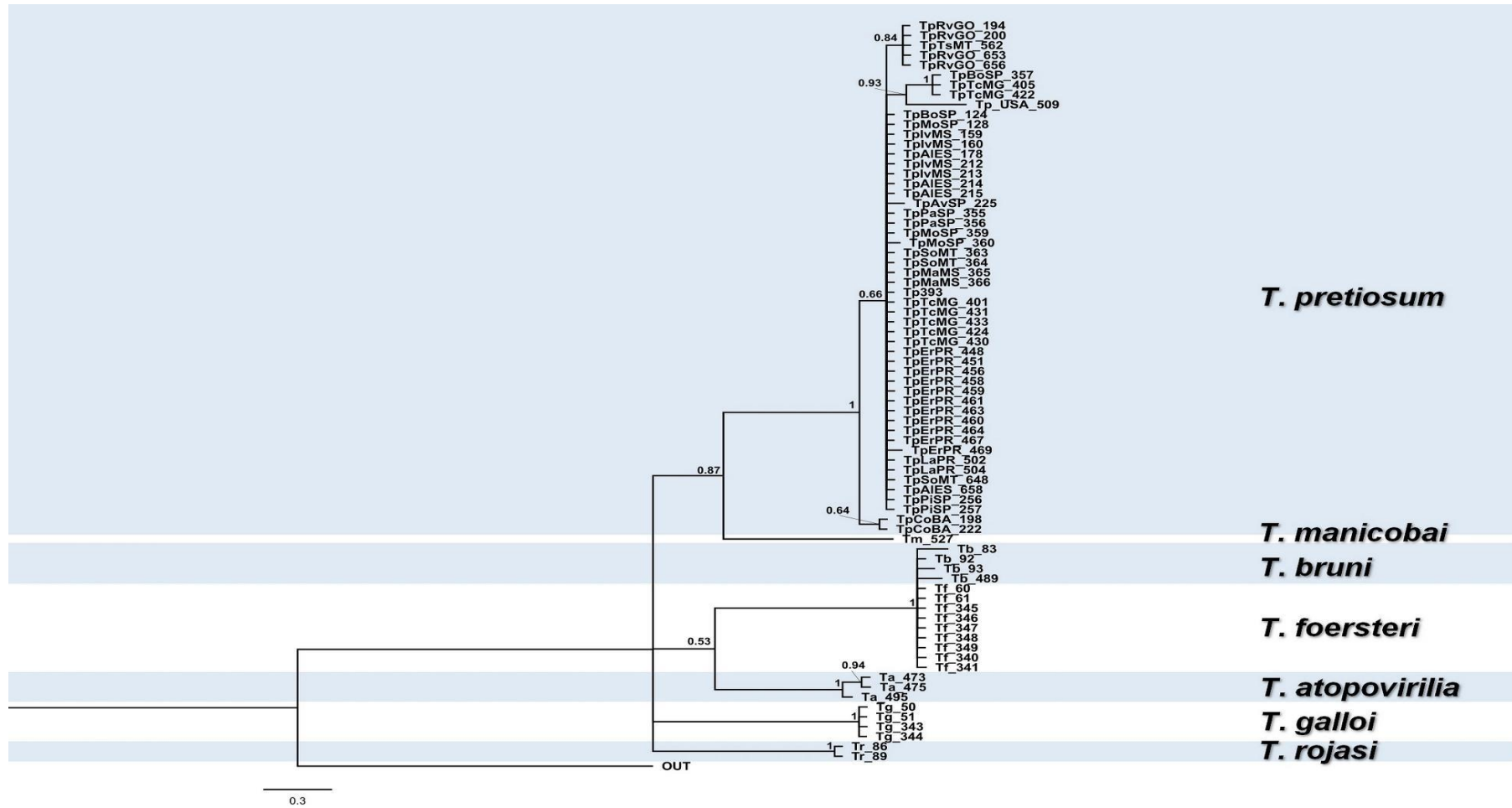


Figura 3. Árvore filogenética das espécies de *Trichogramma* com probabilidades posteriori para cada nó/ramo baseada em um fragmento do gene *citocromo c oxidase subunidade I* (COI).

4.3. Marcador espécie-específico para *T. galloi* e *T. pretiosum*

O marcador utilizado demonstrou-se eficiente para a identificação de *T. galloi* e diferenciação com *T. pretiosum* em extrações individualizadas dos insetos. A enzima BtsIMutI gerou um padrão de bandas onde é possível observar que *T. galloi* é separado em dois fragmentos menores (223 e 121 pb), enquanto *T. pretiosum* permanece com o único fragmento de 344 pb. Esse método é eficaz para uma identificação precisa sem a necessidade de sequenciar o DNA do inseto. Para a detecção de contaminação em criações massais, é necessário que seja feito um pool de insetos, de forma que seja extraído o DNA de mais de um indivíduo numa mesma amostra, para que seja possível confirmar as espécies com os padrões de bandas que surgirão. Entretanto, não houve eficiência do marcador em digerir totalmente o fragmento de 344 pb presente em *T. galloi*, que seria a forma de detectar a presença de *T. pretiosum* na amostra. É possível observar no gel de agarose (Figura 4) os 3 fragmentos presentes em *T. galloi* e o único fragmento em *T. pretiosum*.

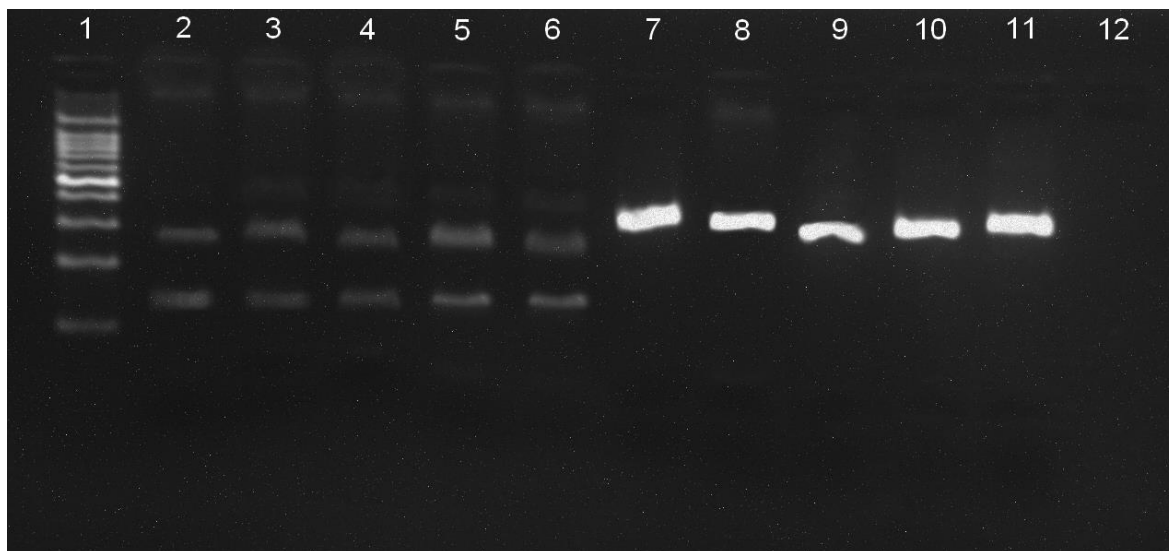


Figura 4. Gel de agarose 3% mostrando fragmentos do gene COI amplificados através de reação de PCR com primers espécie-específicos. Lane 1 corresponde ao marcador molecular de DNA Ladder; lane 2-6: *T. galloi*; lanes 7-11: *T. pretiosum*; lane 12: controle negativo (H₂O).

4.4. Filogeografia de *T. pretiosum*

Foram sequenciados 51 indivíduos de *T. pretiosum* para o gene COI, obtendo-se um fragmento de 556 pb. As diversidades haplotípica (Hd) e nucleotídica (π) encontradas foram baixas, sendo ligeiramente maiores no Grupo 1 (Tabela 4). O número total de sítios polimórficos foi 9 e para o Grupo 1, Grupo 2 e Grupo 3 foi 4, 1 e 5, respectivamente.

Tabela 4. Índices de diversidade, número de haplótipos, número de sítios polimórficos e suas distribuições para *T. pretiosum* no Brasil calculados a partir de um fragmento do mtDNA *citocromo c oxidase subunidade I* (COI).

Local, Estado	Grupo	N	H	Haplótipos (n)	Hd	π	S
Rio Verde, GO	Grupo 1	4	1	H6(4)	0	0	0
Sorriso, MT	Grupo 1	3	1	H1(3)	0	0	0
Tangará da Serra, MT	Grupo 1	1	1	H6(1)	-	-	-
Cocos, BA	Grupo 1	2	1	H7(2)	0	0	0
<i>Grupo 1</i>		10	3	H1(3); H6(5); H7(2)	0,689	0,0029	4
Entre Rios Oeste, PR	Grupo 2	11	2	H1(10); H2(1)	0,182	0,0003	1
Ivinhema, MS	Grupo 2	4	1	H1(4)	0	0	0
Maracaju, MS	Grupo 2	2	1	H1(2)	0	0	0
<i>Grupo 2</i>		17	2	H1(16); H2(1)	0,118	0,0002	1
Lapa, PR	Grupo 3	2	1	H1(2)	0	0	0
Pinhais, PR	Grupo 3	1	1	H1(1)	-	-	-
Botucatu, SP	Grupo 3	2	2	H1(1); H3(1)	1	0,0072	4
Mogi Mirim, SP	Grupo 3	3	2	H1(2); H5(1)	0,667	0,0012	1
Avaré, SP	Grupo 3	1	1	H4(1)	-	-	-
Pardinho, SP	Grupo 3	2	1	H1(2)	0	0	0
Piracicaba, SP	Grupo 3	2	1	H1(2)	0	0	0
Três Corações, MG	Grupo 3	7	2	H1(5); H3(2)	0,476	0,0034	4
Alegre, ES	Grupo 3	4	1	H1(4)	0	0	0
<i>Grupo 3</i>		24	4	H1(19); H3(3); H4(1); H5(1)	0,37	0,002	5
Brasil	-	51	7	-	0,438	0,0018	9

A análise da rede de haplótipos gerou um total de 7 haplótipos (H), sendo o Haplótipo 1 o mais frequente, presente em 74,51% dos indivíduos e nos 3 agrupamentos, porém com maior incidência nas regiões ao sul do Brasil (Figura 5). Também resultou na presença de um haplótipo exclusivo para o Estado da Bahia, inserido na Caatinga (H7), um haplótipo (H2) ocorrendo unicamente nos indivíduos do Grupo 2, onde encontram-se nos biomas Cerrado e Mata Atlântica e, por fim, dois haplótipos foram exclusivos para o Grupo 1 (H6 e H7).

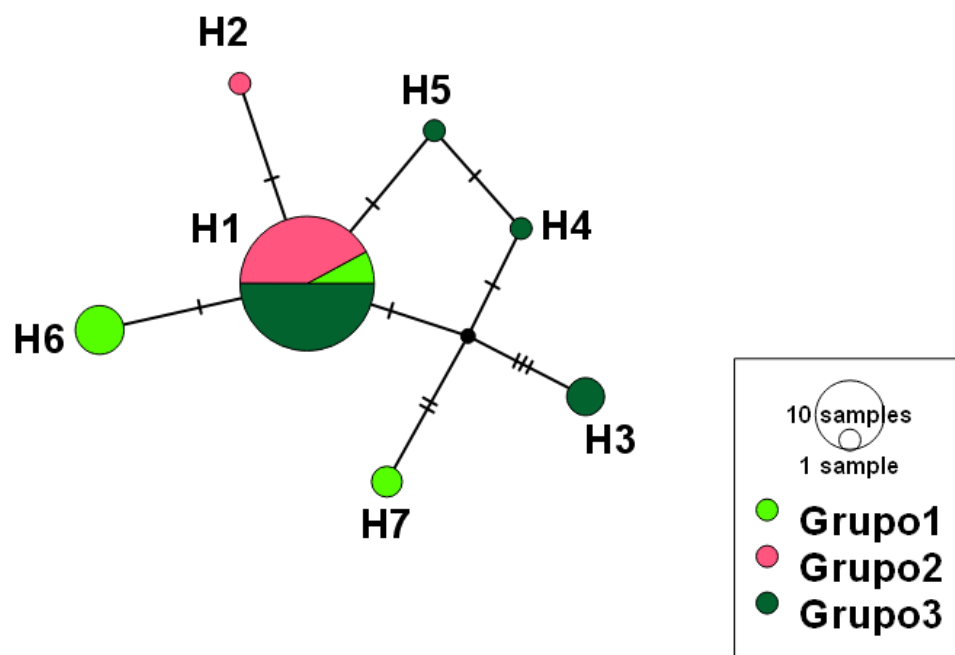


Figura 5. Rede de haplótipos de 51 indivíduos de *T. pretiosum* baseada em um fragmento de 556 pb do gene mitocondrial *citocromo c oxidase subunidade I* (COI). As cores indicam a distribuição dos haplótipos por agrupamento.

A análise de variância molecular (AMOVA) dos haplótipos encontrados para *T. pretiosum* considerando todas as populações revelou alta variação e estrutura entre as populações ($\Phi_{ST} = 49,12\%$), e maior variação dentro dos pontos de coleta (50,88%). Quando a AMOVA foi dividida em três níveis hierárquicos (Grupo 1, Grupo 2 e Grupo 3), a variação entre grupos diminuiu para 4,9% e a variação dentro dos

grupos permaneceu alta (50,13%), demonstrando que a estruturação não é gerida pela distância geográfica dos locais amostrados (Tabela 5).

Tabela 5. Análise da variância molecular (AMOVA) para a estruturação genética das populações de *T. pretiosum* utilizando o marcador mitocondrial *citocromo c oxidase subunidade I* (COI).

	Fonte de variação	GL	Soma dos quadrados	Componentes da variância	Variância (%)	Índice de fixação Φ (p-valor)
Locais de coleta	Entre as populações	15	15,73	0,25627 Va	49,12	$\Phi_{ST} = 0,49$ (0,001)
	Dentro das populações	35	9,29	0,26543 Vb	50,88	
	Total	50	25,02	0,5217		
Grupos	Entre grupos	2	3,737	0,02593 Va	4,9	$\Phi_{CT} = 0,05$ (0,138)
	Entre populações dentro dos grupos	13	11,993	0,23813 Vb	44,97	$\Phi_{SC} = 0,47$ (0,002)
	Dentro das populações	35	9,29	0,26543 Vc	50,13	$\Phi_{ST} = 0,50$ (0,001)
	Total	50	25,02	0,52948		

Os testes de Neutralidade de D de Tajima e Fs de Fu indicam que as populações de *T. pretiosum*, de modo geral, não estão em expansão ou retração populacional, com valores negativos, mas não significativos (Tabela 6). Os polimorfismos encontrados são congruentes com o modelo de neutralidade proposto por Tajima (1989). Quando as populações são divididas em agrupamentos, o mesmo ocorre, e apesar de revelar índices com valores negativos de Fs de Fu positivo para o Grupo 1, não foram significativos ao nível de significância estabelecido (<0,02).

Os índices de distribuição mismatch SSD e Raggdness, que testam como hipótese nula a expansão demográfica e espacial, respectivamente, não foram significativos ($p < 0,05$) (Tabela 6). Isso rejeita a hipótese de neutralidade e sugerem expansão populacional e espacial das populações de *T. pretiosum* (Tabela 6).

Tabela 6. Distribuição espacial de mismatch para indivíduos de *T. pretiosum* por agrupamento. Índices demográficos D de Tajima e Fs de Fu, índices de expansão espacial SSD e Raggdness (R).

Agrupamento	D de Tajima (p-valor)	Fs de Fu (p-valor)	SSD (p-valor)	R (p-valor)
Grupo 1	0,565 (0,736)	1,484 (0,799)	0,058 (0,113)	0,186 (0,425)
Grupo 2	-1,163 (0,141)	-0,748 (0,096)	0,008 (0,374)	0,598 (0,719)
Grupo 3	-0,443 (0,358)	0,488 (0,622)	0,293 (0,444)	0,406 (0,718)
Brazil	-1,393 (0,069)	-1,952 (0,123)	0,006 (0,624)	0,163 (0,769)

Através da análise de Bayesian Skyline Plot foi confirmado que as populações da espécie *T. pretiosum* se mantiveram estáveis ao longo de sua história evolutiva, confirmando os resultados dos testes de expansão populacional. Entre os últimos 10-20 anos, nota-se o início do que possa ser uma expansão populacional para este grupo (Figura 6).

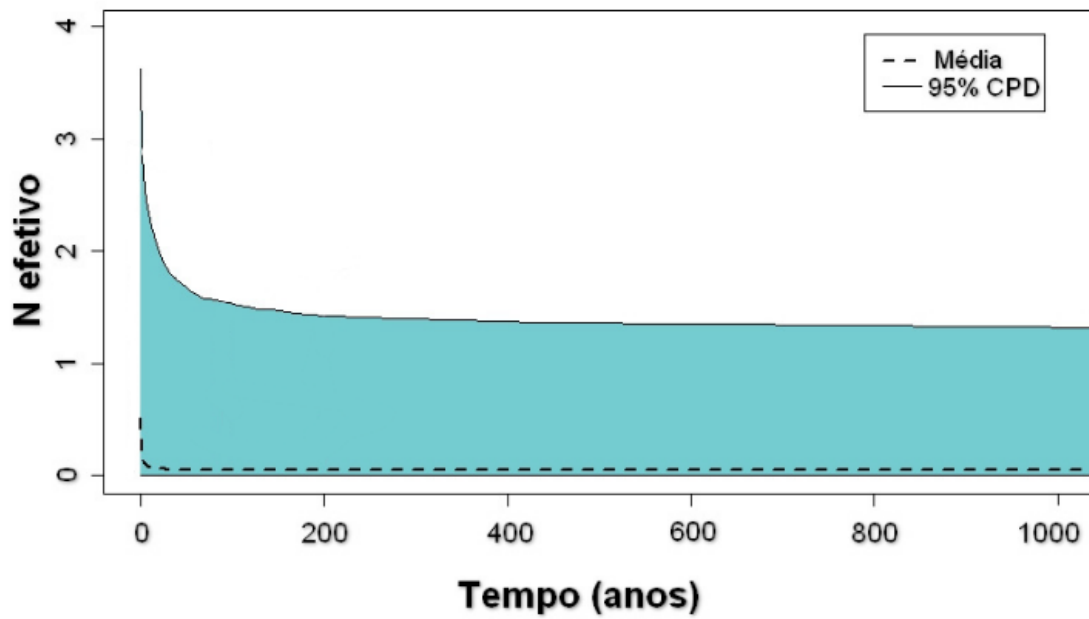


Figura 6. Expansão populacional de *T. pretiosum* no Brasil gerada utilizando a análise de BSP (Bayesian Skyline Plot) no software BEAST v.1.8.4.

5. DISCUSSÃO

Aqui nós produzimos com sucesso DNA barcodings para sete espécies de *Trichogramma* associados a lepidópteros-praga no Brasil. A alta taxa de mutações presentes no gene mitocondrial *citocromo c oxidase subunidade I* (COI), fez com que esse marcador fosse sugerido universalmente como DNA barcoding para as espécies de animais (HEBERT et al., 2003; SUJEEVAN; HEBERT, 2007). O número de estudos envolvendo DNA Barcoding para diferentes espécies vem crescendo exponencialmente nas últimas décadas, colaborando para resolução de problemáticas taxonômicas, descoberta de espécies crípticas, na identificação de insetos imaturos e até mesmo quando a amostragem inclui apenas partes do corpo de um inseto (ARAUJO et al., 2023; CHO et al., 2013; DESALLE; GOLDSTEIN, 2019; HAUSMANN et al., 2020; JALALI et al., 2015; KRUPITSKY et al., 2023; LI et al., 2020; SONG et al., 2018, 2023). Além disso, a produção de DNA barcoding é primordial para aplicação de técnicas de ampla identificação de espécies como metabarcoding, que hoje são utilizadas para o entendimento da diversidade ecológica de espécies e as interações entre as mesmas nas comunidades (CLARKE et al., 2014; DOPHEIDE et al., 2019; EVANS; KITSON, 2020; KRESS et al., 2015; VALENTINI et al., 2019).

O erro na identificação de espécies de inimigos naturais, principalmente parasitoides de ovos, utilizadas no controle de pragas pode acarretar na liberação de espécies/linhagens que não serão efetivas em campo, causando desequilíbrio no agroecossistema e um possível surto populacional da praga-alvo. Apesar da ampla utilização dos parasitoides do gênero *Trichogramma* em programas de manejo, ainda faltam informações de DNA barcoding e de linhagens genéticas acerca de diversas espécies, o que poderia contribuir para a correta identificação das espécies e linhagens mais efetivas para o controle biológico da espécie-praga alvo. Neste trabalho foram desenvolvidos DNA barcoding inéditos para as espécies *T. atopovirilia*, *T. bruni*, *T. manicobai* e *T. rojasi*, contribuindo para a identificação desses táxons.

A lacuna existente nos DNA barcoding para o gênero *Trichogramma* pode ser justificado pelo fato de que a produção desse tipo de informação é laboriosa e muitas vezes não é bem-sucedida. Alguns fatores específicos que corroboram isso são: baixa quantidade de DNA que é gerada pela extração não destrutiva de um único indivíduo (de modo que possa ser feita a associação à morfologia e tenha

robustez nas sequências obtidas) devido ao tamanho diminuto dos insetos; e consequentemente a dificuldade na amplificação do fragmento do gene alvo para o DNA barcoding com os primers universais recomendados para insetos, como LCO1490/HCO2198 e LEP-F/LEP-R (FOLMER et al., 1994; HEBERT et al., 2004). Desta forma, fragmentos de genes alternativos como ITS1, ITS2, 28S, 18S são propostos e utilizados para identificação molecular de espécies de *Trichogramma*. No entanto, apesar de algum sucesso na identificação molecular das espécies, esses genes não podem ser considerados DNA barcoding devido a não serem universalmente utilizados para todas as espécies de animais e quebram o princípio básico da preposição do DNA barcoding, que é a universalidade da técnica para qualquer espécie de organismo.

A distância média interespecífica (*barcoding gap*) tratando-se do COI foi maior que 7% entre a maioria das espécies de *Trichogramma*, confirmando a utilidade do DNA barcoding para a identificação molecular das espécies. No entanto, surpreendentemente, o DNA barcoding não é eficiente na separação das espécies *T. bruni* e *T. foersteri*, apesar da acentuada diferença morfológica, o que demanda o teste com outros genes adicionais para a separação dessas espécies.

A falta de “barcoding gap” para essas duas espécies pode ser explicada por hipóteses que sugerem: recente especiação entre essas espécies, eventos de hibridação ou transferência horizontal de genes (CORRÊA et al., 2019; LANDAIS et al., 2000; NAKABACHI, 2015). De qualquer forma, esse não é o primeiro exemplo de separação de espécies onde o DNA barcoding não obteve sucesso (ELIAS et al., 2007; MCFADDEN et al., 2011; MEIER et al., 2006; MEYER; PAULAY, 2005; WIEMERS; FIEDLER, 2007).

Uma outra vantagem da ampla variação presente no gene COI é servir de base para o desenho de marcadores moleculares para rápida identificação de espécies sem a necessidade de sequenciamento de DNA, seja pela utilização de PCR multiplex com primers específicos ou pela técnica de PCR-RFLP (CORRÊA et al., 2013; NANINI et al., 2022). Dessa forma, foi possível utilizar sequências desse fragmento para produzir um marcador molecular PCR-RFLP que pudesse facilitar a identificação das espécies de importância econômica, *T. pretiosum* e *T. galloi*. Esse marcador pode ser útil para a avaliação rápida de eventos de mistura entre as espécies em condições de laboratório garantindo o sucesso em programas de controle biológico. Um exemplo, é o controle biológico aplicado da *Diatraea*

saccharalis (Fabricius) (Lepidoptera: Crambidae) em áreas de cana-de-açúcar onde a espécie mais eficiente como parasitoide de ovos é a *T. galloi*. No entanto, é comum os relatos de contaminação e até mesmo substituição de populações de laboratório de *T. galloi* por *T. pretiosum*, espécie que não é um eficiente parasitoide de ovos de *D. saccharalis*, e quando liberada (por engano) acarreta insucesso em programas de controle aplicado para a praga.

A espécie *T. pretiosum* é a espécie mais comum parasitando ovos de lepidópteros-praga e aquela mais amplamente distribuída no território brasileiro. No entanto, pouco é conhecido sobre a presença de linhagens genéticas bem como a história demográfica dessa espécie no Brasil. Aplicando essa abordagem para *T. pretiosum*, nós inicialmente encontramos uma baixa diversidade haplotípica entre as populações de *T. pretiosum* analisadas, apesar da variedade de hospedeiros (*A. gemmatalis*, *A. infecta*, *C. includens*, *E. ello*, *H. zea*, *S. cosmioides* e *S. frugiperda*), cultivos (soja, milho, abacate Hass, mandioca, brássicas, banana, tomate) e locais que os indivíduos dessa espécie foram coletados. Os índices de diversidade encontrados foram semelhantes independente da região, agrupamento, ou total, da população. Essa baixa diversidade genética entre os locais amostrados de *T. pretiosum*, provavelmente, está associada aos sistemas de reprodução que são encontrados nessa espécie: partenogênese arrenótoca e telítoca, que podem ocasionar em homozigose nas populações ao longo do tempo (PRATISSOLI et al., 2014; RUSSELL; STOUTHAMER, 2011).

Os índices estimados pela AMOVA confirmaram alta estruturação genética ($\Phi_{ST} = 0,49$; 0,001) entre as populações de *T. pretiosum* avaliadas, apesar da baixa diversidade genética. Isso demonstra a baixa capacidade de movimentação dos insetos e fluxo gênico entre as áreas amostradas. No entanto, quando testamos a estruturação genética considerando a distância geográfica e as condições edafoclimáticas entre os pontos de coleta, o Φ_{CT} foi baixo e não significativo ($\Phi_{CT} = 0,05$; $p = 0,138$), rejeitando a hipótese de que as populações estavam estruturadas pela distância geográfica. A principal hipótese que explica essa falta de estrutura mediada principalmente pela distância geográfica entre os locais amostrados é a movimentação e liberação de linhagens de *T. pretiosum* pelo homem com intuito de aplicar o controle biológico de pragas em diferentes locais e cultivos.

Os índices de neutralidade apontam resultados contrastantes sobre a história demográfica de *T. pretiosum* no Brasil. Os índices de neutralidade D de Tajima e F_s

de Fu apresentaram resultados apontando para a expansão demográfica, mas não foram significativos. Já as análises de “mismatch distribuição” confirmaram significativamente a expansão demográfica e espacial. As análises têm proposta estatística diferente. Enquanto os testes de neutralidade F_s de Fu e D de Tajima geralmente são baseados na distribuição de diferenças de pares entre sequências dentro de populações, os testes de “mismatch distribution” mostram o padrão de diferenças nucleotídicas entre pares de indivíduos em uma amostra. Isso pode justificar a não significância da expansão demográfica pelos testes de neutralidade.

Uma terceira análise demográfica, bastante robusta, apresentada é o Skyline Plot (BSP), baseada em estatística Bayesiana e relógio molecular, é amplamente usada para reconstruir tamanhos populacionais históricos com informações contidas em genealogias de haplótipos. A BSP apontou uma ampla expansão demográfica nas últimas duas décadas de *T. pretiosum*. A partir dos anos 2000, essa espécie, que foi introduzida no Brasil, passou a ser criada em condições de laboratório e liberada para o controle de pragas da soja e outros cultivos.

Assim, a expansão demográfica pode ter grande influência da ação antrópica via criação artificial desses insetos e liberação em áreas agrícolas. Somado a isso, o aumento exponencial das áreas agrícolas nas últimas décadas, proporcionou um aumento exponencial também na abundância de hospedeiros, principalmente da ordem Lepidoptera, disponíveis para a espécie (HORIKOSHI et al., 2021; SILVA et al., 2020). Portanto, pode-se pensar nesses fatos como propulsores da expansão demográfica de *T. pretiosum*, visto que, a partir disso, houve um aumento na variedade de hospedeiros disponíveis, com a chegada de outros lepidópteros-praga.

Da mesma forma, a detecção de uma expansão espacial de *T. pretiosum* é justificada pela associação e expansão das áreas agrícolas no Brasil. Com a expansão da soja para diferentes áreas no Brasil, é possível supor que a distribuição espacial de *T. pretiosum* acompanha o crescimento da produção de soja. O sucesso de programas de controle biológico com liberações de *Trichogramma* depende da capacidade de dispersão desse parasitoide, pois necessita realizar a busca por hospedeiros (SMITH, 1996). Quando *T. pretiosum* é liberado para controle de pragas da ordem Lepidoptera em soja, a folhagem é menor (estágios iniciais do crescimento vegetativo) e o parasitoide não precisa superar muitos obstáculos para alcançar os ovos do hospedeiro (BUENO et al., 2011). Outro fator contribuinte para a dispersão é o seu tamanho diminuto, pois os *Trichogramma* provavelmente têm baixa

velocidade de voo e, quando o vento sopra em alta velocidade, possuem pouco controle sobre a direção do voo (FOURNIER; BOIVIN, 2000).

Parâmetros demográficos são os melhores indicadores de aptidão de uma população e são critérios adequados para comparar estados fisiológicos de diferentes espécies, populações ou linhagens. Para alcançar uma criação laboratorial bem-sucedida de *T. pretiosum* é necessário estudar os efeitos de diferentes fatores ecológicos em parâmetros biológicos de populações locais. Além disso, a grande expansão populacional e espacial de *T. pretiosum* nas últimas duas décadas pode influenciar de maneira positiva na adaptação de populações desse parasitoide em áreas agrícolas favorecendo o controle biológico conservativo.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Nós produzimos com sucesso o DNA barcoding de sete espécies de *Trichogramma* associados a lepidópteros-praga no Brasil. Esses marcadores são úteis para identificação de cinco dessas espécies. No entanto, as espécies *T. bruni* e *T. foersteri* não apresentaram distância genética suficiente para separação de ambas as espécies via DNA barcoding, sendo necessário à exploração de outros marcadores para obter informações de identificação molecular e solucionar a dúvida de o porquê a ineficiência de COI para identificação.

A variação encontrada entre as sequências de COI de *T. galloi* e *T. pretiosum*, possibilitou o desenvolvimento de um marcador PCR-RFLP inédito para separação rápida e barata das espécies via marcador molecular. Esse marcador tem potencial de aplicação direta em programas de controle biológico, principalmente da broca-da-cana-de-açúcar, evitando confusões sobre a espécie que está sendo liberada para o controle da praga.

O estudo filogeográfico apontou uma baixa diversidade genética de *T. pretiosum*. No entanto, as populações estão estruturadas na paisagem, mas sem seguir um padrão de distribuição espacial. Além disso, as análises apontaram para uma recente expansão demográfica e espacial da espécie. Todos os resultados obtidos, apontam para uma grande influência antrópica na demografia de *T. pretiosum*, seja pela sua introdução e liberação de insetos por programas de controle biológico no Brasil e pela expansão de cultivos agrícolas e consequentemente disponibilidade de hospedeiros.

REFERÊNCIAS

- ARAÚJO, A. S.; ZUCCHI, R. A.; NORRBOM, A. L.; NANINI, F.; CORRÊA, A. S.; ALVARENGA, C. D.; SOUZA-FILHO, M. F.; NAVA, D. E.; SAVARIS, M. Integrative approach reveals the identity of Brazilian specimens previously recognized as *Anastrepha dissimilis* Stone, 1942 (Diptera: Tephritidae). **Zootaxa**, v. 5228, n. 3, p. 317-336, 2023.
- AVISE, J. C.; ARNOLD, J.; BALL, R. M.; BERMINGHAM, E.; LAMB, T.; NEIGEL, J. E.; SAUNDERS, N. C. Intraspecific phylogeography: the mitochondrial DNA bridge between population genetics and systematics. **Annual review of ecology and systematics**, v. 18, n. 1, p. 489-522, 1987.
- AVISE, J. C. Phylogeography: the history and formation of species. **Harvard university press**, 2000.
- BEHERE, G. T.; TAY, W. T.; RUSSELL, D. A.; BATTERHAM, P. Molecular markers to discriminate among four pest species of *Helicoverpa* (Lepidoptera: Noctuidae). **Bulletin of entomological research**, v. 98, n. 6, p. 599-603, 2008.
- BERTIN, A.; PAVINATO, V. A. C.; PARRA, José Roberto Postali. Effects of intraspecific hybridization on the fitness of the egg parasitoid *Trichogramma galloi*. **Biocontrol**, v. 63, p. 555-563, 2018.
- BOMMARCO, R.; KLEIJN, D.; POTTS, S. G. Ecological intensification: harnessing ecosystem services for food security. **Trends in ecology & evolution**, v. 28, n. 4, p. 230-238, 2013.
- BORBA, R. S.; GARCIA, M. S.; KOVALESKI, A.; OLIVEIRA, A. C.; ZIMMER, P. D.; CASTELO BRANCO, J. S.; MALONE, G. Dissimilaridade genética de linhagens de *Trichogramma* Westwood (Hymenoptera: Trichogrammatidae) através de marcadores moleculares ISSR. **Neotropical Entomology**, v. 34, n. 4, p. 565-569, 2005.
- BROWN, W. M.; GEORGE JR, M.; WILSON, A. C. Rapid evolution of animal mitochondrial DNA. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 76, n. 4, p. 1967-1971, 1979.
- BUENO, R. C. O. F.; PARRA, J. R. P.; DE FREITAS BUENO, A. *Trichogramma pretiosum* parasitism and dispersal capacity: a basis for developing biological control programs for soybean caterpillars. **Bulletin of Entomological Research**, v. 102, n. 1, p. 1-8, 2011.
- BUENO, A. D. F.; PANIZZI, A. R.; HUNT, T. E.; DOURADO, P. M.; PITTA, R. M.; GONÇALVES, J. Challenges for adoption of integrated pest management (IPM): the soybean example. **Neotropical Entomology**, v. 50, p. 5-20, 2021.
- CASSIOLATO, V. G.; MARTO, F. N. D. S.; AMARAL, L.; GROOT, C. C.; BISTON, L. S. S.; RODRIGUES, B. G.; ANDREOTE, F. D. Uma visão panorâmica do controle biológico na agricultura moderna. Piracicaba: ESALQ - **Divisão de Biblioteca - DIBD**, 87 p. 2022.
- CHERIF, A.; MANSOUR, R.; GRISSA-LEBDI, K. The egg parasitoids *Trichogramma*: from laboratory mass rearing to biological control of lepidopteran pests. **Biocontrol Science and Technology**, v. 31, n. 7, p. 661-693, 2021.

- CHISHOLM, P. J.; GARDINER, M. M.; MOON, E. G.; CROWDER, D. W. Tools and techniques for investigating impacts of habitat complexity on biological control. **Biological Control**, v. 75, p. 48-57, 2014.
- CHO, S. Y.; SUH, K. I.; BAE, Y. J. DNA barcode library and its efficacy for identifying food-associated insect pests in Korea. **Entomological Research**, v. 43, n. 5, p. 253-261, 2013.
- CIOCIOLA, A. I.; ZUCCHI, R. A.; STOUTHAMER, R. Molecular key to seven brazilian species of *Trichogramma* (Hymenoptera: Trichogrammatidae) using sequences of the ITS2 region and restriction analysis. **Neotropical Entomology**, v. 30, n. 2, p. 259-262, 2001.
- CLARKE, L. J.; SOUBRIER, J.; WEYRICH, L. S.; COOPER, A. Environmental metabarcodes for insects: in silico PCR reveals potential for taxonomic bias. **Molecular ecology resources**, v. 14, n. 6, p. 1160-1170, 2014.
- COLMENAREZ, C. Y.; CORNIANI, N.; MUNDSTOCK, S.; SAMPAIO, M.; VÁSQUEZ, C. Use of Parasitoids as a Biocontrol Agent in the Neotropical Region: Challenges and Potential. In: Horticulture Crops. **IntechOpen**, p. 171-194, 2018.
- COELHO Jr, A.; PARRA, J. R. P. Effect of Carbon dioxide (CO₂) on mortality and reproduction of *Anagasta kuehniella* (Zeller 1879), in mass rearing, aiming at the production of *Trichogramma* spp. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 85, n. 2, p. 823-831, 2013.
- COELHO JR, A.; STOUTHAMER, R.; PARRA, J. R. P. Flight propensity of isofemale lines of *Trichogramma pretiosum* Riley in two relative humidity levels. **Florida Entomologist**, p. 364-368, 2018.
- CÔNSOLI, F. L.; BOTELHO, P. S. M.; PARRA, J. R. Pi. Selectivity of insecticides to the egg parasitoid *Trichogramma galloi* Zucchi, 1988, (Hym., Trichogrammatidae). **Journal of Applied Entomology**, v. 125, n. 1-2, p. 37-43, 2001.
- CÔNSOLI, F. L.; PARRA, J. R. P.; ZUCCHI, R. A. (Ed.). Egg parasitoids in agroecosystems with emphasis on *Trichogramma*. **Springer Science & Business Media**, 2010.
- CORRÊA, A. S.; OLIVEIRA, L. O.; BRAGA, L. S.; GUEDES, R. N. C. Distribution of the related weevil species *Sitophilus oryzae* and *S. zeamais* in Brazil. **Insect Science**, v. 20, n. 6, p. 763-770, 2013.
- CORRÊA, A. S.; VINSON, C. C.; BRAGA, L. S.; GUEDES R. N. C.; DE OLIVEIRA, L. O. Ancient origin and recent range expansion of the maize weevil *Sitophilus zeamais*, and its genealogical relationship to the rice weevil *S. oryzae*. **Bulletin of Entomological Research**, v. 107, n. 1, p. 9-20, 2017.
- CORRÊA, A. S.; CORDEIRO, E. M. G.; OMOTO, C. Agricultural insect hybridization and implications for pest management. **Pest management science**, v. 75, n. 11, p. 2857-2864, 2019.
- CULLINEY, T. W. Crop losses to arthropods. **Integrated Pest Management: Pesticide Problems**, Vol. 3, p. 201-225, 2014.

- DANG, X. L.; WEN, S. Y.; HE, X. F.; PANG, X. F. M-PCR: a powerful method for rapid molecular identification of *Trichogramma* wasps (Hymenoptera: Trichogrammatidae). **Insect Science**, v. 12, n. 2, p. 77-85, 2005.
- DESALLE, R.; GOLDSTEIN, P. Review and interpretation of trends in DNA barcoding. **Frontiers in Ecology and Evolution**, v. 7, p. 302, 2019.
- DOPHEIDE, A.; TOOMAN, L. K.; GROSSER, S.; AGABITI, B.; RHODE, B.; XIE, D.; NEWCOMB, R. D. Estimating the biodiversity of terrestrial invertebrates on a forested island using DNA barcodes and metabarcoding data. **Ecological Applications**, v. 29, n. 4, p. e01877, 2019.
- DRUMMOND, A. J.; RAMBAUT, A. BEAST: Bayesian evolutionary analysis by sampling trees. **BMC Evolutionary Biology**, v. 7, n. 1, p. 1-8, 2007.
- DUTTON, A.; BIGLER, F. Flight activity assessment of the egg parasitoid *Trichogramma brassicae* (Hym.: Trichogrammatidae) in laboratory and field conditions. **Entomophaga**, v. 40, p. 223-233, 1995.
- ELIAS, M.; HILL, R. I.; WILLMOTT, K. R.; DASMAHAPATRA, K. K.; BROWER, A. V.; MALLET, J.; JIGGINS, C. D. Limited performance of DNA barcoding in a diverse community of tropical butterflies. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 274, n. 1627, p. 2881-2889, 2007.
- EVANS, D. M.; KITSON, J. J. Molecular ecology as a tool for understanding pollination and other plant–insect interactions. **Current opinion in insect science**, v. 38, p. 26-33, 2020.
- EXCOFFIER, L.; LAVAL, G.; SCHNEIDER, S. Arlequin (version 3.0): an integrated software package for population genetics data analysis. **Evolutionary bioinformatics**, v. 1, 2005.
- FOLMER, O.; BLACK, M.; HOEH, W.; LUTZ, R.; VRIJENHOEK, R. DNA primers for amplification of mitochondrial *cytochrome c oxidase subunit I* from diverse metazoan invertebrates 3, 294–299. 1994.
- FOURNIER, F.; BOIVIN, G. Comparative dispersal of *Trichogramma evanescens* and *Trichogramma pretiosum* (Hymenoptera: Trichogrammatidae) in relation to environmental conditions. **Environmental Entomology**, v. 29, n. 1, p. 55-63, 2000.
- FREELAND, J. R. Philogeography. In: **Molecular Ecology**. John Wiley & Sons, Ltd., p. 155-199, 2005.
- FU, Y. Statistical tests of neutrality of mutations against population growth, hitchhiking and background selection. **Genetics**, v. 147, n. 2, p. 915-925, 1997.
- FURSOV, V. N. Discovery of four species of *Trichogramma* (Hymenoptera, Trichogrammatidae), new for the fauna of England. **Вестник зоологии**, 2000.
- GEBIOLA, M.; LOPEZ-VAAMONDE, C.; NAPPO, A. G.; BERNARDO, U. Did the parasitoid *Pnigalio mediterraneus* (Hymenoptera: Eulophidae) track the invasion of the horse chestnut leafminer?. **Biological invasions**, v. 16, n. 4, p. 843-857, 2014.

- GILBERT, M. T. P.; MOORE, W.; MELCHIOR, L.; WOROBEY, M. DNA Extraction from Dry Museum Beetles without Conferring External Morphological Damage. **PLoS ONE**, v. 2, n. 3, p. 272, 2007.
- GURR, G. M.; YOU, M. Conservation biological control of pests in the molecular era: new opportunities to address old constraints. **Frontiers in plant science**, v. 6, p. 1255, 2016.
- HASSAN, S. A. The mass rearing and utilization of *Trichogramma* to control lepidopterous pests: achievements and outlook. **Pesticide Science**, v. 37, n. 4, p. 387-391, 1993.
- HAUSMANN, A.; DILLER, J.; MORINIERE, J.; HÖCHERL, A.; FLOREN, A.; HASZPRUNAR, G. DNA barcoding of fogged caterpillars in Peru: A novel approach for unveiling host-plant relationships of tropical moths (Insecta, Lepidoptera). **PLoS One**, v. 15, n. 1, p. e0224188, 2020.
- HEBERT, P. D. N. Biological identifications through DNA barcodes. **Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences**, v. 270, n. 1512, p. 313-321, 2003.
- HEBERT, P. D. N.; PENTON, E. H.; BURNS, J. M.; JANZEN, D. H.; HALLWACHS, W. Ten species in one: DNA barcoding reveals cryptic species in the neotropical skipper butterfly *Astrartes fuligator*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 101, n. 41, p. 14812-14817, 2004.
- HICKERSON, M. J.; CARSTENS, B. C.; CAVENDER-BARES, J.; CRANDALL, K. A.; GRAHAM, C. H.; JOHNSON, J. B.; YODER, A. D. Phylogeography's past, present, and future: 10 years after. **Molecular phylogenetics and evolution**, v. 54, n. 1, p. 291-301, 2010.
- HILLIS, D. M.; DIXON, M. T. Ribosomal DNA: molecular evolution and phylogenetic inference. **The Quarterly review of biology**, v. 66, n. 4, p. 411-453, 1991.
- HORIKOSHI, R. J.; BERNARDI, O.; GODOY, D. N.; SEMEÃO, A. A.; WILLSE, A.; CORAZZA, G. O.; ...; HEAD, G. Resistance status of lepidopteran soybean pests following large-scale use of MON 87701x MON 89788 soybean in Brazil. **Scientific Reports**, v. 11, n. 1, p. 21323, 2021.
- IVEZIĆ, A.; RUGMAN-JONES, P.; MALAUSA, T.; RIS, N.; IGNJATOVIĆ-ĆUPINA, A. Molecular identification of *Trichogramma* species parasitizing *Ostrinia nubilalis* in corn and pepper in south-east border of Europe. **International Journal of Pest Management**, p. 1-12, 2020.
- JALALI, S. K.; OJHA, R.; VENKATESAN, T. DNA barcoding for identification of agriculturally important insects. **New horizons in insect science: Towards sustainable pest management**, p. 13-23, 2015.
- JINBO, U.; KATO, T.; ITO, M.I. Current progress in DNA barcoding and future implications for entomology. **Entomological Science**, v. 14, n. 2, p. 107-124, 2011.
- KNUTSON, A. The *Trichogramma* manual. **Bulletin/Texas Agricultural Extension Service; n° 6071**, 1998.

- KRESS, W. J. DNA barcodes for ecology, evolution, and conservation. **Trends in Ecology & Evolution**, v. 30, n. 1, p. 25-35, 2015.
- KRUPITSKY, A.; SHAPOVAL, N.; SHAPOVAL, G. DNA barcoding of the palaeartic elfin butterflies (Lepidoptera, Lycaenidae) with a description of four new species from Vietnam. **Insects**, v. 14, n. 4, p. 352, 2023.
- KUMAR, S.; STECHER, G.; LI, M.; KNYAZ, C.; TAMURA, K. MEGA X: molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. **Molecular Biology and Evolution**, v. 35, n. 6, p. 1547-1549, 2018.
- LANDAIS, I.; CHAVIGNY, P.; CASTAGNONE, C.; PIZZOL, J.; ABAD, P.; VANLERBERGHE-MASUTTI, F. Characterization of a highly conserved satellite DNA from the parasitoid wasp *Trichogramma brassicae*. **Gene**, v. 255, n. 1, p. 65-73, 2000.
- LEIGH, J. W.; BRYANT, D. Popart: full-feature software for haplotype network construction. **Methods in Ecology and Evolution**, 6(9):1110–1116, 2015.
- LEONG, W.; TEH, S. Y.; HOSSAIN, M. M.; NADARAJAW, T.; ZABIDI-HUSSIN, Z.; CHIN, S. Y.; LIM, S. H. E. Application, monitoring and adverse effects in pesticide use: The importance of reinforcement of Good Agricultural Practices (GAPs). **Journal of Environmental Management**, v. 260, p. 109987, 2020.
- LEVY, H. C.; GARCIA-MARUNIAK, A.; MARUNIAK, J. E. Strain identification of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) insects and cell line: PCR-RFLP of cytochrome oxidase C subunit I gene. **Florida Entomologist**, v. 85, n. 1, p. 186-190, 2002.
- LI, D.; MCCARTHY, B.; GUNAWARDANA, D. N.; WAITE, D. W.; ANDERSON, D.; GEORGE, S. Molecular identification of *Bactrocera passiflorae* (Diptera: Tephritidae): Challenge and solution for DNA barcoding. **Journal of Applied Entomology**, v. 144, n. 10, p. 877-884, 2020.
- LIS, J. T.; SCHLEIF, R. Size fractionation of double-stranded DNA by precipitation with polyethylene glycol. **Nucleic acids research**, v. 2, n. 3, p. 383–9, 1975.
- LUCK, R. F.; STOUTHAMER, R.; NUNNEY, L. P. Sex determination and sex ratio patterns in parasitic Hymenoptera. **Evolution and diversity of sex ratio in insects and mites.**, p. 442-476, 1993.
- MANDAL, S.; CHHAKCHHUAK, L.; GURUSUBRAMANIAN, G.; KUMAR, N. S. Mitochondrial markers for identification and phylogenetic studies in insects—A Review. **DNA Barcodes**, v. 2, n. 1, p. 1-9, 2014.
- MCFADDEN, C. S.; BENAYAHU, Y.; PANTE, E.; THOMA, J. N.; NEVAREZ, P. A.; FRANCE, S. C. Limitations of mitochondrial gene barcoding in *Octocorallia*. **Molecular Ecology Resources**, v. 11, n. 1, p. 19-31, 2011.
- MEIER, R.; SHIYANG, K.; VAIDYA, G.; NG, P. K. DNA barcoding and taxonomy in Diptera: a tale of high intraspecific variability and low identification success. **Systematic Biology**, v. 55, n. 5, p. 715-728, 2006.

- MERTEN, G. H.; MINELLA, J. P. G. The expansion of Brazilian agriculture: soil erosion scenarios. **International Soil and Water Conservation Research**, v. 1, n. 3, p. 37-48, 2013.
- MEYER, C. P.; PAULAY, G. DNA barcoding: error rates based on comprehensive sampling. **PLoS biology**, v. 3, n. 12, p. e422, 2005.
- NAGARAJA, H.; NAGARKATTI, S. Biosystematic studies on *Trichogramma* species: I. Experimental hybridization between *Trichogramma australicum* Girault, *T. evanescens* Westwood and *T. minutum* Riley. **Tech. Bull. Inst. Commonw. Inst. Biol. Control**, n. 10, p. 81-96, 1968.
- NAGARKATTI, S.; NAGARAJA, H. Redescriptions of some known species of *Trichogramma* showing the importance of the male genitalia as a diagnostic character. **Bull Entomol Res**, v. 61, n. 1, p. 13-31, 1971.
- NAKABACHI, A. Horizontal gene transfers in insects. **Current Opinion in Insect Science**, v. 7, p. 24-29, 2015.
- NANINI, F.; ROSSETTI, V. Z.; SOLIMAN, E. P.; ZAUZA, E. A.; BENATTI, T. R.; CORREA, A. S. Molecular identification and phylogeography of *Gonipterus* spp. (Coleoptera: Curculionidae) in Brazil. **Austral Entomology**, v. 61, n. 4, p. 462-471, 2022.
- NOYES, J. S. A review of the Neotropical species of *Ooencyrtus* Ashmead, 1900 (Hymenoptera: Encyrtidae). **Journal of natural history**, v. 19, n. 3, p. 533-554, 1985.
- NOYES, J. S.; PINTO, J. D.; STOUTHAMER, R. *Trichogramma evanescens*: one of the best known species of parasitic Hymenoptera, or is it. In: **Abstracts. Antonie van Leeuwenhoek Symposium. 7th European workshop on insect parasitoids**. p. 1-6, 2000.
- NYLANDER, J. A. A.; RONQUIST, F.; HUELSENBECK, J. P.; NIEVES-ALDREY, J. Bayesian phylogenetic analysis of combined data. **Systematic biology**, v. 53, n. 1, p. 47-67, 2004.
- ORDISH, G. The constant pest. A short history of pests and their control. **Peter Davies Ltd**, Londres, UK, 1976.
- ORTEGO, J.; KNOWLES, L. L. Incorporating interspecific interactions into phylogeographic models: A case study with Californian oaks. **Molecular Ecology**, v. 29, n. 23, p. 4510-4524, 2020.
- ORREGO, C.; AGUDELO-SILVA, F. Genetic variation in the parasitoid wasp *Trichogramma* revealed by DNA amplification of a section of the nuclear ribosomal repeat. **Florida Entomol.** 76: 519–524, 1993.
- PAKRASHI, A.; KUNDU, S.; SAINI, J.; TYAGI, K.; CHANDRA, K.; KUMAR, V. Molecular identification of selected bees from the Indian Himalaya: A preliminary effort. **Journal of Asia-Pacific Entomology**, v. 23, n. 4, p. 883-889, 2020.
- PAPADOPOULOU, A.; KNOWLES, L. L. Toward a paradigm shift in comparative phylogeography driven by trait-based hypotheses. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 113, n. 29, p. 8018-8024, 2016.

- PARRA, J. R. P.; ZUCCHI, R. A. *Trichogramma* e o controle biológico aplicado. FEALQ, Piracicaba, 1997.
- PARRA, J. R. P.; ZUCCHI, R. A. *Trichogramma* in Brazil: feasibility of use after twenty years of research. **Neotropical Entomology**, v. 33, n. 3, p. 271-281, 2004.
- PARRA, J. R. P. Mass rearing of egg parasitoids for biological control programs. In: CÔNSOLI, F. L.; PARRA, J. R. P., ZUCCHI, R. A. (Eds.). *Egg parasitoids in agrosystems with emphasis on Trichogramma*. New York: **Springer**. p. 267-292, 2010.
- PARRA, J.R.P.; BOTELHO, P.S.M.; PINTO, A.S. Biological control of pests as a key component for sustainable sugarcane production. p. 441-450. In: Cortez, L.A.B., ed. **Sugarcane bioethanol: R&D for productivity and sustainability**. Blücher, São Paulo, SP, Brazil. p. 441-450, 2010.
- PARRA, J. R. P. Biological control in Brazil: an overview. **Scientia Agricola**, v. 71, p. 420-429, 2014.
- PARRA, J. R. P. Controle biológico na agricultura brasileira. **Entomological Communications**, v. 1, 2019.
- PARRA, J. R. P.; COELHO Jr, A. Applied biological control in Brazil: from laboratory assays to field application. **Journal of Insect Science**, v. 19, n. 2, p. 5, 2019.
- PARRA, J. R. P.; PINTO, A. D. S.; NAVA, D. E.; OLIVEIRA, R. C. D.; DINIZ, A. J. F. **Controle biológico com parasitoides e predadores na agricultura brasileira**. Piracicaba: FEALQ, 2021.
- PARRA, J. R. P.; COELHO JR, A. Insect rearing techniques for biological control programs, a component of sustainable agriculture in Brazil. **Insects**, v. 13, n. 1, p. 105, 2022.
- PINTO, J. D.; STOUTHAMER, R. Systematics of the Trichogrammatidae with emphasis on *Trichogramma*. In: **Biological control with egg parasitoids**. p. 1-36. 1994.
- PINTO, J. D. Systematics of the north american species of *Trichogramma* Westwood (Hymenoptera: Trichogrammatidae). **Mem. Entomol. Soc. Wash.**, v. 22, p. 1-287, 1999.
- PINTO, J.D. A review of the New World genera of Trichogrammatidae (Hymenoptera). **Journal Hymenoptera Research**, Madison, v.15, p. 38-163, 2006.
- PLATNER, G. R.; VELTEN, R. K.; PLANOUTENE, M.; PINTO, J. D. Slide-mounting techniques for *Trichogramma* (Trichogrammatidae) and other minute parasitic Hymenoptera. **Entomological news (USA)**, 1999.
- POLASZEK, A.; RUGMAN-JONES, P. F.; STOUTHAMER, R.; HERNANDEZ-SUAREZ, E.; CABELLO, T.; DEL PINO PÉREZ, M. Molecular and morphological diagnoses of five species of *Trichogramma*: biological control agents of *Chrysodeixis chalcites* (Lepidoptera: Noctuidae) and *Tuta absoluta* (Lepidoptera: Gelechiidae) in the Canary Islands. **BioControl**, v. 57, p. 21-35, 2012.

- PRATISSOLI, D.; KLOSS, T. G.; ZINGER, F. D.; CARVALHO, J. R.; VIANNA, U. R.; PAES, J. P. Does mating interfere in the biological characteristics of a population of *Trichogramma pretiosum*?. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 86, p. 459-464, 2014.
- QUERINO, R. B.; ZUCCHI, R. A. Caracterização morfológica de dez espécies de *Trichogramma* (Hymenoptera: Trichogrammatidae) registradas na América do Sul. **Neotropical Entomology**, v. 32, p. 597-613, 2003.
- QUERINO, R. B.; ZUCCHI, R. A.; PINTO, J. D. Systematics of the Trichogrammatidae (Hymenoptera: Chalcidoidea) with a focus on the genera attacking Lepidoptera. In: CONSOLI, F.L.; PARRA, J.R.P.; RODRIGUES, S.M.M. e SAMPAIO, M.V. Armazenamento 40 de *Trichogramma pretiosum* Riley (Hymenoptera; Trichogrammatidae) em baixas temperaturas. **Arquivos do Instituto Biológico**, v.78, n.1, p.45-51, 2010.
- QUERINO, R. B.; ZUCCHI, R. A. Guia de identificação de *Trichogramma* para o Brasil. 2. ed. Brasília, DF: Embrapa, 2011.
- QUERINO, R. B.; ZUCCHI, R. A. Annotated checklist and illustrated key to the species of *Trichogramma* Westwood (Hymenoptera: Trichogrammatidae) from South America. **Zootaxa**, v. 4656, n. 2, p. 201–231, 2019.
- RICHLY, E.; LEISTER, D. NUMTs in sequenced eukaryotic genomes. **Molecular Biology and Evolution**, v. 21, n. 6, p. 1081-1084, 2004.
- ROGERS, A. R.; HARPENDING, H. Population growth makes waves in the distribution of pairwise genetic differences. **Molecular Biology: Evolution** 9, 552–569, 1992.
- RONQUIST, F.; HUELSENBECK, J. P. MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. **Bioinformatics**, v. 19, n. 12, p. 1572-1574, 2003.
- ROZAS, J.; FERRER-MATA, A.; SÁNCHEZ-DELBARRIO, J. C.; GUIRAO-RICO, S.; LIBRADO, P.; RAMOS-ONSINS, S. E.; SÁNCHEZ-GRACIA, A. DnaSP 6: DNA Sequence Polymorphism Analysis of Large Data Sets. **Molecular Biology and Evolution**, 34(12):3299–3302, 2017.
- RUGMAN-JONES, P. F.; HODDLE, M. S.; STOUTHAMER, R. Nuclear-mitochondrial barcoding exposes the global pest western flower thrips (Thysanoptera: Thripidae) as two sympatric cryptic species in its native California. **Journal of economic entomology**, v. 103, n. 3, p. 877-886, 2010.
- RUSSELL, J. E.; STOUTHAMER, R. The genetics and evolution of obligate reproductive parasitism in *Trichogramma pretiosum* infected with parthenogenesis-inducing *Wolbachia*. **Heredity**, v. 106, n. 1, p. 58-67, 2011.
- SANTOS, F. Ocorrência, dinâmica e diversidade genética populacional da *Helicoverpa armigera* (Hübner, 1809) (Lepidoptera: Noctuidae) no estado de Santa Catarina. 2015.
- SILVA, C. S.; CORDEIRO, E. M.; PAIVA, J. B.; DOURADO, P. M.; CARVALHO, R. A.; HEAD, G.; CORREA, A. S. Population expansion and genomic adaptation to agricultural environments of the soybean looper, *Chrysodeixis includens*. **Evolutionary Applications**, v. 13, n. 8, p. 2071-2085, 2020.

- SIMONATO, M.; PILATI, M.; MAGNOUX, E.; COURTIN, C.; SAUNE, L.; ROUSSELET, J.; KERDELHUE, C. A population genetic study of the egg parasitoid *Baryscapus servadeii* reveals large scale automictic parthenogenesis and almost fixed homozygosity. **Biological Control**, v. 139, p. 104097, 2019.
- SMITH, R.F.; APPLE, J.L.; BOTTRELL, D.G. The origins of Integrated Pest Management concepts for agricultural crops. In: **Integrated Pest Management**; APPLE, J.L., SMITH, R.F., Eds.; Springer: Boston, MA, USA, pp. 1–16, 1976.
- SMITH, S. M. Biological control with *Trichogramma*: advances, successes, and potential of their use. **Annual review of entomology**, v. 41, n. 1, p. 375-406, 1996.
- SOARES, P. L.; CORDEIRO, E. M.; SANTOS, F. N.; OMOTO, C.; CORREA, A. S. The reunion of two lineages of the Neotropical brown stink bug on soybean lands in the heart of Brazil. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 2496, 6 dez. 2018.
- SONG, C.; LIN, X. L.; WANG, Q.; WANG, X. H. DNA barcodes successfully delimit morphospecies in a superdiverse insect genus. **Zoologica Scripta**, v. 47, n. 3, p. 311-324, 2018.
- SONG, C.; WANG, L.; LEI, T.; QI, X. New Color-Patterned Species of *Microtendipes* Kieffer, 1913 (Diptera: Chironomidae) and a Deep Intraspecific Divergence of Species by DNA Barcodes. **Insects**, v. 14, n. 3, p. 227, 2023.
- STOUTHAMER, R.; PINTO, J. D.; PLATNER, G. R.; LUCK, R. F. Taxonomic status of thelytokous forms of *Trichogramma* (Hymenoptera: Trichogrammatidae). **Annals of the Entomological Society of America**, v. 83, n. 3, p. 475-481, 1990.
- STOUTHAMER, R.; KAZMER, D. J. Cytogenetics of microbe-associated parthenogenesis and its consequences for gene flow in *Trichogramma* wasps. **Heredity**, v. 73, n. 3, p. 317-327, 1994.
- STOUTHAMER, R.; HU, J.; VAN KAN, F. J.; PLATNER, G. R.; PINTO, J. D. The utility of internally transcribed spacer 2 DNA sequences of the nuclear ribosomal gene for distinguishing sibling species of *Trichogramma*. **BioControl**, v. 43, p. 421-440, 1999.
- SUJEEVAN, R.; HEBERT, P. D. N. BOLD: the barcode of life data system. **Molecular Ecology Notes**, v. 7, n. 3, p. 355-364, 2007.
- UNITED NATIONS. Growing at a slower pace, world population is expected to reach 9.7 billion in 2050 and could peak at nearly 11 billion around 2100. New York: UNDESA, 2019.
- TAJIMA, F. Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. **Genetics**, v. 123, n. 3, p. 585-595, 1989.
- TAKAHASHI, T. A.; NISHIMURA, G.; QUERINO, R. B.; FOERSTER, L. A. An Integrative Taxonomy of a New Species of *Trichogramma* Westwood (Hymenoptera: Trichogrammatidae) with High Reproductive. **Neotropical Entomology**, p. 1-10, 2021.
- VALENTINI, A.; POMPANON, F.; TABERLET, P. DNA barcoding for ecologists. **Trends in Ecology & Evolution**, v. 24, n. 2, p. 110-117, 2009.

- VAN OOSTERHOUT, C.; VAN HEUVEN, M. K.; BRAKEFIELD, P. M. On the neutrality of molecular genetic markers: pedigree analysis of genetic variation in fragmented populations. **Molecular Ecology**, v. 13, n. 5, p. 1025-1034, 2004.
- VASCONCELOS, Y. Inseto contra inseto. **Pesquisa FAPESP**, São Paulo, n. 194, p.68-73, 2012.
- VENKATESAN, T.; MORE, R. P.; BASKAR, R.; JALALI, S. K.; LALITHA, Y.; BALLAL, C. R. Differentiation of some indigenous and exotic trichogrammatids (Hymenoptera: Trichogrammatidae) from India based on Internal transcribed spacer-2 and cytochrome oxidase-I markers and their phylogenetic relationship. **Biological control**, v. 101, p. 130-137, 2016.
- VIANA, J. B. V.; QUERINO, R. B.; CARVALHO, L. C. B.; LIMA, P. D. C. Sequence analysis of the internal transcribed spacer 2 (ITS2) region of rDNA for identifying *Trichogramma* species and evaluating genetic diversity. **Brazilian Journal of Biology**, n. AHEAD, 2020.
- WAJNBERG, E.; HASSAN, S. A. Biological Control with Egg Parasitoids. **CAB International**, Wallingford, United Kingdom, 1994.
- WANG, Z.; He, K. L.; ZHANG, F.; LU, X.; BABENDREIER, D. Mass rearing and release of *Trichogramma* for biological control of insect pests of corn in China. **Biological Control**, v. 68, p. 136-144, 2014.
- WENGRAT, A. P. G. S.; COELHO JR, A.; PARRA, J. R. P.; TAKAHASHI, T. A.; FOERSTER, L. A.; CORRÊA, A. S.; ZUCCHI, R. A. Integrative taxonomy and phylogeography of *Telenomus remus* (Scelionidae), with the first record of natural parasitism of *Spodoptera* spp. in Brazil. **Scientific Reports**, v. 11, n. 1, p. 1-9, 2021.
- WERNBERG, T.; COLEMAN, M. A.; BENNETT, S.; THOMSEN, M. S.; TUYA, F.; KELAHER, B. P. Genetic diversity and kelp forest vulnerability to climatic stress. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 1-8, 2018.
- WIEMERS, M.; FIEDLER, K. Does the DNA barcoding gap exist? a case study in blue butterflies (Lepidoptera: Lycaenidae). **Frontiers in zoology**, v. 4, p. 1-16, 2007.
- WOLF, C.; RENTSCH, J.; HÜBNER, P. PCR– RFLP analysis of mitochondrial DNA: A reliable method for species identification. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 47, n. 4, p. 1350-1355, 1999.
- YANG, C. Y.; KIM, S. J.; KWON, S. J.; AHN, S. J. Molecular identification of closely related mirine plant bugs, *Apolygus spinolae* and *A. lucorum* (Heteroptera: Miridae) by PCR-RFLP markers. **Journal of Asia-Pacific Entomology**, v. 19, n. 3, p. 729-734, 2016.
- ZUCCHI, R. A.; QUERINO, R. B.; MONTEIRO, R. C. Diversity and Hosts of *Trichogramma* in the New World, with Emphasis in South America. In: CÔNSOLI, F. L.; PARRA, J. R. P., ZUCCHI, R. A. (Eds.). **Egg parasitoids in agrosystems with emphasis on *Trichogramma***. New York: Springer. p. 267-292, 2010.