



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DA NATUREZA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO EM ZOOLOGIA

**Estudos Moleculares de Espécies do Gênero *Trichogramma* Westwood,
1833 (Hymenoptera: Trichogrammatidae) e Detecção de *Wolbachia* spp.
(Rickettsiales: Anaplasmataceae)**

NILENE RODRIGUES DOS SANTOS

João Pessoa - PB
Novembro/ 2011

**Estudos Moleculares de Espécies do Gênero *Trichogramma* Westwood,
1833 (Hymenoptera: Trichogrammatidae) e Detecção de *Wolbachia* spp.
(Rickettsiales: Anaplasmataceae)**

NILENE RODRIGUES DOS SANTOS

*Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação
em Ciências Biológicas do Centro de Ciências
Exatas e da Natureza da Universidade Federal
da Paraíba, como parte dos requisitos para
obtenção do grau de Doutor em Ciências
Biológicas.*

Área de Concentração: Zoologia

Orientador: Prof. Dr. Antônio José Creão Duarte
(UFPB/CCEN)

S237e Santos, Nilene Rodrigues dos.

Estudos moleculares de espécies do gênero *Trichogramma* Westwood, 1833 (Hymenoptera: Trichogrammatidae) e detecção de *Wolbachia* spp. (Rickettsiales: Anaplasmataceae) / Nilene Rodrigues dos Santos.-- João Pessoa, 2011.
92f.

Orientador: Antônio José Creão Duarte
Tese (Doutorado) – UFPB/CCEN

1. Ciências Biológicas. 2. Zoologia. 3. Sistemática molecular.
4. Diversidade genética. 5. Parasitóide de ovos. 6. Proteobactéria.

UFPB/BC

CDU: 57/59(043)

NILENE RODRIGUES DOS SANTOS

**Estudos Moleculares de Espécies do Gênero *Trichogramma* Westwood,
1833 (Hymenoptera: Trichogrammatidae) e Detecção de *Wolbachia* spp.
(Rickettsiales: Anaplasmataceae)**

Aprovada em 30 de Novembro de 2011

BANCA EXAMINADORA

PARECER

Dr. Antônio José Creão Duarte - (Orientador)
Professor/CCEN/UFPB

Dr. Raul Porfírio de Almeida - Examinador (Titular)
Pesquisador /Embrapa Algodão/CNPA

Dr. Demetrius Antônio M. de Araújo - Examinador (Titular)
Professor/Centro de Biotecnologia/UFPB

Dr. Américo Iorio Ciociola Junior. - Examinador (Titular)
Professor/IFTM

Prof. Dr. Eduardo Barbosa Beserra (Titular)
Professor/UEPB

Prof. Dra. Carla de Lima Bicho - Examinadora (Suplente)
Professor/UEPB

**João Pessoa - PB
Novembro - 2011**

OFEREÇO

A Deus, por permitir mais uma grande vitória na minha vida.

Aos meus queridos e amados pais Nelsa Rodrigues dos Santos e Antônio Francisco dos Santos (*in memoriam*), pelo amor incondicional, incentivos contínuos, conselhos e ensinamentos, sobretudo a honestidade e o respeito que servirão por toda a minha vida.

Ao meu esposo Darryl Alexander Sibeon, que estava sempre ao meu lado. Obrigada pelo carinho, compreensão nos momentos difíceis e principalmente pela sua dedicação. Te amo muito!

A meus irmãos, Neuma, Nelsânia, Nelcy, Marcos, Raniere, Nilreide, Núbia e Nilza, que acompanharam a minha luta, dando apoio emocional. Amo muito vocês!

DEDICO

Ao meu querido e amado filho, **Vinícius Rodrigues Barros**, o melhor presente que Deus me concedeu. Mesmo tão pequeno, soube entender o período em que sua mãe estava atarefada, porém nunca ausente. Meu amor por você é maior que o infinito!

“Sede como os pássaros que, ao pousarem um instante sobre os ramos mais leves, sentem-nos ceder, mas cantam! Eles sabem que possuem asas.”

(Victor Hugo)

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Dr. Antônio José Creão Duarte, minha admiração e respeito por ser um grande profissional.

Ao pesquisador Dr. Raul Porfírio de Almeida da Embrapa-Algodão, pela parceria no desenvolvimento do trabalho e pela cessão da grande maioria das espécies e populações de *Trichogramma*. Meu carinho e respeito, ao ser humano e profissional que mostrou ser no decorrer deste trabalho, servindo-me de exemplo para a vida acadêmico-profissional.

Ao Programa de Pós - Graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal da Paraíba.

A todos os professores desse Programa que contribuíram para o meu crescimento como aluna de doutorado.

À Capes, pela concessão da bolsa de estudo, sem a qual teria sido impossível o desenvolvimento deste trabalho.

A todos os funcionários do PPGCB, em especial aos secretários Saulo, Jossias e Glória.

À Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária/Embrapa-Algodão/CNPA/Laboratório de Biotecnologia, que nos proporcionou a parceria, tornando possível o andamento do trabalho de tese.

À pesquisadora e Coordenadora do Laboratório de Biotecnologia da Embrapa – Algodão, Dra. Liziane Lima, pelo acolhimento.

Aos funcionários e aos colegas do Laboratório de Biotecnologia da Embrapa Algodão.

Ao Professor da Universidade Estadual da Paraíba, MSc. Walter Fabrício Silva Martins pela sua contribuição no desenvolvimento da pesquisa.

Ao professor Dr. Demetrius Antônio M. de Araújo (Centro de Biotecnologia da UFPB), pela valiosa parceria na etapa de sequenciamento das amostras, pelo acolhimento e confiança depositada.

Aos alunos de doutorado do Programa RENORBio/Centro de Biotecnologia da UFPB, Itácio Padilha e Teresa Cristina, pela contribuição na realização das purificações e sequenciamento das amostras de DNA das espécies de *Trichogramma*, pelo acolhimento, companheirismo e amizade construída no período das atividades em laboratório.

À Pesquisadora da Embrapa Meio-Norte, Dra. Ranyse Barbosa Querino, pelo envio de amostras de *Trichogramma* e pela contribuição na identificação morfológica de populações de *Trichogramma pretiosum*.

Ao Professor da Universidade Federal do Espírito Santo, Dr. Dirceu Pratissoli, pelo envio de amostras de *Trichogramma*, de grande importância para o desenvolvimento da pesquisa.

Aos meus amigos de curso, em especial Joafrâncio, Eriberto, Daniele, Flávia, Carlo Rivero e nossas atuais representantes discentes, Paula Honório e Anne, pelo apoio e companheirismo construído durante o curso.

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO I	Pág.
Tabela 1. Espécies de <i>Trichogramma</i> , amostra e origem.....	17
Tabela 2. Primers específicos utilizados nas reações de PCR (Stouthamer et al., 1999).....	18
Tabela 3. Componentes e volumes utilizados na preparação das reações de PCR.....	18
Tabela 4. Reagentes utilizados na reação de PCR de sequenciamento.....	20
Tabela 5. Quantificação e pureza das amostras de DNA genômico de sete espécies de <i>Trichogramma</i>	22
Tabela 6. Quantificação de DNA e grau de pureza dos produtos de PCR purificados de espécies de <i>Trichogramma</i>	25
Tabela 7. Identificação de quatro espécies de <i>Trichogramma</i> através de comparação das sequências consensos obtidas com sequências do banco de dados do GenBank - NCBI.....	26
Tabela 8. Matriz de distância genética da região ITS2 do DNA ribossomal para quatro espécies de <i>Trichogramma</i>	29

CAPÍTULO II

Pág.

Tabela 1.	Populações de <i>Trichogramma pretiosum</i> obtidas de 11 municípios em sete estados do Brasil.....	40
Tabela 2.	Primers específicos utilizados nas reações de PCR.....	41
Tabela 3.	Componentes e volumes utilizados na preparação das reações de PCR..	42
Tabela 4.	Reagentes utilizados na reação de PCR de sequenciamento.....	43
Tabela 5.	Quantificação de DNA extraído das populações de <i>Trichogramma pretiosum</i>	46
Tabela 6.	Quantificação e pureza das amostras de produtos de PCR purificadas das populações de <i>Trichogramma pretiosum</i>	48
Tabela 7.	Identificação das amostras de <i>T. pretiosum</i> através de comparação das sequências consensos obtidas com sequências do banco de dados do GenBank – NCBI.....	49
Tabela 8.	Tamanhos em pares de bases, conteúdo G+C (Guanina + Citosina) e composição nucleotídica das sequências obtidas da região ITS2 do DNA ribossomal das populações estudadas.....	50
Tabela 9.	Matriz de distância genética da região ITS2 do DNA ribossomal para populações de <i>Trichogramma pretiosum</i> em 11 localidades, utilizando o método P.....	55
Tabela 10.	Matriz da distância geográfica para populações de <i>T. pretiosum</i> em 11 localidades, valores expressos em quilômetros.....	57

CAPÍTULO III

Pág.

Tabela 1. Amostras de *Trichogramma pretiosum* de 8 localidades do Brasil..... 68

Tabela 2. Primers usados nas reações de PCR (Braig et al., 1998)..... 69

Tabela 3. Componentes e volumes utilizados na preparação das reações de PCR 69

LISTA DE FIGURAS

Pág.

CAPÍTULO I

Figura 1. Geis de agarose 0,8% com produtos de PCR da região ITS2 do DNA ribossomal de espécies de *Trichogramma*.....23

Figura 2. Alinhamento múltiplo das sequências consensos da região ITS2 do DNA ribossomal de três espécies de *Trichogramma*.....28

Figura 3. Dendrograma baseado nas análises das sequências de nucleotídeos da região ITS2 do DNA ribossomal de quatro espécies de *Trichogramma* a partir do método Neighbor-Joining.....29

CAPÍTULO II

Figura 1. Eletroforese em gel de agarose 0,8 % do produto da amplificação do DNA por PCR.....47

Figura 2. Alinhamento múltiplo das sequências consensos da região ITS2 do DNA ribossomal de populações de *T. pretiosum* em 11 localidades.....53

Figura 3. Dendrograma a partir do método NJ com bootstrap de 1000 replicações, agrupando as sequências obtidas.....56

CAPÍTULO III

Figura 1. Reação de PCR de amostras de *T. pretiosum*.....71

RESUMO

As espécies de *Trichogramma* são identificadas por meio da morfologia da genitália do macho, sendo dificultada pelo tamanho reduzido do indivíduo (0,25 mm) e/ou a presença de espécies crípticas. Por esta razão, a biologia molecular se constituiu em uma boa alternativa para a identificação de espécies de *Trichogramma*, sendo também utilizada na identificação de proteobactéria do gênero *Wolbachia*, conhecida por induzir partenogênese em espécies de *Trichogramma*. O objetivo desta tese foi utilizar métodos moleculares para identificação de espécies de *Trichogramma*, verificar a diversidade de populações de *Trichogramma pretiosum* em 11 municípios no Brasil e sua associação com a bactéria do gênero *Wolbachia*. As amostras de espécies do gênero *Trichogramma* e de populações de *Trichogramma pretiosum* foram submetidas à extração de DNA genômico para a realização de PCR utilizando o primer direto ITS-2- 5' TGTGAACTGCAGGACACATG-3' e o reverso IT2-5' GTCTTGCCTGCTCTGCTCTGAG.-3'. Os produtos de DNA obtidos das espécies de *Trichogramma* e das populações de *T. pretiosum* foram purificados e submetidos ao sequenciamento. Para detectar a presença de bactérias do gênero *Wolbachia* em populações de *T. pretiosum*, as amplificações foram realizadas com primers específicos *wsp*, com um volume final da reação de 25 µl. O tamanho dos produtos de PCR foi determinado utilizando um marcador de peso molecular de 100 pb, sendo utilizado um controle negativo sem DNA e o restante dos componentes e um controle positivo com a presença de *Wolbachia*. Pode-se verificar que foi possível extrair DNA de todas as espécies de *Trichogramma* estudadas com quantidades e qualidades suficientes para obter perfis eletroforéticos, com concentrações do DNA genômico variando entre 15,3 e 50 ng/µl. Por meio da técnica de PCR, os fragmentos da região ITS2 do DNA ribossomal foram amplificados, sendo possível identificar as espécies de *Trichogramma* pelo sequenciamento, sendo realizada a busca por similaridade utilizando o programa BLAST, no banco de dados do GenBank (NCBI – National Center for Biotechnology Information) e feita a análise de dendrograma de acordo com a matriz de distância genética, onde foi obtido três grupos, o primeiro formado pela espécie *T. exigum*, o segundo pela espécie *T. pretiosum* e o terceiro pela espécie *T. galloi*. Com o resultado da busca por similaridade utilizando o programa BLAST, no banco de dados do GenBank, obteve-se uma média de 92,2% de máxima identificação referente à espécie de *Trichogramma pretiosum*, confirmando o correto sequenciamento. O tamanho das sequências variaram de 355 a 503 pb. A média do conteúdo G + C (Guanina + Citosina) foi de 53,2%. Após o alinhamento das 11 sequências de *T. pretiosum*, foram encontrados 391 sítios conservados, que refletem 73 % do total de 536 sítios encontrados, confirmando a semelhança entre as amostras, bem como a confiança nas sequências obtidas. A média encontrada para essa matriz de distância foi de 0,30. De acordo com o dendrograma obtido a partir da matriz de distância genética pelo método do vizinho próximo (Neighbor-Joining), pode-se verificar a presença de quatro grupos: o primeiro, formado pelas populações TPAES, TPPARS, TPRMT e TPCVMT; o segundo, pela população de TPSPMT; o terceiro grupo, pelas populações de TPPPE, TPMVCE, TPPPBB, TPPPMT, TPJSP e o quarto pela população de TPPLMT, sendo a população mais distante geneticamente. A distância geográfica não afetou a similaridade ou

dissimilaridade genética entre os parasitóides, não existindo, diferenças significativas entre distância geográfica e a similaridade genética das amostras de *T. pretiosum* nas localidades coletadas. Das populações de *T. pretiosum* analisadas, a presença da endobactérias ocorreu na população proveniente do Estado do Espírito Santo, sendo o primeiro registro local da presença dessa α proteobactéria para a espécie.

Palavras-chave: Sistemática molecular, diversidade genética, parasitóide de ovos, proteobactéria.

ABSTRACT

Trichogramma species are identified by the morphology of the male genitalia, making the identification difficult due to the small size of the individual (0.25 mm) and/or the presence of cryptic species. Therefore molecular biology constitutes a good alternative for the identification of *Trichogramma* species and is also used in the identification of Proteobacteria of the genus *Wolbachia*, known to induce parthenogenesis in *Trichogramma* species. The purpose of this thesis was to use molecular methods to identify *Trichogramma* species, verify the diversity of *Trichogramma pretiosum* populations in 11 cities in Brazil and its association with bacteria of the genus *Wolbachia*. The samples of *Trichogramma pretiosum* species and *Trichogramma* populations were submitted to extraction of genomic DNA for PCR using the forward primer ITS-2- 5' TGTGAACTGCAGGACACATG-3' and the reverse primer IT2-5' GTCTTGCCTGCTCTGCTCTGAG.-3'. The DNA products obtained from *Trichogramma* species and populations of *T. pretiosum* were purified and sequenced. To detect the presence of bacteria of the *Wolbachia* genus in *T. pretiosum* populations, the amplifications were done using wsp specific primers, with a final reaction volume of 25 µl. The size of PCR products was determined using a molecular weight marker 100 bp using a negative control without DNA, the remaining components and a positive control containing *Wolbachia*. It can be verified that it was possible to extract DNA from all the *Trichogramma* species with quantities and qualities sufficient for electrophoretic profiles with genomic DNA concentrations ranging from 15.3 to 50ng/µl. Using PCR, the fragments of the ITS2 region of ribosomal DNA were amplified and one can identify the species of *Trichogramma* with the sequencing by using the similarity search of the BLAST program in the GenBank database (NCBI - National Center for Biotechnology Information) and dendrogram analysis performed according to the genetic distance matrix, from which three groups were formed, the first by *T. exigum*, the second by *T. pretiosum* and the third by *T. galloi*. With the results of the query by similarity using the BLAST program in the GenBank database a maximum identification average of 92,2% was obtained regarding the species of *Trichogramma pretiosum*, confirming the correct sequencing. The size of the sequences ranged from 355 to 503 bp. The average G + C content (guanine + cytosine) was 53,2%. After aligning the 11 sequences of *T. pretiosum*, 391 sites were found conserved, reflecting 73% of the total of 536 sites found, confirming the similarity between samples, as well as confidence in the sequences obtained. The average found for this distance matrix was 0.30. According to the dendrogram obtained from the genetic distance matrix using the neighbor-joining method one can verify the presence of four groups, the first formed by the TPAES, TPPARS, TPRMT TPCVMT populations and the second by the TPSPMT population, the third group by the TPPPE, TPMVCE, TPPPBB, TPPPMT, TPJSP populations, and the fourth by the TPPLMT population, being the most genetically distant population. The geographical distance did not affect the genetic similarity or dissimilarity between parasitoids having no significant difference between geographic distance and genetic similarity of the *T. pretiosum* samples in the locations collected. Of the *T. pretiosum* populations analyzed, the presence of

endobacterias occurred in the population from the state of Espírito Santo, the first local record of the presence of this α proteobacteria for the species.

Keywords: Molecular systematics, genetic diversity, egg parasitoid, proteobacteria.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS	i
LISTA DE FIGURAS.....	iv
RESUMO	v
ABSTRACT.....	vii
1. INTRODUÇÃO GERAL.....	1
1.1. <i>Trichogramma</i> spp. (Hymenoptera: Thichogrammatidae).....	1
1.2. Estudos moleculares em populações de <i>Trichogramma</i>	2
1.3. Associação de espécies de <i>Trichogramma</i> com bactérias do gênero <i>Wolbachia</i> ... 5	5
2. OBJETIVOS	7
2.1. Objetivo Geral	7
2.2. Objetivos Específicos	7
3. HIPÓTESES	7
4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	8
5. CAPÍTULO I	12
5.1. Resumo	13
5.2. Abstract.....	14
5.3. Introdução.....	15
5.4. Material e Métodos.....	17
5.4.1. Obtenção das amostras de espécies de <i>Trichogramma</i>	17
5.4.2. Extração do DNA genômico.....	17
5.4.3. Amplificação da região ITS2 do DNA ribossomal por reação em cadeia da DNA polimerase (PCR) e Eletroforese	18
5.4.4. Eletroforese.....	19
5.4.5. Purificação dos fragmentos de DNA ribossomal	19
5.4.6. Sequenciamento.....	19
5.4.6.1. PCR para o sequenciamento da região ITS2 do DNA ribossomal	19
5.4.6.2. Precipitação da PCR para o sequenciamento da região ITS2 do DNA ribossomal.....	20
5.4.7. Alinhamento das sequências.....	20
5.5. Resultados e Discussão.....	22
5.5.1. Extração do DNA genômico.....	22
5.5.2. Amplificação da região ITS2 do DNA ribossomal por reação em cadeia da DNA polimerase (PCR) e Eletroforese	23
5.5.3. Purificação do produto de PCR amplificado	24
5.5.4. Sequências consenso da região ITS2 do DNA ribossomal.....	25
5.5.5. Alinhamento múltiplo das sequencias consensos.....	27

5.6.	Conclusões.....	30
5.7.	Referências Bibliográficas.....	31
6.	CAPÍTULO II.....	35
6.1.	Resumo.....	36
6.2.	Abstract.....	37
6.3.	Introdução.....	38
6.4.	Material e Métodos.....	40
6.4.1.	Obtenção das amostras de <i>Trichogramma pretiosum</i>	40
6.4.2.	Extração de DNA, amplificação da região ITS2 do DNA ribossomal por reação em cadeia da DNA polimerase (PCR) e purificação.....	41
6.4.3.	Purificação dos fragmentos de DNA ribossomal.....	42
6.4.4.	Sequenciamento.....	43
6.4.4.1.	PCR para o sequenciamento da região ITS2 do DNA ribossomal.....	43
6.4.4.2.	Precipitação da PCR de sequenciamento da região ITS2 do DNA ribossomal.....	43
6.4.5.	Alinhamento múltiplo e tamanho das sequências.....	44
6.4.6.	Análise de agrupamento.....	44
6.4.7.	Teste de Mantel.....	44
6.5.	Resultados e Discussão.....	46
6.5.1.	Extração do DNA genômico.....	46
6.5.2.	Amplificação da região ITS2 do DNA ribossomal por Reação em Cadeia da DNA Polimerase (PCR).....	47
6.5.3.	Purificação do produto de PCR amplificado.....	48
6.5.4.	Sequência consenso da região ITS2 do DNA ribossomal.....	49
6.5.5.	Tamanho das sequências e análise do conteúdo GC.....	50
6.5.6.	Alinhamento múltiplo das sequências consensos.....	51
6.5.7.	Matriz de distância genética.....	54
6.5.8.	Análise de agrupamento.....	55
6.5.9.	Teste de Mantel para a região ITS2 do DNA ribossomal.....	56
6.6.	Conclusões.....	58
6.7.	Referências Bibliográficas.....	59
7.	CAPÍTULO III.....	63
7.1.	Resumo.....	64
7.2.	Abstract.....	65
7.3.	Introdução.....	66
7.4.	Material e Métodos.....	68
7.4.1.	Obtenção das amostras de <i>Trichogramma pretiosum</i>	68
7.4.2.	Extração de DNA e PCR para detecção de <i>Wolbachia</i> em <i>Trichogramma pretiosum</i>	69
7.5.	Resultados e Discussão.....	71
7.6.	Conclusão.....	73
7.7.	Referências Bibliográficas.....	74
8.	SUGESTÕES PARA NOVAS PESQUISAS.....	77

9. APÊNDICES.....	78
9.1. Sequências consenso obtidas da regiões ITS2 do DNA ribossomal de espécies de <i>Trichogramma</i> estudadas alinhadas no BLAST/GenBank.....	78
9.2. Sequências consenso da região ITS2 do DNA ribossomal das amostras das populações de <i>Trichogramma pretiosum</i> estudadas alinhadas no BLAST/GenBank.....	81
10. LISTA DE PUBLICAÇÕES (2007 - 2011)	92

1. INTRODUÇÃO GERAL

1.1. *Trichogramma* spp. (Hymenoptera: Thichogrammatidae)

O gênero *Trichogramma* Westwood, 1833 é o maior da família Trichogrammatidae (Hymenoptera) (Pinto, 1999). Estes organismos são microhimenópteros parasitóides exclusivos de ovos habitualmente associados à ordem Lepidoptera (Querino e Zucchi, 2003).

São registradas no mundo, aproximadamente 210 espécies de *Trichogramma*, ocorrendo 41 espécies nativas na América do Sul, sendo o Brasil com o maior número de registros com 26 espécies encontradas (Consoli et al., 2010). De acordo com os registros a espécie *Trichogramma pretiosum* Riley, 1879 (Hymenoptera: Trichogrammatidae) é encontrada nas regiões Centro-Oeste, Nordeste, Sul e Sudeste do Brasil, com maior incidência na região Sudeste (Silva, 2007).

Nas espécies de *Trichogramma* a reprodução pode ser por arrenotoquia ou telítóquia. A reprodução arrenótoca é a mais comum e consiste em ovos fertilizados que produzem fêmeas diplóides e ovos não fertilizados que geram machos haplóides. O segundo modo, menos comum, é chamado partenogênese completa, em que os ovos fertilizados e não-fertilizados produzem fêmeas diplóides. O modo de reprodução telítoca em *Trichogramma* pode ser reversível (associada à infecção microbiana) e não reversível (Stouthamer et al., 1990).

O ciclo biológico das espécies de *Trichogramma* compreende as fases de ovo, larva, pré-pupa e pupa. Na fase de pupa, com o desenvolvimento do parasitóide, o ovo do hospedeiro torna-se escuro em virtude da esclerotização da cutícula, sendo uma característica marcante de parasitismo por espécies de *Trichogramma* (Consoli et al., 1999). A duração do ciclo biológico de espécies de *Trichogramma* é muito variável e depende principalmente da temperatura, podendo o desenvolvimento de ovo até adulto ter uma duração aproximada de 10 a 12 dias, independente do hospedeiro (Calvin et al., 1984; Harrison et al., 1985; Stein e Parra, 1987; Bleicher e Parra, 1989; Consoli e Parra, 1996; Pratisoli e Parra, 2000).

Para identificação das espécies de *Trichogramma*, inicialmente era avaliada a morfologia externa dos adultos pela observação da coloração do inseto, do comprimento do corpo, pela densidade das cerdas nas asas e pelo comprimento das cerdas nas antenas. Devido à pequena confiabilidade destes caracteres morfológicos, pois variavam com o tamanho do corpo e com os fatores ambientais, os esforços para a identificação das espécies eram concentrados nos aspectos biológicos e reprodutivos (Borba et al., 2005). Posteriormente, Nagarkatti e Nagaraja (1971) mostraram a importância da genitália do macho como caráter na identificação específica, sendo um grande avanço na identificação das espécies de *Trichogramma*. Entretanto, em alguns casos a identificação é dificultada devido à ausência de machos em espécies telítocas infectadas por bactérias do gênero *Wolbachia*, pela presença de espécies crípticas e pelo tamanho diminuto do indivíduo (Almeida e Stouthamer, 2003; Borba et al., 2005). Para solucionar esta situação, a biologia molecular vem se utilizando de marcadores moleculares por se constituir em uma boa alternativa para identificação de espécies de *Trichogramma* (Oliveira et al., 2002).

O sequenciamento das regiões do DNA ribossomal do espaço transcrito interno (ITS1 e ITS2) tem sido utilizado em estudos intraespecíficos e na diferenciação de espécies de diversos grupos de organismos e em insetos e essas sequências tem sido usadas em propostas taxonômicas e para diferenciar espécies de *Trichogramma* morfologicamente semelhantes de difícil identificação (Almeida, 2004).

1.2. Estudos moleculares em populações de *Trichogramma*

Algumas mudanças observadas em populações de insetos criados em laboratório estão associadas ao controle genético, com efeitos de seleção em genótipos existentes, e à perda ao acaso de genótipos devido à deriva genética. No entanto, quando se coletam espécies silvestres de inimigos naturais para criação em laboratórios, pode-se esperar mudanças genéticas devido ao processo de domesticação das mesmas (Bartlett, 1985).

Os himenópteros compreendem um dos maiores e mais diversos grupos de insetos. Entretanto, tem se verificado que as espécies dessa ordem apresentam baixa variabilidade genética quando comparadas a outros insetos (Berkelhamer, 1983; Graur, 1985; Packer e Owen, 2001). Este baixo nível de variação genética tem sido explicado pelo sistema de determinação do sexo, comportamento social (Graur, 1985; Borascchi e Del Lama, 2004).

A colonização de inimigos naturais em laboratório pode favorecer uma maior produção de indivíduos homozigóticos, em relação às populações no campo e em muitos casos, esses indivíduos possuem caracteres indesejáveis. Entretanto, um modo de minimizar esse problema de endogamia é a obtenção de grandes populações desses indivíduos para manter uma variação genética suficientemente ampla (Bartlett, 1984).

Já Gusev e Lebdev (1988) citaram que toda criação de linhagens de *Trichogramma*, em laboratório, deve ser iniciada com um mínimo de 1000 indivíduos para se reduzir as chances de sua degeneração genética. Além disso, de acordo com esses autores, pelo menos a cada seis meses, deve-se introduzir material de campo para que o vigor e a agressividade do parasitóide sejam mantidos.

Joslyn (1984) relatou que, para manter heterogeneidade suficiente, uma colônia não deverá ser menor que o número de insetos fundadores, pois quanto maior a colônia, melhor. No entanto, segundo o mesmo autor, poucos resultados estão disponíveis a respeito de tamanho efetivo de populações, além de mencionar um número mínimo de 500 indivíduos.

Os estudos genéticos de polimorfismo em populações eram realizados inicialmente, com marcadores baseados em padrões fenotípicos (Ferreira e Grattapaglia, 1998). Contudo, à variação fenotípica das características morfológicas é limitada devido ao pequeno número de caracteres que possam ser verificados (Vilarinho, 2007). Com o surgimento de técnicas modernas de biologia molecular, com diversos métodos de detecção de polimorfismo genético de DNA, tais limitações ficaram minimizadas, constituindo uma ferramenta eficiente nos estudos de populações (Ferreira e Grattapaglia, 1998, Schlotterer, 2004).

Atualmente, existem várias técnicas disponíveis que empregam uma estratégia particular para detectar polimorfismo no DNA; entre estas podemos citar: DNA mitocondrial (DNA mt), Polimorfismo do DNA Amplificado Randomicamente (RAPD), Isoenzimas, Polimorfismo do Comprimento de Fragmentos de Restrição (RFLP), genes de RNA ribossomal (RNAr), Polimorfismo do Comprimento do Fragmento Amplificado (AFLP), Sequenciamento, possibilitando um rápido acúmulo de informações sobre a estrutura de genomas eucariotos e a técnica de Microsatélite (Martins, 2006, Ferreira e Grattapaglia, 1998).

Com a descoberta do DNA mitocondrial (DNA mt) como marcador molecular em 1970, e mais recentemente o desenvolvimento da reação em cadeia da DNA polimerase

(PCR), houve um grande impacto nos estudos de biologia molecular e genética de populações, especialmente no campo da biologia evolutiva animal (Zhang e Hewitt, 1996). Podendo ser utilizado por diversas técnicas, o marcador molecular é todo fenótipo molecular procedente de um gene expresso ou de um segmento específico de DNA (Ferreira e Grattapaglia, 1998).

A reação em cadeia da polimerase (PCR - “Polymerase Chain Reaction”) foi criada por Kary Mullis na década de 80. Trata-se de uma técnica eficiente em estudos genéticos, pela facilidade, agilidade e sensibilidade envolvendo grande número de indivíduos de qualquer organismo vivo, sendo capaz de amplificar milhares de cópias de um segmento específico de DNA na presença da enzima DNA polimerase (Castiglioni e Bicudo, 2003). Com isso, diversas ferramentas moleculares baseadas em PCR estão sendo disponibilizadas para auxiliar nos estudos genéticos de populações de diferentes espécies (Regitano e Coutinho, 2001).

Na técnica de PCR, a amplificação de DNA ocorre em um termociclador, que possui a função de variar a temperatura nas etapas de desnaturação, anelamento e extensão, sendo capaz de amplificar sequências a partir de quantidades mínimas de DNA-alvo. Com a técnica de eletroforese é possível verificar a separação do DNA devido a sua migração do pólo negativo para o pólo positivo em uma matriz tamponada por ação de uma corrente elétrica, com diferentes velocidades, dependendo do seu tamanho e forma, sendo facilmente visualizado na presença de compostos intercalantes, onde o mesmo emite fluorescência por exposição à luz UV (Koch e Andrade, 2008).

Com os avanços tecnológicos e laboratoriais, surgiu o sequenciamento automático de DNA, sendo possível obter resultados rápidos, com menores custos, com uma grande produção de sequências de ácidos nucleicos, proteínas. Alia-se a isso a necessidade de se criar um banco de dados para armazenar tais informações, surgindo o GenBank, que faz parte do International Nucleotide Sequence Database Collaboration, DNA DataBank of Japan (DDBJ), e o European Molecular Biology Laboratory (EMBL), para armazenar as sequências (Pereira, 2006).

1.3. Associação de espécies de *Trichogramma* com bactérias do gênero *Wolbachia*

Bactérias do gênero *Wolbachia* foram detectadas primeiramente em ovários do mosquito *Culex pipiens* Linnaeus, 1758 (Diptera: Culicidae) (Hertig e Wolbach, 1924). Pertencentes à classe das Alphaproteobactérias, ordem Rickettsiales e família Anaplasmataceae (Merçot e Poinot, 2009), são bactérias intracelulares, sendo herdadas maternalmente, registradas na maioria dos artrópodes, nos quais induz a morte de machos, a feminização, a incompatibilidade citoplasmática e a partenogênese (Martins et al., 2007). Foram detectadas em diferentes espécies de invertebrados, com maior número de relatos entre os artrópodes como os insetos, os aracnídeos, os crustáceos os isópodes e nematóides (Marcon, 2009), com uma estimativa para infectar entre 17-76% de todas as espécies de insetos (Huigens et al., 2004).

O gênero *Wolbachia* está classificado em oito supergrupos taxonômicos de A a H, sendo os supergrupos A e B comumente detectados em insetos. Os supergrupos C e D são encontrados em nematóides; o supergrupo E é característico de Collembola; o supergrupo F é encontrado em nematóides, sendo recentemente detectado em artrópodes; o G detectado em aranhas australianas e o H em Isoptera (Marcon, 2009). A transmissão de espécies do gênero *Wolbachia* ocorre de forma vertical através do citoplasma dos ovos maternos infectados; porém, este mecanismo não explica a sua ampla distribuição entre os invertebrados e, a partir disto, foi sugerido a existência de transferência horizontal dessas espécies entre diferentes grupos (Marcon, 2009).

Grenier et al. (1998) verificaram a primeira transferência horizontal bem sucedida de bactérias do gênero *Wolbachia* entre duas espécies de *Trichogramma*. Huigens et al. (2000) relataram a transmissão horizontal natural de bactérias do gênero *Wolbachia* entre larvas de vespas infectadas com larvas não infectadas, compartilhando uma fonte de alimento comum. Almeida (2004) fez o primeiro relato de transferência horizontal interespecífica e intraespecífica natural de bactéria do gênero *Wolbachia* induzindo partenogênese entre espécies de *Trichogramma*, sendo a transferência horizontal intraespecífica foi bem mais sucedida que a transferência iterespecífica.

Em várias espécies de parasitóides, a telitoquia é causada por protobactérias do gênero *Wolbachia* conhecidas por induzirem partenogênese em espécies de *Trichogramma* (Stouthamer et al., 1993; Pinto e Stouthamer, 1994, Almeida et al., 2010). Esta descoberta foi de grande importância para o controle biológico, visto que a reprodução apenas por telitoquia apresenta algumas vantagens: o crescimento mais rápido da população telítoca, a redução dos custos de produção, não há produção de machos, fácil estabelecimento no campo, dada a não necessidade de cópula, além de reproduzir-se eficientemente em baixa densidade de hospedeiro (Ciociola Jr. et al., 2001). Segundo ainda este autor, para constatar a presença de espécies de *Wolbachia* em parasitóides, dissecam-se os ovos do hospedeiro recém-parasitados e utilizam-se corantes para facilitar a visualização ou através de métodos moleculares utilizando primers específicos para a amplificação do DNA dessa α -proteobactéria.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

- Realizar estudos moleculares com espécies do gênero *Trichogramma* e com seu endossimbionte do gênero *Wolbachia*.

2.2. Objetivos Específicos

- Identificar espécies do gênero *Trichogramma* mediante o sequenciamento da região ITS2 do DNA ribossomal;
- Estimar o grau de diferenciação genética entre as populações de *Trichogramma pretiosum*;
- Detectar a bactéria do gênero *Wolbachia* em populações de *Trichogramma pretiosum*, mediante o uso de primer específico.

3. HIPÓTESES

- O sequenciamento da região ITS-2 do DNA ribossomal é eficiente na identificação das espécies de *Trichogramma* estudadas.
- As populações de *Trichogramma pretiosum* coletadas em diferentes regiões brasileiras, não se diferenciam geneticamente entre si.
- Espécies de *Trichogramma pretiosum* coletadas em diferentes regiões do Brasil estão associadas à bactérias do gênero *Wolbachia*.

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA, RP de. e STOUTHAMER, R., 2003. Molecular identification of *Trichogramma cacoeciae* Marchal (Hymenoptera: Trichogrammatidae): A new record for Peru. *Neotropical Entomology*, vol. 32, p. 269-272.

ALMEIDA, RP de., 2004. *Trichogramma* and its relationship with *Wolbachia*: identification of *Trichogramma* species, phylogeny, transfer and costs of *Wolbachia* symbionts. The Netherlands: Wageningen University. Tese de doutorado, p. 142.

ALMEIDA, RP. de., VAN LENTEREN, JC. e STOUTHAMER, R., 2010. Does *Wolbachia* infection affect *Trichogramma atopovirilia* behaviour? *Brazilian Journal. Biology*, vol. 70, n. 2, p. 435-442.

BARTLETT, AC., 1984. Genetic changes during insectdomestication. New Orleans: USDA/ARS, cap. 1, p. 2-8.

BARTLETT, AC., 1985. Guidelines for genetic diversity in laboratory colony establishment and maintenance. In: SINGH, P., MOORE, RF. (eds). Handbook of insect rearing. Amsterdam : Elsevier, vol.1, Cap.2, p.7-17.

BERKELHAMER, RC., 1983. Intraspecific genetic variation and haplodiploidy, eusociality, and polygyny in the Hymenoptera. *Evolution* vol. 37, p. 540-545.

BLEICHER, E. e PARRA, JRP., 1989. Espécies de *Trichogramma* parasitóides de *Alabama argillacea*. I. Biologia de três populações. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, vol. 24, p. 929-940.

BORASCHI, D. e DEL LAMA, MA., 2004. Populational genetic structure and sociogenetic structure of cocoon masses of *Digelasinus diversipes* Kirby, 1882 (Hymenoptera: Symphyta: Argidae). *Molecular Biology of the Gene*, vol. 27, p. 385-340.

BORBA, RS da., GARCIA, MS., KOVALESKI, A., OLIVEIRA, AC., ZIMMER, PD., BRANCO, JSC. e MALONE, G., 2005. Dissimilaridade genética de linhagens de *Trichogramma* Westwood (Hymenoptera: Trichogrammatidae) através de marcadores moleculares ISSR. *Neotropical Entomology*, vol. 34, p. 565-569.

CALVIN, DD., KNAPP, MC., WELCH, SM., POSTON, FL., ELZINGA, RJ., 1984. Impact of environmental factors on *Trichogramma pretiosum* reared on southwestern corn borer eggs. *Environmental Entomology*, vol.13, n.3, p.774-780.

- CASTIGLIONI, L., BICUDO, HEMC., 2003. A Técnica de RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) e suas aplicações para estudos em genética molecular. *Revista UNORP*, vol. 3, p. 63-77.
- CIOCIOLA-JUNIOR, AI., ZUCCHI, RA. e STOUTHAMER, R., 2001. Molecular key to seven Brazilian species of *Trichogramma* (Hymenoptera: Trichogrammatidae) using sequences of the ITS2 region and restriction analysis. *Neotropical Entomology*, vol.30, p.259-262.
- CONSOLI, FL., PARRA, JRP. e ZUCCHI, RA., 2010. Egg parasitoids in agroecosystems with emphasis on *Trichogramma*. 1 edição, New York: *Springer*, vol. 1. p. 479.
- CONSOLI, FL. e PARRA, JRP., 1996. Biology of *Trichogramma galloi* and *T. pretiosum* (Hymenoptera: Trichogrammatidae) reared in vitro and in vivo. *Annals of the Entomological Society of America*, vol. 89, p. 828-834.
- CONSOLI, FL., ROSSI, MM. e PARRA, JRP., 1999. Developmental time and characteristics of the immature stages of *Thichogramma galloi* and *T. pretiosum* (Hymenoptera: Trichogrammatidae). *Revista Brasileira de Entomologia*, vol. 43, p.271-275.
- FERREIRA, ME. e GATTAPAGLIA, D., 1998. Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética. 2 edição. Brasília: Embrapa - Cenargen, p.220.
- GRAUR, D., 1985. Gene diversity in Hymenoptera. *Evolution*, vol. 39, p. 190-199.
- GRENIER, S., PINTUREAU, B., HEDDI, A., LASSABLIERE, F., JAGER, C., LOUIS, C. e KHATCHADOURIAN, C., 1998. Successful horizontal transfer of *Wolbachia* symbionts between *Trichogramma* wasps. *Proceedings of the Royal Society Biological*, vol. 265, p. 1441-1445.
- GUSEV, GV. e LEBDEV, G I., 1988. Present state of *Trichogramma* application and research. In: International Symposium on Trichogramma and Other Egg Parasitoids, Guangzhou, Paris, *INRA*, p. 477-481.
- HARRISON, WW., KING, EG. e OUZTS, JD., 1985. Development of *Trichogramma exiguum* e *T. pretiosum* ot five temperature regimes. *Environmental Entomology*, vol. 14, n.2, p. 118 -121.
- HERTIG, M. e WOLBACH, SB., 1924. Studies on *Rickettsia*-like microorganisms in insect. *Journal Medical Research.*, vol. 44, p.329-374.
- HUIGENS, ME., LUCK, RF., KLAASSEN, RHG., MAAA, MFPM., TIMMERMANS, MJTN. e Stouthamer, R., 2000. Infectious parthenogenesis. *Nature* vol. 6782, p. 178-179.
- HUIGENS, ME., ALMEIDA, RP de., BOONS, PAH., LUCK, RF. e STOUTHAMER, R., 2004. Natural interspecific and intraspecific horizontal *Wolbachia* transfer of

parthenogenesis-inducing in *Trichogramma* wasps. *Proceedings of the Royal Society Biological*, vol. 271, p. 509-515.

JOSLYN, DJ., 1984. Maintenance of genetic variability in reared insects. US Department of Agriculture Handbook, cap. 2, p. 20-29.

KOCH, A. e ANDRADE, F., 2008. A utilização de técnicas de biologia molecular na genética forense: uma revisão. *Revista Brasileira de Análises Clínicas*, vol. 40, p. 17-23.

MARCON, HS., 2009. Identificação da bactéria endossimbionte *Wolbachia* em populações de moscas-das-frutas do complexo *Anastrepha fraterculus* (Díptera: Tephritidae) Botucatu: Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências. Dissertação de Mestrado.

MARTINS, C., BUENO, OC e MARTINS, VG., 2007. Detecção de *Wolbachia* em operárias de lava-pés, *Solenopsis* via PCR com o primer específico WSP. *Biológico*, vol. 69, p.413-414.

MARTINS, WFS., 2006. Diversidade genética de populações naturais de *Anthonomus grandis* Boheman (Coleoptera: Curculionidae). Recife: Universidade Federal de Pernambuco. Dissertação de mestrado, p.74.

MERÇOT, H. e POINSOT, D., 2009. Infection by *Wolbachia*: from passengers to residents. *Comptes Rendus Biologies*, vol. 332, p. 284-297.

NAGARKATTI, S. e NAGARAJA, H. 1971. Redescriptions of some know species of *Trichogramma* (Hymenoptera: Trichogrammatidae) showing the importance of the male genitalia as a diagnostic character. *Bulletin of Entomological Research*, vol. 61, p. 13-31.

OLIVEIRA, CM., FUNGARO, MFP., CAMARGO, LEA e LOPES, JRS., 2002. Análise comparativa da estabilidade do DNA de *Dalbulus maidis* (DeLong & Wolcott) (Hemiptera: Cicadellidae) sob diferentes métodos de preservação para uso em RAPD-PCR. *Neotropical Entomology*, vol. 31, p. 225-231.

PACKER, L. e OWEN, RE., 2001. Polulation genetic aspects of pollinator decline. *Conservation Ecology*, vol. 5. [online] URL: <http://www.consecol.org/vol5/iss1/art4/>

PEREIRA, JOP., 2006. Diversidade genética da abelha sem ferrão *Melipona* das regiões ITS-1 parcial e 18S do DNA ribossômico nuclear. Universidade Federal do Ceará, Fortaleza. Tese de Doutorado, p. 142.

PINTO, JD., 1999. Systematics of the north american species of *Trichogramma* Westwood (Hymenoptera: Trichogrammatidae). Washington, *Entomological Society of Washington*, p. 287.

PINTO, JD. e STOUTHAMER, R., 1994. Systematics of the Trichogrammatidae with emphasis on *Trichogramma*, p.1-36. In WAJNBERG, E. e HASSAN, SA. (eds.), *Biological control with egg parasitoids*. Wallingford, CAB International, p. 286.

- PRATISSOLI, D. e PARRA, JRP., 2000. Desenvolvimento e exigências térmicas de *Trichogramma pretiosum* Riley, criados em duas traças do tomateiro. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, vol.35, p.1281-1288.
- QUERINO, RB. e ZUCCHI, RA., 2003. New species of *Trichogramma* Westwood (Hymenoptera: Trichogrammatidae) associated with lepidopterous eggs in Brazil. *Zootaxa*, vol. 163, p.1-10.
- REGITANO, LCA. e COUTINHO, LL., 2001. Introdução à análise de marcadores moleculares. *Biologia molecular aplicada à produção animal*. Brasília: Editora da EMBRAPA, p.11-25.
- SCHLOTTERER, C., 2004. The evolution of molecular markers - just a matter of fashion? *Nature Reviews Genetics*, vol. 5, p. 63-69. [online] URL: <http://www.nature.com/nrg/journal/v5/n1/full/nrg1249.html>
- SILVA, AF., 2007. Seleção, biologia e exigências térmicas de *Trichogramma* sp. Criados em ovos de *Diaphania nitidalis* Cramer (Lepidoptera: Pyralidae). Universidade Federal do Espírito Santo. Alegre. Dissertação de Mestrado, p.58.
- STEIN, C. e PARRA, JRP., 1987. Aspectos biológicos de *Trichogramma* sp. em diferentes hospedeiros. *Anais da Sociedade Entomológica do Brasil*, vol.6, n.6, p.163-171.
- STOUTHAMER, R., PINTO, JD., PLATNER, GR. e LUCK, RF., 1990. Taxonomic status of thelytokous forms of *Trichogramma* (Hymenoptera: Trichogrammatidae). *Annual Entomology Society of America*, vol. 83, p. 475-581.
- STOUTHAMER, R., BREEUWER, JAJ., LUCK, R F e WERREN, J H., 1993. Molecular identification associated with parthenogenesis. *Nature*, vol. 361, p. 66-68.
- VILARINHO, KR., 2007. Análise da variabilidade genética de populações de *Anthonomus grandis* (Coleoptera: Curculionidae), na cultura do algodoeiro. Universidade de Brasília, Brasília. Dissertação de Mestrado. p. 120.
- ZHANG, DX. e HEWITT, GM., 1996. Nuclear integrations: challenges for mitochondrial DNA markers. *Trends in Ecology and Evolution*, vol.11, p. 247-251.

5. CAPÍTULO I

Identificação Molecular de Espécies de *Trichogramma* (Hymenoptera: Trichogrammatidae), Utilizando o Sequenciamento da Região ITS2 do DNA Ribossomal

5.1. Resumo

A partir da utilização de indivíduos fêmeas na identificação específica de *Trichogramma* via técnicas moleculares, a taxonomia teve um grande avanço, possibilitando resolver alguns casos a exemplos das populações telítocas (produção exclusiva de fêmeas) ou de fatores genéticos desconhecidos (*T. cacoeciae*). Este fato auxiliou grandemente a sistemática tradicional, onde a identificação se baseia exclusivamente nos caracteres morfológicos de insetos machos. Este trabalho aborda esses procedimentos e propõe a identificação de espécies de *Trichogramma* (Hymenoptera) por meio da técnica de PCR e sequenciamento da região ITS2 do DNA ribossomal. Após a extração do DNA, realizou-se reações de PCR, utilizando o primer direto ITS-2- 5' TGTGAACTGCAGGACACATG-3' e o reverso IT2-5' GTCTTGCCTGCTCTGCTCTGAG.-3'. As amostras amplificadas obtidas dos produtos de PCR foram submetidas ao sequenciamento para a confirmação das espécies no banco de dados do GenBank (NCBI – National Center for Biotechnology Information). Foi possível extrair DNA de todas as espécies de *Trichogramma*, com quantidades e qualidades suficientes para obter perfis eletroforéticos, com concentrações de DNA genômico variando entre 15,3 e 50 ng/μl. Por meio da técnica de PCR, os fragmentos da região ITS2 do DNA ribossomal foram amplificados. Foram obtidas as sequências das espécies *T. exigum*, *T. pretiosum* e *galloi* e, a partir dessas sequências foi realizada a busca por similaridade utilizando o programa BLAST no banco de dados do GenBank. Foi feita análise de dendrograma de acordo com a matriz de distância genética, resultando em três grupos formados por cada umas das espécies sequenciadas. Com isto pode-se concluir que a utilização do sequenciamento da região ITS2 do DNA ribossomal foi eficiente na diferenciação das espécies crípticas de *Trichogramma* estudadas, sugerindo uma variação acentuada inter-específica entre as espécies.

Palavras-chave: Sistemática molecular, microhimenóptero, parasitóide.

5.2.

Abstract

From the use of female individuals in the specific identification of *Trichogramma* via molecular techniques, taxonomy had a large advance making it possible to solve some cases for instance, in thelytokous populations (exclusive female production) or from unknown genetics factors (*T. cacociae*). This fact greatly helped the traditional systematic, where identification is based exclusively on morphological characters of the male insects. This work discusses these procedures and proposes the identification of *Trichogramma* (Hymenoptera) species using PCR and sequencing of the ITS2 region of ribosomal DNA. After DNA extraction, PCR reactions were carried out using the forward primer ITS-2- 5' TGTGAACTGCAGGACACATG-IT2-5' and the reverse IT2-5' GTCTTGCCTGCTCTGCTCTGAG.-3'. The amplifications of the PCR products obtained were submitted to sequencing to confirm the species in the GenBank database (NCBI – National Center for Biotechnology Information). It was possible to extract DNA from all species of *Trichogramma*, with quantities and qualities sufficient for obtaining electrophoretic profiles, with concentrations of genomic DNA varying between 15.3 and 50 ng / μ l. By means of the PCR technique, the fragments from the ITS2 region of the ribosomal DNA were amplified. *T. exiguum*, *T. pretiosum* and *T. galloi* sequences were obtained and from these sequences the search for similarity was done using the BLAST program in the GenBank database. A dendrogram analysis was performed according to the genetic distance matrix, resulting in three different groups formed by each of the sequenced species. This allowed the conclusion that the use of sequencing of the ITS2 region of ribosomal DNA was efficient in the differentiation of the sibling *Trichogramma* species studied, suggesting a strong inter-specific variation among the species.

Keywords: Molecular systematics, microhymenoptera, parasitoid.

5.3. Introdução

A utilização de espécies de *Trichogramma* no controle biológico iniciou-se com Flanders (1930), com os trabalhos sobre multiplicação massal de *Trichogramma* spp. em ovos de *Sitotroga cerealella* Olivier, 1789 (Lepidoptera: Gelechiidae), técnica que se dispersou rapidamente em diversos países (Navarro, 1998).

Na América do Sul, a utilização de espécies de *Trichogramma* ainda é limitada, devido principalmente, ao alto custo na produção comercial dos parasitoides e ao uso intensivo de inseticidas. Mesmo assim, a área estimada com a utilização desses parasitoides é de 1,2 milhões de hectares. A Colômbia se destaca com uma área com liberação periódica de aproximadamente 200.000 hectares. No Brasil, esse parasitóide tem sido utilizado em algodoeiro, cana-de-açúcar, hortaliças, milho, soja e tomateiro (Rodrigues e Sampaio, 2011).

Devido a importância de sua utilização, para se ter sucesso em um programa de controle biológico com espécies de *Trichogramma*, é imprescindível a correta identificação, para que seja possível verificar se elas responderão as condições climáticas da região e da cultura que serão aplicadas (Borba et al., 2005).

Sendo assim, a descoberta da genitália do macho, como caráter na identificação de espécies de *Trichogramma*, foi um grande avanço na taxonomia desses parasitoides utilizando caracteres morfológicos (Pinto e Stouthamer, 1994). No entanto, a ocorrência de espécies crípticas e da variação intraespecífica são dois dos fatores que dificultam a taxonomia, além da dificuldade de observação dos caracteres morfológicos, devido ao tamanho reduzido do adulto (Noyes, 2003).

Um método mais recente, a biologia molecular, vem sendo bastante utilizada na identificação taxonômica de diversos grupos de insetos (Borba et al., 2005). Em estudos recentes tem-se utilizado a região do espaço transcrito interno ITS2 em sequenciamento de DNA para identificação das espécies de *Trichogramma*, na diferenciação das populações, bem como, para a reconstrução filogenética das relações entre espécies estreitamente relacionadas, esse método de identificação vem ganhando recente importância no estudo

de espécies crípticas de *Trichogramma*, onde a reação em cadeia da polimerase é usada para amplificar esses espaçadores ITS, via primers universais que se ligam nas regiões altamente conservadas, sendo possível obter o sequenciamento e com isso, a descrição da espécie (Samara et al., 2008, Sumer et al., 2009).

Espécies particularmente de difícil identificação com o emprego das técnicas taxonômicas tradicionais podem ter suas identidades esclarecidas mediante o emprego de técnicas moleculares do sequenciamento ou do polimorfismo do comprimento de seqüências geradas através das técnicas de marcadores moleculares (Borba et al., 2005).

Com isto, os dados moleculares representam uma alternativa valiosa para a taxonomia de *Trichogramma*, visto que muitos insucessos nos programas de controle biológico com *Trichogramma* foram devidos, em parte, à identificação incorreta das espécies (Querino e Zucchi, 2003). Sendo assim, este trabalho teve como objetivo identificar as espécies de *Trichogramma* mediante a utilização da técnica de PCR e sequenciamento da região ITS-2 do DNA ribossomal.

5.4. Material e Métodos

5.4.1. Obtenção das amostras de espécies de *Trichogramma*

Na tabela 1, são apresentadas as espécies de *Trichogramma* obtidas para este estudo, previamente identificadas com base nos caracteres morfológicos, as siglas das amostras e as respectivas origens.

Tabela 1. Espécies de *Trichogramma*, amostra e origem

Espécie	Amostra	Origem
<i>T. acacioi</i> Morais e Soares, 1984	Tac	Botucatu, SP
<i>T. atopovirilia</i> Oatman e platner, 1983	Tat	Alegre, ES
<i>T. exigum</i> Pinto e Platner, 1983	Te	Alegre, ES
<i>T. galloi</i> Zucchi, 1988	T g	Dourados, MS
<i>T. rojasi</i> Nagaraja e Nagarkatti, 1973	Tro	Curitiba, PR
<i>T. maxacalli</i> Voegelé e Pointel, 1980	Tm	São Paulo, SP
<i>T. pretiosum</i> Riley, 1879	Tp	Primavera do Leste, MT

5.4.2. Extração do DNA genômico

O DNA genômico do inseto para cada amostra foi extraído macerando-se cinco indivíduos da mesma espécie em tubos tipo eppendorf, juntamente com 100 µl de Resina Chelex (5%) e 4 µl de proteinase K, incubados a 56°C por 4h em banho-aquecido e após 10 minutos a uma temperatura de 95°C. Esta solução tornou-se o estoque de DNA genômico dos insetos, sendo em seguida armazenados em freezer a 0°C (Almeida, 2004).

A integridade e qualidade do DNA genômico extraído foram analisadas em espectrofotômetro (NANODROP® Thermo Scientific 2000), visto que o equipamento fornece a quantidade de DNA em ng/µL e a razão de duas densidades óticas de leitura (260/280 nm) para verificação do nível de pureza da amostra.

5.4.3. Amplificação da região ITS2 do DNA ribossomal por reação em cadeia da DNA polimerase (PCR) e Eletroforese

As reações de amplificações do gene ITS2 foram realizadas por PCR utilizando-se como substrato o DNA genômico previamente isolado e primers específicos (Tabela 2)

Tabela 2. Primers específicos utilizados nas reações de PCR (Stouthamer et al., 1999)

Primers	Sequência
ITS - 2 - F	TGTGAACTGCAGGACACATG (5' → 3')
ITS - 2 - R	GTCTTGCCCTGCTCTGCTCTGAG (3' → 5')

Em um tubo tipo eppendorf foram misturados os componentes nos volumes especificados, onde a quantidade de água ultrapura variou de acordo com a quantidade de DNA da amostra (Tabela 3). Na reação de PCR foi utilizado um controle negativo sem DNA e o restante dos componentes.

Tabela 3. Componentes e volumes utilizados na preparação das reações de PCR

Constituintes da reação de PCR	Volume utilizado
Tampão de reação 10X	5 µl
dNTP's	1 µl
Primer Forward	1 µl
Primer Reverse	1 µl
DNA genômico	3-7 µl
H ₂ O miliq	30,75 µl – 34,75 µl
Taq DNA polimerase	0,25 µl
MgCl ₂	4 µl
Volume Final	50 µl

As amplificações foram realizadas com volume final da reação de 50 µl em um termociclador programado para 3 min a 94° C, seguido por 33 ciclos de 40 seg a 94° C, 45

seg a 53° C e 45 seg a 72° C, com extensão final de 5 min a 72° C. Após a extensão final, as amostras permaneceram estocadas a 4⁰C no termociclador até que fossem armazenadas em freezer a 0⁰C (Almeida, 2004).

5.4.4. Eletroforese

Para a análise do produto da reação, uma alíquota de 20 µl foi removida e submetida à eletroforese em gel de agarose 0,8% no tampão TAE (Tris-Acetato-EDTA), com corrida eletroforética realizada a uma voltagem constante de 100V/75, corado com brometo de etídio por 20 min, sendo visualizado em um transiluminador. Para determinação do tamanho dos produtos de PCR foi utilizado um marcador de peso molecular de 100 pb (Promega, Estados Unidos da América)

5.4.5. Purificação dos fragmentos de DNA ribossomal

Os fragmentos do produto de PCR amplificados correspondentes a 500 pb foram cortados do gel com o auxílio de um bisturi e purificados com o Kit de purificação (DNA Gel Extraction Kit – (Fermentas, EUA) de acordo com o protocolo proposto pelo fabricante, para que fosse possível obter quantidade e qualidade de DNA suficientes para o sequenciamento.

5.4.6. Sequenciamento

5.4.6.1. PCR para o sequenciamento da região ITS2 do DNA ribossomal

As reações de sequenciamento foram realizadas em duplicatas e inseridas em microplacas de 96 poços, utilizando o Kit DNA Sequencing - Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready ABI Prism, versão 3, (Applied Biosystems, EUA), nas quais foram utilizados os mesmos primers ITS-2 R (Tabela 4).

Tabela 4. Reagentes utilizados na reação de PCR de sequenciamento

Reagentes	Concentração	Concentração	Volume Final (10ul)
	Estoque	Final	
Big Dye	5 X	1 X	2 µl
Tampão	5 X	1 X	1 µl
Primer R	10 p moles	0,4 p moles	1 µl
DNA	100 ng	10 ng	5 µl
Água MilliQ	-	-	1 µl

As amostras do produto de PCR foram inseridas em termociclador (Gene Amp PCR System 9700 Applied Biosystems, EUA) utilizando a termociclagem específica (96°C/10 seg- 53°C/ 20 seg – 60°C/1 min), as amostras permaneceram a 4°C até serem retiradas para o sequenciamento.

5.4.6.2. Precipitação da PCR para o sequenciamento da região ITS2 do DNA ribossomal

Após a amplificação, adicionaram-se as amostras 80 µl de isopropanol (75%), sendo deixadas em repouso por 15 min a temperatura ambiente e posteriormente centrifugadas a 1300 x g por 60 min. Após centrifugação o sobrenadante foi descartado, as placas permaneceram invertidas por 5 min em papel absorvente. Acrescentaram-se 150 µl de etanol (70%), novamente centrifugadas a 1300 xg por 15 min. Em seguida, o sobrenadante foi descartado e as placas colocadas em capela de fluxo laminar por cerca de 1 h protegidas da luz. Em seguida as amostras foram ressuspensas com 10 µl de Hi - Di formamida, aquecidas por 5 min a 95°C no termociclador, esfriadas no gelo e submetidas ao sequenciamento utilizando o sequenciador ABI Prism® 3100 Genetic Analyses (Applied Biosystems, EUA).

5.4.7. Alinhamento das sequências

As seqüências obtidas foram submetidas à busca por similaridade no GenBank (NCBI – National Center for Biotechnology Information), por meio do programa BLAST

(Altschul et al., 1990), visando-se determinar a similaridade com sequências já depositadas no referido banco de dados. O alinhamento múltiplo das sequências foi realizado com o auxílio do programa CLUSTALX, versão 2.0 (Larkin et al., 2007).

5.5. Resultados e Discussão

5.5.1. Extração do DNA genômico

Foi possível extrair DNA de sete espécies de *Trichogramma* que ocorrem no Brasil, com quantidades e qualidades de DNA suficientes para obter perfis eletroforéticos, com concentração do DNA genômico variando entre 15,3 e 50 ng/ μ l e grau de pureza das amostras (relação 260/280 nm) variando entre 1,34 e 2,07 (Tabela 5). Esses resultados corroboram com as informações de Adamkewicz et al. (1997) para esses autores, a viabilidade de estudos moleculares envolvendo ácidos nucleicos depende da qualidade e quantidade do DNA extraído, e a extração de DNA constitui um passo fundamental para obtenção de respostas moleculares confiáveis, já que os caracteres moleculares têm sido importantes ferramentas para resolução de problemas na sistemática moderna.

Tabela 5. Quantificação e pureza das amostras de DNA genômico de sete espécies de *Trichogramma*

Amostras	Quantificação de DNA (ng/uL)	Relação 260/280 nm
Tac	16,2	1,47
Tat	50,0	2,07
Te	30,3	1,56
T g	49,7	1,42
Tro	41,1	1,73
Tm	15,3	1,34
Tp	47,8	1,75

Assim, nas análises moleculares é necessário que se tenha DNA de boa qualidade, ou seja, não fragmentado, onde a eficiência das análises são dependentes da qualidade e da quantidade do DNA extraído, devendo os insetos serem preservados a - 70°C ou - 80°C ou

em etanol a 70%, 95% ou 100% à temperatura ambiente (Grutzmacher et al., 2006), visto que as espécies de *Trichogramma* são bem menores em comparação com outros insetos, obtendo-se pouco DNA genômico (Samara et al., 2008).

5.5.2. Amplificação da região ITS2 do DNA ribossomal por reação em cadeia da DNA polimerase (PCR) e Eletroforese

Foram verificadas as amplificações dos fragmentos do produto de PCR da região ITS2 do DNA ribossomal das espécies *T. galloi*, *T. atopovirilia*, *T. rojasi*, *T. exigum*, *T. pretiosum*, *T. maxacalli* e *T. acacioi*, com fragmentos variando entre 500 pb e 600 pb aproximadamente (Figura 1).

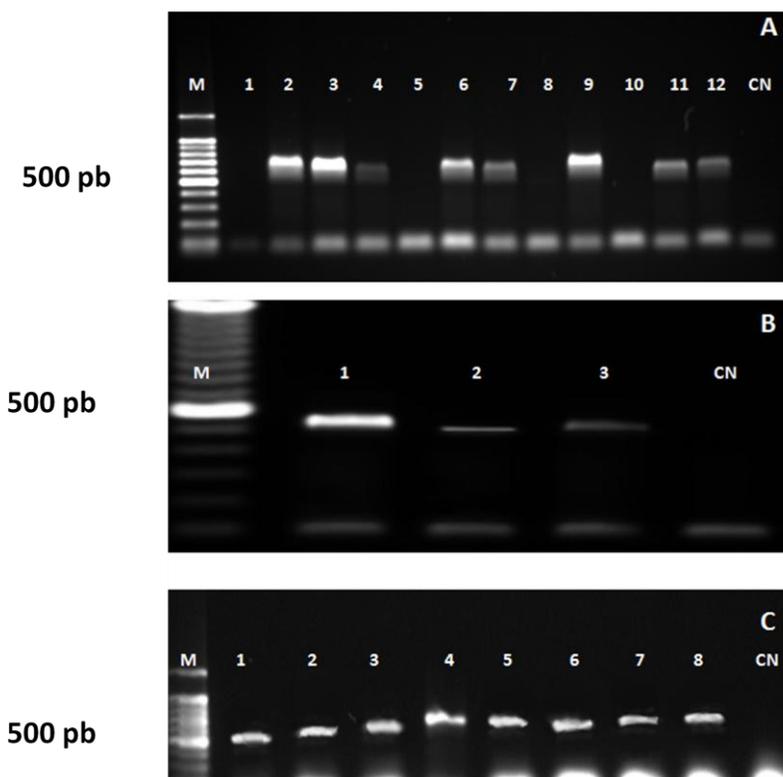


Figura 1. Geis de agarose 0,8% com produtos de PCR da região ITS2 do DNA ribossomal de espécies de *Trichogramma*. M representa o Marcador de peso molecular de 100 pb; CN controle negativo (sem DNA); A 2 e 3 - *T. atopovirilia*; 4, 6, 7, 11, 12, - *T. exigum*; 9 - *T. rojasi*; B - 1 - *T. galloi*; 2 - *T. maxacalli*; 3 - *T. pretiosum*; C - 1, 2, 3 - *T. acacioi*; 4, 5, 6, 7 e 8 - *T. atopovirilia*.

Padrões similares de ampliações foram obtidos por Ciociola Jr. et al. (2001a) que, utilizando a região ITS2, identificaram as espécies *T. pretiosum*, *T. galloi*, *T. lasallei*, *T. rojasi* e *T. acacioi*, coletadas no Brasil, sendo o padrão de amplificação dessas espécies de 522, 556, 556, 566 e 639 pb respectivamente, e por España-Luna et al. (2008), que identificaram no México as espécies de *T. exigum*, *T. pretiosum* e *T. atopovirilia* com produtos de PCR da região ITS2 do DNA ribossomal amplificados com 493 pb, 520 pb e 669 pb respectivamente. A vantagem dessa técnica sobre a técnica de RAPD, se deve a necessidade de poucos indivíduos para a extração de DNA, e se utilizar primers específicos para a identificação a nível de espécies.

Outros autores perceberam a vantagem da utilização da região ITS2 do DNA ribossomal na identificação de espécies, e empregaram para a identificação de *Trichogramma*, como por exemplo, Silva et al. (1999) que diferenciaram cinco espécies coletadas em plantações de tomate, Chang et al. (2001) separaram *Trichogramma ostrinia* Pang e Chen, 1917 (Hymenoptera: Trichogrammatidae) e *Trichogramma chilonis* Ishii, 1941 (Hymenoptera: Trichogrammatidae) e Ciociola Jr. et al. (2001b) que diferiram *T. rojasi* de *T. lasallei*, ambas provenientes do Brasil.

5.5.3. Purificação do produto de PCR amplificado

As amostras de DNA das espécies de *Trichogramma*, contendo os fragmentos do produto de PCR amplificado, foram purificadas tendo sido possível obter quantidades suficientes das sete amostras estudadas. Porém com relação à qualidade do DNA, ou seja, amostras livres de contaminantes, apenas as amostras referentes às espécies *T. galloi*, *T. exiguum* obtiveram leituras aceitáveis de absorbâncias 260/280 (nm) acima de (1,6 nm) (Tabela 6).

Tabela 6. Quantificação de DNA e grau de pureza dos produtos de PCR purificados de espécies de *Trichogramma*

Amostras	Quantificação de DNA	Relação
	(ng/uL)	260/280 (nm)
Tac	20,2	1,33
Tat	18,5	1,31
Te	28,0	1,65
Tg	30,8	1,72
Tro	20,3	1,47
Tm	148,5	1,43
Tp	23,8	1,51

De acordo com Barbosa (1998) um DNA puro tem relação 260/280 nm de 1,8 a 2,0, e uma razão de 1,6 ou menos indica que deve haver proteínas e/ou outras substâncias em demasia na amostra, enquanto a razão maior que 2,0 indica que as amostras devem estar contaminadas com clorofórmio ou fenol, situações em que é aconselhável reprecipitar o DNA.

5.5.4. Sequências consenso da região ITS2 do DNA ribossomal

O sequenciamento das espécies de *Trichogramma* utilizando-se a região ITS2 do DNA ribossomal foi realizado visando-se à identificação das sequências de nucleotídeos e confirmação das espécies estudadas. Das oito espécies submetidas ao sequenciamento, três apresentaram alta qualidade de sequenciamento. Com os resultados da busca por similaridades, por meio da ferramenta BLAST, no banco de dados do GenBank (NCBI - National Center for Biotechnology Information), foi possível verificar que todas elas correspondem às regiões desejadas, compatíveis com as sequências das espécies de *Trichogramma*, obtendo 95% de similaridade em *T. pretiosum* 91% em *T. galloi* e 92% em *T. exiguum* (Tabela 7). Este critério foi também utilizado por Espanã-Luna et al. (2008) utilizou as porcentagem de semelhança entre as sequências de ITS2 do DNA ribossomal, para a identificação de espécies de *Trichogramma*.

Os valores de *E value* obtidos de todas as sequências alinhadas com as sequências do banco de dados do GenBank apresentaram-se iguais e próximos de 0 (zero), o que indica uma menor probabilidade destas sequências terem sido obtidas por um mero acaso, confirmando o correto sequenciamento.

As amostras Tac, Tat, Tro e Tm, que não apresentaram uma boa qualidade de sequenciamento, purificação com razão entre as leituras das absorvâncias 260/280 (nm) bem abaixo do considerado (Tabela 6), sendo descartadas das análises.

Tabela 7. Identificação de três espécies de *Trichogramma*, através de comparação das sequências consensos obtidas com sequências do banco de dados do GenBank - NCBI.

Amostras	Primer	Número de Acesso	Máxima Identificação	BLAST Espécie
<i>T.pretiosum</i>	ITS-2- R	DQ525178.1	95%	<i>T.pretiosum</i>
<i>T. galloi</i>	ITS-2- R	AY182764.1	91%	<i>T.galloi</i>
<i>T. exiguum</i>	ITS-2- R	AY182769.1	92%	<i>T. exiguum</i>

Pesquisas semelhantes utilizando o sequenciamento da região ITS2 na identificação de espécies de *Trichogramma* foram realizadas por Orrego e Agudelo-Silva (1993); Sappal et al. (1995); Silva et al. (1999); Stouthamer et al. (1999); Ciociola Jr. et al. (2001a,b); Li e Shen (2002); Pinto et al. (2002); Thomson et al. (2003); Almeida (2004); Li et al. (2004); Davies et al. (2006); Honda et al. (2006); Kumar, et al. (2009); Jeong et al. (2010) e mais recentemente por Polaszek, et al. (2011), onde cada espécie foi tratada com detalhe, a fim de facilitar a identificação utilizando caracteres morfológicos ou moleculares ou uma combinação de ambos.

Segundo Dem Yanchuk et al. (2008) o método de sequenciamento da região ITS2 do DNA ribossomal pode ser proposto como uma ferramenta para certificação genética da espécie. Para Jeong et al. (2010) o polimorfismo de comprimento em sequências da região ITS2 entre espécies de *Trichogramma* varia entre 380 e 560 pb, com base em dados das sequências do Genbank. Entretanto, um maior número de estudos precisam ser realizados, com base no número de espécies existentes, para que a eficiência das comparações com as sequências do GenBank sejam ampliadas.

A utilização de sequências da região ITS2 do DNA ribossomal ajudam a resolver as limitações que existem na identificação morfológica de espécies de *Trichogramma* principalmente porque podem ser utilizados tanto os indivíduos machos quanto em fêmeas, independentemente das dificuldades em visualizar as minúsculas estruturas morfológicas (Pinto et al., 2002).

Segundo Kumar et al. (2009) os métodos moleculares estão destinados a substituir os métodos tradicionais morfológicos, quando grande número de espécies de *Trichogramma* forem identificadas. Por outro lado, segundo Almeida (2004) a identificação por combinação de caracteres morfológicos e técnicas moleculares será de extrema importância para uma análise sistemática bem sucedida desse grupo.

Para Silva et al. (1999) os métodos moleculares não substituem os métodos tradicionais baseados em identificação morfológica, no entanto, são ferramentas importantes para identificar quais espécies estão presentes em uma determinada área quando necessário complementar a outros métodos de identificação, sendo também úteis para determinar a possível contaminação ou mistura de espécies em laboratório, reprodução em massa e estudos de dispersão e avaliação de parasitóides lançados no campo ou nativa de uma região.

5.5.5. Alinhamento múltiplo das sequencias consensos

De acordo com os resultados do alinhamento múltiplo de todas as sequências consensos obtidas (Figura 2), foi possível verificar as diferenças entre as espécies de *T.pretiosum*, *T. galloi* e *T. exiguum*, no que se refere à presença ou ausência das bases nitrogenadas e sua distribuição na sequência. Uma pequena quantidade de gaps (espaços), foi necessária para alinhar as sequências das amostras; entretanto para as análises foram retiradas as extremidades 5' e 3' para uniformizar o tamanho das sequências.

```

T.exiguum      GGANAANGGGGGNCNGANGANAAGAAGATCATTTCGCAA-ATTCGAGGTGGCCAATG
T.pretiosum    -----GGGCAGCGATGAGAAAAAGACTCGTTGTTGTTGTTTCGAGCTAGCCAG-G
T.galloi       -----CGNGNGANGAGAAGAAGACTCATTCAACAAAATTTGACGAGCAAATT
                * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

```

```

T.exiguum      TGTGTG---TGTGTTTTTCTCTNCGCACGCGNGGGAACACATT-CTAGA--ACCGAATCA
T.pretiosum    CGC-----TATAATAAAATCCCCGAGAGCGCGNGNGCGCCTTTCTAGTGTACCGAATCA
T.galloi       TTTATATTATCCGACCTAGCCGTACAGCGCGCGCGCGCGGTTTCNATAACCGAATN-
                *           *           *** * * * * *           *           *
                *           *           *           *           *           *           *

T.exiguum      TGGGANGATTTCNGATCGTGTGCTAGAAAANGGTCCGCTGCTCGTTTATGAGGCGAGAAGC

T.pretiosum    TGGTACNAGCCTGATCGTGTACTGACAGTCGGTCCGCTGCTCG---ACGAGGCGAGAAGC
T.galloi       TNGGANGAGCNTGANCGTGTCTAGCAGTNGGTCCGNTGCTCG---ANGAGGCGAGAAGC
                * * * * *           ** * * * * *           *           * * * * * * * * * *

T.exiguum      TCCGGGACTCGA-CGCAGAACGATCGGAAGT----GCACGTTTTTNCAC----GAGCACT
T.pretiosum    TCCGGGACTCGAACGCAGAACGATCGGAAGTACTCGCGCGCTTTTACACACGTGAGTACT
T.galloi       TCNCGGACTCGA-CGCANTACGATCGGAAGTCTCGCGC-----TAAGC----GAGAACT
                ** * * * * * * * * * *           * * * * * * * * * *           * * * * *

T.exiguum      CTCCAAGNGNNAAGCGTGCGC--GCCAGCCAGACGAAGGA-ATTTTCATCTTTTTTCTTGC
T.pretiosum    CTCCAAGCGGTAAGCGCGCGC--GCCAGCCAGACGAACGCCAATTCATCTTTTCTTGC
T.galloi       CTCCAAGNGGTAAGCGCGCGCACGCCAGCTAGANAAANN--AATTCATCTTTTTTCTTGC
                * * * * * * * * * *           * * * * * * * * * *           * * * * *

T.exiguum      GTTTCGTTTGAGGCGACG--TATC-----CATCAACGCT-----C
T.pretiosum    GTTTCGTTTGAGGCGACG--TGTCGCA-----GCACACGCACACTGCTGCTATACT
T.galloi       GTTTCGTTTGAGGCGACG--TATC-----CATCAACGCT-----C
                * * * * * * * * * *           * * * * *

T.exiguum      T-----CGAGAGAGAGAGAGAT-----GGAG-----
T.pretiosum    C-----TGAGAGAGAGCAAGAGAT-----AGTGTGTGTGTGCGCGA
T.galloi       CGNACTACGTGAGTANTAGTGNAGAGAGAGAGATGTGCNNGAGANNAGAGAGAGAT
                * * * * * * * * * *           * *

T.exiguum      -ACGAGCGCCAGATCAACGCTCTTCTCTTGCAGAGAGCAGTCGGGTTTCGTTTTTATAA
T.pretiosum    CACGAGCGCCAGATCAACGCTCT-CTCTTGCAGAGAGCAGTCGGGTTTCGTTTTTATAA
T.galloi       CNCGAGCGCCANATNAACNCTCT----CTCGNAGAGCAGTNGGTTNNTTTTTATAA
                * * * * * * * * * *           * * * * * * * * * *

T.exiguum      ANNACCCTCAGNCAGGNGTGGTCCGGGGAACGAGATCCGNGGAACCGCAATGTGCGTTN
T.pretiosum    ACGACCCTCANCCAGG-CGTGGTCCGGG-AACNAGATCCGTGGA-CCGCAATGTGNTTTC
T.galloi       ANNACCCTCANNCNNG-NGTGGTCNNGG-AANGANATNNGNGGA-NCNNGTGTGNGTNN
                * * * * * * * * * *           * * * * * * * * * *

T.exiguum      NAAATGTCGATGTTTCATGTGCTCTGCATTTCAAAA
T.pretiosum    NAAATGNCGATGTTTCATGTGCTCTGCANTTCAAAA--
T.galloi       NANATGTNNATGTNNGTGTGT-----
                ** * * * *           * * * *           * * * *
    
```

Figura 2. Alinhamento múltiplo das sequências consensos da região ITS2 do DNA ribossomal de três espécies de *Trichogramma*: *T. exiguum*, *T. pretiosum* e *T. galloi*. O traço

indica espaço, (*) indica similaridade entre os nucleotídeos e N indica nucleotídeo não identificado.

Utilizando a matriz de distância genética (Tabela 8), pode-se verificar que as espécies mais distantes geneticamente foram *T. galloi* e *T. exiguum* com 0,238 e as mais próximas foram *T. exiguum* e *T. pretiosum* com distância genética de 0,189, sendo consideradas espécies crípticas.

Tabela 8. Matriz de distância genética da região ITS2 do DNA ribossomal para três espécies de *Trichogramma*

Espécies	<i>T. exiguum</i>	<i>T. galloi</i>	<i>T. pretiosum</i>
<i>T. exiguum</i>	0		
<i>T. galloi</i>	0,238	0	
<i>T. pretiosum</i>	0,189	0,215	0

De acordo com o dendrograma obtido a partir da matriz de distância genética pelo método do vizinho próximo (Neighbor-Joining), pode-se verificar a presença de três grupos: o primeiro, formado pela espécie *T. exiguum*; o segundo pela espécie *T. pretiosum*, e o terceiro, pela espécie *T. galloi* (Figura 3). Thomson et al. (2003) mencionaram que a região ITS2 é útil para identificar espécies de *Trichogramma*, porque a variação das sequências intra-espécie é relativamente pequena quando comparada com a variação inter-espécie e porque as espécies crípticas possuem variação suficiente da região ITS2 para serem distinguidas.

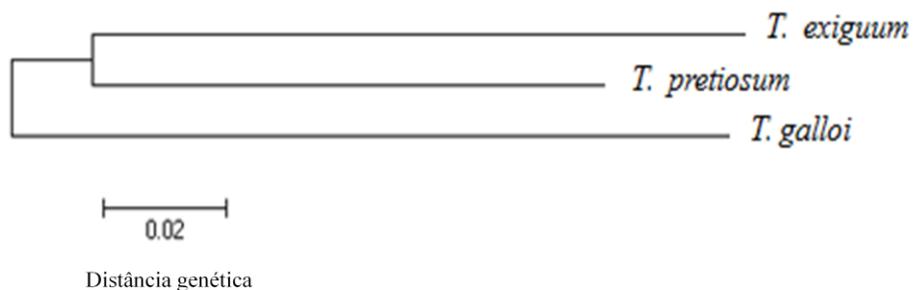


Figura 3. Dendrograma baseado nas análises das sequências de nucleotídeos da região ITS2 do DNA ribossomal de três espécies de *Trichogramma* a partir do método Neighbor-Joining.

5.6. Conclusões

1. A utilização do sequenciamento da região ITS2 do DNA ribossomal é eficiente na identificação e diferenciação das espécies de *T. pretiosum*, *T. exiguum* e *T.galloi*
2. As espécies *T. pretiosum*, *T. exiguum* e *T.galloi*, morfologicamente semelhantes, diferenciam geneticamente, apresentando alto grau de dissimilaridade.

5.7. Referências Bibliográficas

ADAMKEWICZ, SL., HARASEWYCH, MG., BLAKE, J., SAUDEK, D. e BULT, C J., 1997. A molecular phylogeny of the bivalve mollusks. *Molecular Biology Evolution*, vol. 14, p. 619-629.

ALMEIDA, RP de., 2004. *Trichogramma* and its relationship with *Wolbachia*: identification of *Trichogramma* species, phylogeny, transfer and costs of *Wolbachia* symbionts. The Netherlands: Wageningen University. Tese de doutorado, p. 142.

ALTSCHUL, SF., GISH, W., MILLER, W., MYERS, EW. e LIPMAN, DJ. 1990., Basic local alignment search tool. *Journal Molecular Biology*, vol. 215, p. 403-410.

BARBOSA, MM., 1998. Quantificação e controle da qualidade do DNA genômico. In: MILACH, S. ed. Marcadores moleculares em plantas. Porto Alegre, p. 99-106.

BORBA, RS da., GARCIA, MS., KOVALESKI, A., OLIVEIRA, AC., ZIMMER, PD., BRANCO, JSC. e MALONE, G., 2005. Dissimilaridade genética de linhagens de *Trichogramma* Westwood (Hymenoptera: Trichogrammatidae) através de marcadores moleculares ISSR. *Neotropical Entomology*, vol. 34, p. 565-569.

CHANG, SC., HU N, T., HSIN, CY. e SUN C.N., 2001. Characterization of differences between two *Trichogramma* wasps by molecular markers. *Biological Control*, vol. 21, p. 75-78.

CIOCIOLA- JUNIOR, AI., ZUCCHI, RA. e STOUTHAMER, R., 2001a. Molecular key to seven brazilian species of *Trichogramma* (Hymenoptera: Trichogrammatidae) using sequences of the ITS2 region and restriction analysis. *Neotropical Entomology*, vol. 30, p. 259-262.

CIOCIOLA- JUNIOR, AI., QUERINO, RB., ZUCCHI, RA. e STOUTHAMER, R., 2001b. Molecular tool for identification of closely related species of *Trichogramma* (Hymenoptera: Trichogrammatidae): *T. rojasi* Nagaraja & Nagakarti and *T. lasallei* Pinto. *Neotropical Entomology*, vol. 30, p. 575-578.

DAVIES, AP., LANGE, CL. e O'NEILL, SL., 2006. A rapid single-step multiplex method for discriminating between *Trichogramma* species in Australia. *Journal of Economic Entomology*, vol. 99, p. 2142–2145.

DEM `YANCHUK, NP., OBLAP, RV., NOVAK, NB. e NICHUK, MD., 2008. Molecular-genetics study of entomophages of the genus *Trichogramma* Westw. *Cytology and Genetics*, vol. 42, n. 4, p. 263-266.

ESPAÑÁ-LUNA, MP., GONZÁLEZ-HERNÁNDEZ, A., ALVARADO-GÓMEZ, OG. e LOZANO-GUTIÉRREZ, J., 2008. Identificación molecular de especies crípticas de *Trichogramma* Westwood (Hymenoptera: Trichogrammatidae) de importancia agrícola en México. *Acta Zoologica Mexicana*, vol. 24 p.1-14.

FLANDERS, SE., 1930. Mass production of eggs parasites of the genus *Trichogramma*. *Hilgardia*, vol. 4, p. 465-501.

GRUTZMACHER D.D., LOECK A.E., OLIVEIRA, A.C., FISCHER S. e ELIAS, SA., 2006. Efeito do período de armazenamento em etanol sobre a qualidade e quantidade de dna extraído de *Acromyrmex heyeri* (Forel, 1899) (Hymenoptera: formicidae), *Revista Brasileira de Agrociência*, vol. 12, p. 105-6.

HONDA, JY, TAYLOR, L, RODRIGUEZ, J., YASHIRO, N. e HIROSE, Y., 2006. A taxonomic review of the Japanese *Trichogramma* (Hymenoptera: Trichogrammatidae) with descriptions of three new species. *Applied Entomology and Zoology*, vol. 41, p. 247-267.

JEONG, G., KIM, H., CHOI, Y., KIM, W., PARK, K., BAE, S., KIM, J e CHOI, J., 2010. Molecular identification of two *Trichogramma* species (Hymenoptera: Trichogrammatidae) in Korea. 2010. *Journal of Asia-Pacific Entomology*, vol. 13, p. 41-44.

KUMAR, GA., JALALI, SK., VENKATESAN, T., STOUTHAMER, R., NIRANJANA, P. e LALITHA, Y., 2009. Internal transcribed spacer-2 restriction fragment length polymorphism (ITS-2-RFLP) tool to differentiate some exotic andindigenous trichogrammatid egg parasitoids in India. *Biological Control*.vol, 49, p. 207-213.

LARKIN M., BLACKSHIELDS, G., BROWN, N., CHENNA, R., McGETTIGAN P., McWILLIAM, VALENTIN, F., WILM, A., LOPEZ, R., THOMPSON, J., GIBSON, T. e HIGGINS, D., 2007. *Bioinformatics*, vol. 21, p. 2947-2948.

LI, ZX. e SHEN, ZR., 2002. Application of DNAr ITS2 sequences to the molecular identification of *Trichogramma* spp. *Acta Entomologica Sinica*, vol. 49, p. 559-566.

LI, ZX, LI, Z. e SHEN, ZR., 2004. Using internally transcribed spacer 2 sequences to re-examine the taxonomic status of several cryptic species of *Trichogramma* (Hymenoptera: Trichogrammatidae). *European Journal of Entomology*, vol. 101, p. 347-358.

NAVARRO, MA., 1998. *Trichogramma* spp. Producción, uso y manejo en Colombia. Valle del Cauca, Guadalajara de Buga, p. 176.

NOYES, JS., 2003. Universal Chalcidoidea Database. World Wide Web electroni publication. Disponível em: <www.nhm.ac.uk/research-curation/projects/chalcidoids/index.html>. Acesso em: 7 setembro. 2010.

- ORREGO, C. e AGUDELO-SILVA, F., 1993. Genetic variation in the parasitoid wasp *Trichogramma* (Hymenoptera: Trichogrammatidae) revealed by DNA amplification of a section of the nuclear ribosomal repeat. *Florida Entomologist*, vol. 76, p. 519-524.
- PINTO, JD. e STOUTHAMER, R., 1994. Systematics of the Trichogrammatidae with emphasis on *Trichogramma*, p.1-36. In WAJNBERG, E. e HASSAN, SA. (eds.), Biological control with egg parasitoids. Wallingford, CAB International, p. 286.
- PINTO, JD., KOOPMANSCHAP, AB., PLATNER, GR. e STOUTHAMER R., 2002: The North American *Trichogramma* (Hymenoptera: Trichogrammatidae) parasitizing certain Tortricidae (Lepidoptera) on apple and pear, with ITS2 DNA characterizations and description of a new species. *Biological Control*, vol. 23, p. 134-142.
- POLASZEK, A. RUGMAN-JONES, PF; STOUTHAMER, R. HERNANDEZ-SUAREZ, E. CABELLO, T. e PEREZ, M. del. P., 2011. 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*, vol. 57 p. 21-35.
- QUERINO, RB. e ZUCCHI, RA., 2003. New species of *Trichogramma* Westwood (Hymenoptera: Trichogrammatidae) associated with lepidopterous eggs in Brazil. *Zootaxa*, vol.163, p.1-10.
- RODRIGUES, SMM. E SAMPAIO, MV., 2011. Armazenamento de *Trichogramma pretiosum* Riley (Hymenoptera: Trichogrammatidae) em baixas temperaturas. Arquivos do Instituto Biológico, vol. 78, n. 1, p. 45-51
- SAMARA, R., MONJE, JC., REINEKE, A e ZEBITZ, CPW. 2008. Genetic divergence of *Trichogramma aurosum* Sugonjaev and Sorokina (Hymenoptera: Trichogrammatidae) individuals based on ITS2 and AFLP analysis. *Journal of Applied Entomology*, vol. 132, p. 230-238.
- SAPPAL NP, JENG RS, HUBBES M. e LUI, F., 1995. Restriction fragment length polymorphism in polymerase chain reaction amplified ribosomal DNAs of three *Trichogramma* (Hymenoptera, Trichogrammatidae) species. *Genome*, vol. 38, p. 419-425.
- SILVA, IMMS., HONDA, J., KAN, FV., HU, J. NETO, L., PINTUREAU B. e STOUTHAMER, R., 1999. Molecular differentiation of five *Trichogramma* species occurring in Portugal. *Biological Control*, vol. 16, p.177-184.
- STOUTHAMER, R., VAN KAN, FJPM., PLATNER, GR. e Pinto, JD., 1999. The utility of internally transcribed spacer 2 DNA sequences of the nuclear ribosomal gene for distinguishing sibling species of *Trichogramma*. *BioControl*, vol. 43, p. 421-440.
- SUMER, F., TUNCBILEK, AS., OZTEMIZ, S., PINTUREAU, B., RUGMAN-JONES, P. e STOUTHAMER, R., 2009. A molecular key to the common species of *Trichogramma* of the Mediterranean region. *BioControl*, vol. 54, p. 617-624.

THOMSON, L.J., RUNDLE, B.J., CAREW, M.E. e HOFFMANN, A.A., 2003. Identification and characterization of *Trichogramma* species from south-eastern using the internal transcribed spacer 2 (ITS2) region of the ribosomal gene complex. *Entomology Experimental Applied*, vol. 106, p.235-240.

6. CAPÍTULO II

Diversidade Genética de Populações de *Trichogramma pretiosum* Riley, 1879 (Hymenoptera:Trichogrammatidae), com base no Sequenciamento da Região ITS2 do DNA Ribossomal

6.1.

Resumo

Espécies do gênero *Trichogramma* são importantes agentes de controle biológico em sistemas de produção agrícola, sendo *Trichogramma pretiosum* a espécie mais frequente no continente Sul-americano e está associada a diversos hospedeiros. Em estudos de diversidade genética de populações, os marcadores moleculares constituem uma ferramenta eficiente para detectar polimorfismo no DNA. Existem várias técnicas disponíveis para detectar polimorfismo no DNA entre populações e, entre elas, o sequenciamento de DNA ribossomal. Este trabalho teve por objetivo estimar o grau de diferenciação genética entre populações de *T. pretiosum* obtidas de 11 municípios do Brasil. Após a extração do DNA e sua padronização, foram realizadas as reações de PCR, utilizando-se marcadores específicos e, em seguida, foi realizado o sequenciamento e alinhamento das amostras, onde foi possível verificar a composição nucleotídica, múltiplos alinhamentos, matrizes de distância genética e os múltiplos agrupamentos entre as populações em estudo. Com o resultado da busca por similaridade utilizando o programa BLAST, no banco de dados do GenBank (NCBI – National Center for Biotechnology Information), verificou-se que todas as populações estudadas, obtiveram uma média de 92,2% de máxima identificação para *Trichogramma pretiosum*, confirmando o correto sequenciamento. O tamanho das sequências variaram de 355 a 503 pb. A média do conteúdo G + C (Guanina + Citosina) foi de 53,2%. Após o alinhamento das 11 sequências de *T. pretiosum*, foram encontrados 391 sítios conservados, que refletem 73 % do total dos 536 sítios encontrados, confirmando a semelhança entre as amostras, bem como a confiabilidade nas sequências obtidas. De acordo com o dendrograma obtido a partir da matriz de distância genética pelo método do vizinho próximo (Neighbor-Joining), pode-se verificar a presença de quatro grupos: o primeiro, formado pelas populações TPAES, TPPARS, TPRMT e TPCVMT, o segundo, pela população de TPSPMT; o terceiro grupo, pelas populações de TPPPE, TPMVCE, TPPPBB, TPPPMT, TPJSP e o quarto, pela população de TPPLMT, sendo esta a mais distante geneticamente. A distância geográfica não afetou a similaridade ou dissimilaridade genética entre os parasitóides, não existindo, diferenças significativas entre a distância geográfica e a similaridade genética das amostras de *T. pretiosum* nas localidades coletadas. Portanto, o sequenciamento da região ITS2 do DNA ribossômico nuclear é uma importante ferramenta utilizada para detectar as diferenças entre populações de *T. pretiosum* geneticamente relacionadas.

Palavras-chave: Parasitóide, distância genética, dissimilaridade.

6.2.

Abstract

Species of the *Trichogramma* genus are important biological control agents in agricultural production systems, *Tricrogramma pretiosum* being the most frequent species in the South American Continent and is associated with several hosts. In studies of the genetic diversity of populations, molecular markers are an efficient tool to detect DNA polymorphism. There are several techniques available to detect DNA polymorphism among populations, among them, ribosomal DNA sequencing. This work aimed to estimate the degree of genetic differentiation among the populations of *T. pretiosum* obtained from 11 counties in Brazil. After DNA extraction and standardization were carried out, PCR reactions using specific markers were performed followed by the sequencing and alignment of the samples, where it was possible to verify the nucleotide composition, multiple alignments, matrices of genetic distance and multiple clusters among the studied populations. With the query results for similarity using the BLAST program in the GenBank database (NCBI - National Center for Biotechnology Information) on all the studied samples a maximum identification average of 92,2% of was obtained for the *Trichogramma pretiosum* species, confirming the correct sequencing. The size of the sequences ranged from 355 to 503 bp. The average G + C content (guanine + cytosine) was 53,2%. After the alignment of 11 sequences of *T. pretiosum*, 391 sites were found conserved, reflecting 73% of the total of 536 sites found, confirming the similarity between samples, as well as reliability in the sequences obtained. According to the dendrogram obtained from the genetic distance matrix using the neighbor-joining method, the presence of four groups was verified the first being formed by the TPAES, TPPARS, TPRMT TPCVMT populations the second by the TPSPMT population the third by the TPPPE, TPMVCE, TPPPBB, TPPPMT, TPJSP populations, and the fourth by the TPPLMT population, being the most genetically distant population. The geographical distance did not affect the genetic similarity or dissimilarity between parasitoids, without significant difference between the geographic distance and the genetic similarity of the samples of *T. pretiosum* in the collected locations. Therefore, the sequencing of the ITS2 region of nuclear ribosomal DNA is an important tool used to detect the differences among genetically related *T. pretiosum* populations.

Keywords: Parasitoid, genetic distance, dissimilarity.

6.3. Introdução

Os himenópteros parasitóides apresentam alta biodiversidade e possuem grande importância biológica, ecológica e econômica (LaSalle e Gauld, 1993).

Entre os parasitóides, as espécies de *Trichogramma* Westwood, 1833 (Hymenoptera: Trichogrammatidae) são, sem dúvida, as mais estudadas e utilizadas em todo o mundo (Pratissoli et al., 2006).

Os parasitóides do gênero *Trichogramma* têm sido usados com sucesso como agente de controle biológico contra insetos-praga da ordem Lepidoptera em diversos sistemas agrícolas (Rodrigues e Sampaio, 2011). Embora parasitam também cerca de 200 espécies pertencentes a mais de 70 famílias de Insecta e oito ordens de importância agrícola (Morrison, 1985).

A espécie *Trichogramma pretiosum* Riley, 1879 (Hymenoptera: Trichogrammatidae) foi utilizada em grande escala no Brasil no controle da *Tuta absoluta* Meyrick, 1917 (Lepidoptera: Gelechiidae), em cultivos de tomate (Parra et al., 2002) na década de 1990. A partir de então o Brasil teve grande avanço no controle biológico de insetos-praga, produzindo entre cinco e dez milhões de adultos deste parasitóide por ano, liberando-se em cerca de 60.000 ha de milho e 1.200 ha de tomate e crucíferas, com perspectivas para aumento da utilização desse parasitóide, principalmente devido a exigência do mercado por produtos livres de resíduos de agrotóxicos e pelas informações geradas em trabalhos envolvendo diferentes espécies do parasitóide (Volpe et al., 2006).

T. pretiosum é uma espécie encontrada em diversas partes do mundo e na América do Sul, além de ser a espécie mais amplamente distribuída e associada a 26 hospedeiros (Pinto, 1997). Esse parasitóide controla as pragas em ambientes agrícolas e florestais, parasitando ovos principalmente da ordem Lepidoptera, sendo utilizado no controle biológico em mais de 30 países, onde é liberado de forma inundativa, controlando a praga na sua fase inicial de desenvolvimento (Pastori et al., 2008).

A espécie *T. pretiosum* foi encontrada no Brasil parasitando ovos de diversos hospedeiros como *Heliothis virescens* Fabr, 1781 (Lepidoptera: Noctuidae) (Zucchi et al.,

1989) e *Alabama argillacea* Hubner, 1818 (Lepdoptera: Noctuidae), em algodoeiro, (Almeida, 2000) *Spodoptera frugiperda* J E Smith, 1797 (Lepdoptera: Noctuidae), em milho, (Beserra e Parra, 2003), *Plutella xylostella* Linnaeus, 1758 (Lepidoptera: Plutellidae), em repolho (Pereira et al., 2004) e *Tuta absoluta* Meyrick, 1917 (Lepidoptera: Gelechiidae) em tomateiro (Pratissoli et al., 2005).

O sucesso de programas de controle biológico com *Trichogramma* spp. depende de etapas como identificação, manutenção no laboratório, seleção de espécies e/ou linhagens do parasitóide, da caracterização da diversidade genética das populações de parasitóides, bem como os fatores que mantêm esta diversidade (Oosterhout et al., 2004., Vianna et al., 2011).

A diversidade genética dos organismos é definida como a variedade de genótipos que um determinado grupo (populações ou espécies) pode apresentar e que possibilite adaptações das populações às constantes mudanças ambientais (Frankham et al., 2004). Estudos utilizando dados genéticos podem fornecer informações valiosas para a manutenção da diversidade genética dos organismos (Haig, 1998).

Os marcadores moleculares têm se mostrado uma grande ferramenta para estudos de genética de populações, biologia evolutiva, taxonomia e biologia da conservação, permitindo a análise da diversidade e diferenciação genética das populações naturais (Oosterhout et al., 2004). Com isso, técnicas utilizando biologia molecular têm sido empregadas em estudos de variação fenotípica em diferentes populações de insetos, com destaque para a técnica da reação em cadeia da polimerase (PCR) (Monnerat et al., 2004). Este trabalho teve como objetivo estimar o grau de diferenciação genética entre as populações de *Trichogramma pretiosum* em 11 municípios de sete estados do Brasil.

6.4. Material e Métodos

6.4.1. Obtenção das amostras de *Trichogramma pretiosum*

As amostras das populações de *Trichogramma pretiosum* utilizadas no estudo foram obtidas de onze municípios do Brasil (Tabela 1) e conduzidas ao Laboratório de Entomologia da Embrapa Algodão, Campina Grande, PB. Parte dos insetos foi encaminhada para a taxonomista em Trichogrammatidae Dra. Ranyse Barbosa Querino (Embrapa Meio-Norte), sendo a outra, utilizada nos estudos moleculares realizados no laboratório de Biotecnologia da Embrapa-Algodão em Campina Grande, PB e no Laboratório de Biologia Molecular (LABIME) /UFPB em João Pessoa, PB.

Tabela 1. Populações de *Trichogramma pretiosum* obtidas de 11 municípios em sete estados do Brasil

Região	Município /Estado	Amostras	Coordenadas Geográficas	Altitude (m)
Centro-Oeste	Campo Verde/ Mato Grosso	TPCVM	-15° 32' 48" S 55° 10' 08" O	736
	Serra da Petrovina/ Mato Grosso	TPSPMT	-16° 47' 22" S 54° 29' 44" O	732
	Primavera do Leste/ Mato Grosso	TPPLMT	-15° 33' 32" S 54° 17' 46" O	465
	Rondonópolis/ Mato Grosso	TPRMT	-16° 28' 15" S 54° 38' 08" O	227
	Pedra Preta/Mato Grosso	TPPPMT	-16° 37' 23" S 54° 28' 26" O	248
Nordeste	Patos/Paraíba	TPPPB	-07° 01' 28" S 37° 16' 48" O	242
	Petrolina/Pernambuco	TPPPE	-09° 23' 55" S 40° 30' 03" O	376
	Missão velha/Ceará	TPMVCE	-07° 14' 59" S 39° 08' 35" O	360
Sudeste	Jaboticabal/ São Paulo	TPJSP	-21° 15' 17" S 48° 19' 20" O	605
	Alegre/Espírito Santo	TPAES	-20° 45' 49" S 41° 31' 59" O	254
Sul	Porto Alegre/Rio Grande do Sul	TPPARS	-30° 01' 59" S 51° 13' 48" O	3

*o georeferenciamento levou em consideração a sede do município.

6.4.2. Extração de DNA, amplificação da região ITS2 do DNA ribossomal por reação em cadeia da DNA polimerase (PCR) e purificação

O DNA genômico do inseto para cada amostra foi extraído macerando-se cinco indivíduos em tubos eppendorf, juntamente com 50 µl de Chelex 5% e 2 µl de proteinase K e a seguir incubados a 56°C por 4h em banho-maria e após 10 minutos a uma temperatura de 95°C (Almeida, 2004). Esta solução tornou-se o estoque de DNA genômico dos insetos, sendo em seguida armazenada em freezer a 0°C.

A quantidade e qualidade do DNA genômico extraído foi analisada em espectrofotômetro (NANODROP® Thermo Scientific 2000, EUA). Este equipamento fornece a quantidade de DNA em ng/µL e a razão de duas densidades óticas de leitura (260/280 nm) para verificação do nível de pureza da amostra.

As reações de amplificações do gene ITS2 foram realizadas por PCR utilizando-se como substrato DNA genômico previamente isolado e primers específicos (Stouthamer et al., 1999), conforme Tabela 2.

Tabela 2. Primers específicos utilizados nas reações de PCR

Primers	Região	Seqüência	Sentido do anelamento
ITS - 2 - F	5.8S	TGTGAACTGCAGGACACATG	(5' → 3')
ITS - 2 - R	28S	GTCTTGCCTGCTCTGCTCTGAG	(3' → 5')

Em um tubo eppendorf foram misturados os componentes nos volumes especificados, onde o valor da água variou de acordo com a quantidade de DNA da amostra (Tabela 3). Na reação de PCR foi utilizado um controle negativo sem DNA e o restante dos componentes.

Tabela 3. Componentes e volumes utilizados na preparação das reações de PCR

Constituintes da reação de PCR	Volume utilizado
Tampão de reação 10X	5 µl
dNTP's (10 mM)	1 µl
Primer Forward (10 uM)	1 µl
Primer Reverse (10 uM)	1 µl
DNA genômico (100 ng/ml)	2 ou 5 µl
H ₂ O miliq	35,75 ou 32,75 ul
Taq DNA polimerase (5 U/ul)	0,25 µl
Mgcl ₂ (1,5 mM)	4 ul
Volume Final	50 µl

As amplificações foram realizadas com volume final da reação de 50 µl em um termociclador (LGC Biotecnologia®) programado para 3 min a 94° C, seguido por 33 ciclos de 40 seg a 94° C, 45 seg a 53° C e 45 seg a 72° C, com extensão final de 5 min a 72° C (Almeida, 2004). Após a extensão final, as amostras permaneceram estocadas a 4° C no termociclador até que fossem armazenadas em freezer a 0⁰C.

Para a análise do produto da reação, uma alíquota de 20 µl foi removida e submetida à eletroforese em gel de agarose 0,8% no tampão TAE (Tris-Acetato-EDTA) 1,0X, com corrida eletroforética realizada a uma voltagem constante de 100 V e visualizada em um transiluminador de ultravioleta. O tamanho dos produtos de PCR foi determinado utilizando um marcador de peso molecular ladder de 100 pb.

6.4.3. Purificação dos fragmentos de DNA ribossomal

Os fragmentos dos produtos de PCR amplificados correspondentes a 500 pb foram cortados do gel com o auxílio de um bisturi e purificados com o Kit de purificação (DNA Gel Extraction Kit – (Fermentas), de acordo com o protocolo proposto pelo fabricante, para que fosse possível obter quantidade e qualidade de DNA suficientes para o sequenciamento.

6.4.4. Sequenciamento

6.4.4.1. PCR para o sequenciamento da região ITS2 do DNA ribossomal

As reações de sequenciamento foram realizadas em duplicatas e inseridas em microplacas de 96 poços, utilizando o Kit DNA Sequencing - Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready ABI Prism, versão 3, nas quais foram utilizados os mesmos primers ITS-2 R, separadamente para cada reação, para obter uma maior confiabilidade das sequências geradas e demais reagentes (Tabela 4).

Tabela 4. Reagentes utilizados na reação de PCR de sequenciamento

Reagentes	Concentração		Volume Final (10ul)
	Estoque	Final	
Big Dye	5 X	1 X	2 µl
Tampão	5 X	1 X	1 µl
Primer R	10 p moles	0,4 p moles	1 µl
DNA	100 ng	10 ng	5 µl
Água MilliQ	-	-	1 µl

A amplificação foi conduzida em termociclador (Gene Amp PCR System 9700 Applied Biosystems, USA), utilizando o programa específico (96°C/10 seg- 53°C/ 20 seg – 60°C/1 min). As amostras permaneceram a 4° C até serem retiradas para a precipitação de sequenciamento.

6.4.4.2. Precipitação da PCR de sequenciamento da região ITS2 do DNA ribossomal

Após a amplificação, foram adicionadas às amostras 80 µl de isopropanol 75% sendo deixadas em repouso por 15 min à temperatura ambiente e posteriormente centrifugadas a 1300 x g por 60 min. Após centrifugação, o sobrenadante foi descartado, as placas permaneceram invertidas por 5 min em papel absorvente. Acrescentou-se 150 µl de etanol 70%, novamente centrifugadas a 1300 x g por 15 min. Logo após, o sobrenadante foi descartado e as placas colocadas em capela de fluxo laminar por cerca de 1 h protegidas da

luz. Em seguida, as amostras foram ressuspensas com 10 µl de Hi - Di formamida, aquecidas por 5 min a 95°C no termociclador, esfriadas no gelo e submetidas ao sequenciamento, utilizando-se o sequenciador ABI PrisM ® 3100 Genetic Analyses (Applied Biosystems, EUA).

6.4.5. Alinhamento múltiplo e tamanho das sequências

As sequências obtidas foram submetidas à busca por similaridade no *GenBank*, através do programa BLAST (Altschul et al., 1990), visando-se assim, determinar a similaridade destas com sequências já depositadas no referido banco de dados. O alinhamento múltiplo das sequências foi realizado com o auxílio do programa CLUSTALX, versão 2.0.12 (Thompson et al., 1997). O tamanho das sequências obtidas foi realizado utilizando-se o programa Consed (Gordon et al., 1998).

6.4.6. Análise de agrupamento

A análise de agrupamento envolvendo o método de distância P foi realizada com o auxílio do programa MEGA (Molecular Evolutionary Genetic Analysis), versão 5.0 (Tamura et al., 2011), atribuindo o parâmetro da distribuição gamma (γ). Este parâmetro é capaz de incorporar heterogeneidade nas taxas de substituição nucleotídica ao longo dos sítios, pois nem todos os sítios evoluem na mesma taxa (Schneider, 2003), e também de incorporar heterogeneidade à proporção de sítios invariáveis (I). As análises de bootstrap, para testarem a confiança nas topologias obtidas, foram realizadas com 1000 repetições do conjunto de dados.

6.4.7. Teste de Mantel

A influência da distância geográfica sobre a similaridade genética das amostras de *Trichogramma pretiosum* foi verificada por intermédio do teste de Mantel (Sokal e Rohlf, 1995). Este teste realiza a aleatorização entre as matrizes. Se houver significância a 5%, concluímos que a distância geográfica está influenciando a composição das espécies em estudo. Portanto, o objetivo desta análise foi testar a autocorrelação espacial nas populações. O teste de Mantel foi realizado utilizando o programa Genes (Cruz, 2008). A

matriz de distância geográfica foi calculada por intermédio do programa GDMG (Geographic Distance Matrix Generator Versão 1.2.3) (Erst, 2009), a partir dos pontos georeferenciados.

6.5. Resultados e Discussão

Este estudo representa a primeira avaliação da diversidade genética de populações brasileiras de *T. pretiosum*, utilizando o sequenciamento da região ITS2 do DNA ribossomal. Todas as amostras enviadas para a identificação pela taxonomista em Trichogrammatidae, Dra. Ranyse Querino da Embrapa Meio-Norte, foram confirmadas como sendo *T. pretiosum*, fundamental para o estudo de diversidade genética das populações. Ciociola Jr. et al. (2001) enfatizaram a importância de ser realizada primeiramente a identificação através das características morfológicas e depois a utilização dos métodos moleculares.

6.5.1. Extração do DNA genômico

Foi possível a extração de DNA das amostras de populações de *Trichogramma* em municípios das regiões Nordeste, Centro-Oeste e Sudeste do Brasil, com concentração de DNA genômico, variando entre 20 e 50 ng/μl (Tabela 5).

Tabela 5. Quantificação de DNA extraído das populações de *Trichogramma pretiosum*

Populações de <i>Trichogramma pretiosum</i>	Quantificação de DNA (ng/μL)
1 - TPPPB	27,3
2 - TPMVCE	50,0
3- TPCVMT	50,0
4-TPPLMT	30,0
5-TPPPE	37,8
6-TPPARS	28,0
7-TPSPMT	24,2
8-TPJSP	30,1
9-TPRMT	20,0
10- TPAES	22,0
11- TPPPMT5	50,0

As quantidades de DNA obtidas foram similares às encontradas por Vanlerberghe-Masutti (1994), ao estudar algumas espécies de *Trichogramma*. Este foi um passo importante para o estudo. A quantidade de DNA íntegro é um dos fatores fundamentais para o sucesso da reação de PCR, uma vez que poderá não ocorrer amplificação se a sua quantidade for excessivamente baixa ou alta (Carvalho e Vieira, 2001).

Baldwin et al. (1995) citam que em estudos filogenéticos ou populacionais, a qualidade e a quantidade do DNA são de extrema importância, devido às modificações ou degradações que ele poderá sofrer durante a sua extração e purificação.

6.5.2. Amplificação da região ITS2 do DNA ribossomal por Reação em Cadeia da DNA Polimerase (PCR)

Foi possível verificar a amplificação de um único fragmento de DNA, de aproximadamente 500 pb, livre de amplificações não específicas de todas as amostras estudadas a partir da análise de eletroforese em gel de agarose à 0,8% (Figura 1), confirmando-se que o DNA extraído pertence aos fragmentos da região ITS-2 do DNA ribossomal esperado para a espécie *T. pretiosum*.

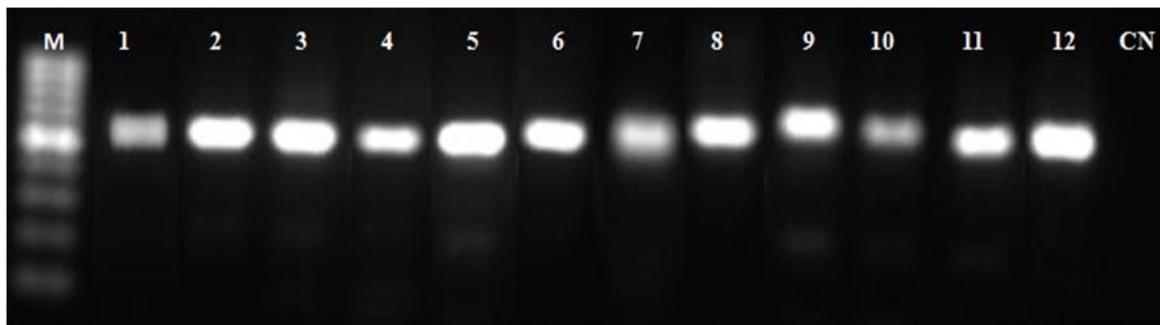


Figura 1. Eletroforese em gel de agarose 0,8 % do produto da amplificação do DNA por PCR. A letra M representa o Marcador de peso molecular em pares de base ladder de 100 pb. Os números de 1-12 representam as populações de *T. pretiosum* obtidas de regiões do Brasil (1-TPPPB, 2-TPMVCE, 3-TPCVMT, 4-TPPLMT, 5-TPPPE, 6-TPPARS, 7- amostra descartada, 8-TPSPMT, 9-TPJSP, 10- TPRMT-, 11- TPAES, 12- TPPPMT, 13- CN).

Resultados semelhantes, utilizando-se primers específicos da região ITS2 do DNA ribossomal, identificando espécie de *T. pretiosum* com padrão de amplificação aproximadamente entre 520 pb foram alcançados por España-Luna et al. (2008); Ciociola

Jr. et al. (2001), Almeida (2004). Esta região tem sido amplamente utilizada em estudos taxonômicos das espécies de *Trichogramma* (Orrego e Silva 1993; Van Kan et al., 1996; Pinto et al., 2002).

6.5.3. Purificação do produto de PCR amplificado

A purificação do DNA amplificado visa eliminar os resíduos, ou seja, impurezas de restos de reagentes, aumentando a qualidade das sequências produzidas (Figueiredo et al., 2003), o que foi de fato encontrado e constatado nos resultados.

Foi possível obter quantidade e qualidade de DNA de produto de PCR, suficientes para o sequenciamento de qualidade de todas as populações de *T. pretiosum* (Tabela 6). Entretanto, sequências com baixa concentração de DNA podem possuir nucleotídeos inseridos incorretamente, o que poderia gerar resultados equivocadas ou incorretos (Pereira, 2006).

Tabela 6 - Quantificação e pureza das amostras de produtos de PCR purificadas das populações de *Trichogramma pretiosum*

Amostras	Quantificação (ng/μL)	Relação 260/280
1- TPPPB	21,0	1,78
2- TPMVCE	44,3	2,02
3- TPCVMT	23,2	1,51
4- TPPLMT	25	1,98
5- TPPPE	32,6	1,50
6- TPPARS	18,4	1,62
7- TPSPMT	21,0	1,62
8- TPJSP	21,9	1,51
9- TPRMT	23,2	1,51
10- TPAES	20,8	1,60
11 - TPPPMT	36	1,76

6.5.4. Sequência consenso da região ITS2 do DNA ribossomal

Com o resultado da busca por similaridade utilizando o programa BLAST, no banco de dados do GenBank (NCBI – National Center for Biotechnology Information) de todas as sequências consensos obtidas, pode-se verificar que sequências de alta qualidade foram obtidas a partir do produto de PCR da região ITS2 do DNA ribossomal de todas as amostras estudadas com uma média de 92,2% de máxima identificação referente às amostras de *T. pretiosum* (Tabela 7). Os valores de E (E value) obtidos de todas as sequências alinhadas com as sequências do banco de dados do GenBank apresentaram-se iguais e próximos de 0 (zero), o que indica menor probabilidade destas sequências terem sido obtidas por mero acaso, confirmando o correto sequenciamento.

Tabela 7. Identificação das amostras de *T. pretiosum* através de comparação das sequências consensos obtidas com sequências do banco de dados do GenBank – NCBI.

Amostras	Primer	Número de Acesso	Máxima Identifi - cação	BLAST Espécie
<i>Trichogramma_pretiosum</i> _TPCVMT	ITS-2- R	DQ525178.1	94 %	<i>T.pretiosum</i>
<i>Trichogramma_pretiosum</i> _TPSPMT	ITS-2- R	JF306651.1	90 %	<i>T.pretiosum</i>
<i>Trichogramma_pretiosum</i> _TPPLMT	ITS-2- R	JF306651.1	87 %	<i>T.pretiosum</i>
<i>Trichogramma_pretiosum</i> _TPRMT	ITS-2- R	DQ525178.1	92 %	<i>T.pretiosum</i>
<i>Trichogramma_pretiosum</i> _TPPPMT	ITS-2- R	DQ525178.1	94 %	<i>T.pretiosum</i>
<i>Trichogramma_pretiosum</i> _TPPPB	ITS-2- R	JF306651.1	92 %	<i>T.pretiosum</i>
<i>Trichogramma_pretiosum</i> _TPPPE	ITS-2- R	JF306651.1	92 %	<i>T.pretiosum</i>
<i>Trichogramma_pretiosum</i> _TPMVCE	ITS-2- R	JF306651.1	94 %	<i>T.pretiosum</i>
<i>Trichogramma_pretiosum</i> _TPJSP	ITS-2- R	DQ525178.1	94 %	<i>T.pretiosum</i>
<i>Trichogramma_pretiosum</i> _TPAES	ITS-2- R	U76226.1 TPU 76226	92 %	<i>T.pretiosum</i>
<i>Trichogramma_pretiosum</i> _TPPARS	ITS-2- R	U76226.1 TPU 76226	94 %	<i>T.pretiosum</i>

6.5.5. Tamanho das sequências e análise do conteúdo GC

O tamanho das sequências variaram de 355 a 503 pb. A média do conteúdo G + C (Guanina + Citosina) foi de 53,2% (Tabela 8). É de grande importância em estudos filogenéticos a análise do conteúdo G + C, pois regiões ricas em GC possuem maior estabilidade por possuir três pontes de hidrogênio, produzindo estruturas secundárias mais estáveis (Page e Holmes, 1998).

Tabela 8. Tamanhos em pares de bases, conteúdo G+C (Guanina + Citosina) e composição nucleotídica das sequências obtidas da região ITS2 do DNA ribossomal das populações estudadas

Amostra	Tamanho (pb)	Conteúdo G+C (%)	T (%)	C (%)	A (%)	G (%)
<i>Trichogramma_pretiosum</i> _TPCVMT	494	54,86	21,86	26,52	23,28	28,34
<i>Trichogramma_pretiosum</i> _TPSPMT	450	52,44	20,89	21,11	26,67	31,33
<i>Trichogramma_pretiosum</i> _TPPLMT	355	54,93	18,59	24,51	26,48	30,42
<i>Trichogramma_pretiosum</i> _TPRMT	489	54,81	22,29	26,58	22,90	28,22
<i>Trichogramma_pretiosum</i> _TPPPMT	486	53,29	22,22	25,31	24,49	27,98
<i>Trichogramma_pretiosum</i> _TPPPB	430	51,40	23,49	22,56	25,12	28,84
<i>Trichogramma_pretiosum</i> _TPPPE	446	50,22	24,44	23,54	25,34	26,68
<i>Trichogramma_pretiosum</i> _TPMVCE	447	48,99	24,61	22,82	26,40	26,17
<i>Trichogramma_pretiosum</i> _TPJSP	503	54,67	22,27	26,44	23,06	28,23
<i>Trichogramma_pretiosum</i> _TPAES	387	54,52	20,93	26,36	24,55	28,17
<i>Trichogramma_pretiosum</i> _TPPARS	448	55,36	21,21	27,01	23,44	28,35

T – Timina, C – Citosina, A – Adenina, G – Guanina.

6.5.6. Alinhamento múltiplo das sequências consensos

De acordo com os resultados do alinhamento múltiplo de todas as sequências consensos obtidas (Figura 2), foi possível verificar as diferenças entre as amostras em estudo, no que se refere à presença ou ausência das bases nitrogenadas e sua distribuição na sequência. Uma pequena quantidade de gaps (espaços) foi necessária para alinhar as sequências de todas as amostras, entretanto para as análises foram retiradas as extremidades 5' e 3' para uniformizar o tamanho das sequências.

```

TPCVMT      -----GNGANGAGAAAAAGACTCG-TTG-TTGTTGTTTCGAGC-TAGCCAG
TPRMT       -----AGACTCG-TTG-TTGTTGTTTCGAGC-TAGCCAG
TPAES       -----CGACGAGAAAAAGACTCGGTTG-TTGTTGTTTCGAGN-TAGCCAG
TPPARS      GNNCCGCGACGANAAAA-GACTCGGTTGTTGTTGTTTCGAGTCTAGCCAG
TPPPMT      -GGNNGCGACGAGAAAA-GACTCG-TTG-TTGTTGTTTCGAGC-TAGCCAG
TPJSP       GGGCAGCGATGAGAAAAAGACTCG-TTG-TTGTTGTTTCGAGC-TAGCCAG
TPSPMT      ----AGTGATGGGAAA--GACTCG-TTG-TTGTTGTTTCGAGC-TAGCCAG
TPPPB       -----GNGNGANGNAAAGATCG-TTG-TTGTTGTTTCGAGC-TAGCCAG
TPPPE       NNNCNNGCAGCAGAAAA-GACTCG-TTG-TTGTTGTTTCGAGC-TAGCCAG
TPMVCE      -----GCGATGG--AAA-GACTCG-TTG-TTGTTGTTTCGAGC-TAGCCAG
TPPLMT      -GNCCGCGACGAGAAAA-GACTCG-TTG-TTGTTGTTTCGAGC-TAGCCAG
                ***  ***  *****

```

```

TPCVMT      A-GCTATAATAAAATAGCG--ANCNNCGCGCGCG-CGNCTTTCTAGT-GT
TPRMT       A-GCTATAATAAAATAGCGTAGNCNGCGCGCGC-CNTANATCTAGNTGT
TPAES       A-GCTATAATAAAATAGCGTGNCCNNNNGCGCGCGGG-GGGAAANNTAGT-GT
TPPARS      A-GCTATAATAAAATAGCGNCCNNNTGCGCGCGNG-GN-AAATCTAGT-GT
TPPPMT      GCGCTATAATAAAAT--CTCCGAGAGCGCGNGCG-CGCCTTTCTAGT-GT
TPJSP       GCGCTATAATAAAAT--CCCCGAGAGCGCGNGNG-CGCCTTTCTAGT-GT
TPSPMT      GCGCTATAATAAAATAGTCGNNNCGCGCGCGGG-AA-AAANTCTAGNTGT
TPPPB       GCGCTATAATAAAA--CNNGAGAGCGNGGGAG-CGCCTTTCTAGT-GT
TPPPE       GCGCTATAATAAAATNCTCGGAGGAGCGCGNGNGACGCCTTTCTAGGTGT
TPMVCE      GCGCTATAATAAAATNCN---GAGAGCGCGNGCG-CGCCTTTCTAG-TGT
TPPLMT      GCGCTATAATAAAACNNN---GAGAGCGGGNNAAGCCTTTCTAG-TGT
                *****                ** *                ***  **

```

```

TPCVMT      ACCGAA-TCATGGNACGAGCCTGCATCGTGT-ACTGA-CAGTNGG---TC
TPRMT       ACCGNAATCATGGNACGAGCCTGTNTCGTGNTACTGNACAGATCGG-ATC
TPAES       ACCGAA-TCATGGNACGAGCCT-TCNCGTGT-ACTGA-CNGANAG---TC
TPPARS      ACCGAA-TCATGGNACGAGCCT-TCTCGTGT-ACTGA-CAGTCNG---TC
TPPPMT      ACCGAA-TCATGGTANCAGCCT-GATCGTGT-ACTGA-CAGTCGG---TC
TPJSP       ACCGAA-TCATGGTACNAGCCT-GATCGTGT-ACTGA-CAGTCGG---TC
TPSPMT      ACCGNAATCATGGNACGAGNNTCCATCGTGT-ACTGGAGAGAANAAGATC
TPPPB       ACCGAA-TCATGGTNTCNCCTGNATCGTGT-ACTGA-CAGTCGG---TC
TPPPE       ACCGAA-TCATGGACTCNCNCT-GATCGTGT-ACTGA-CAGTCGG---TC
TPMVCE      ACCGAA-TCATGGAACGNCCCT-GATCGTGT-ACTGA-CAGTCGG---TC
TPPLMT      ACCGAA-TCATGGTTTCNCNGNT-GATCGNGG-AAANA-NAGTCGG---TC
                **** *  *****      *  ** *  *      *      **

```

```

TPCVMT      CGCTGCTCGACGAGGCGAGAAGCTCCGGGA-CTCGAACGCAGAACGATCG
TPRMT       CGCTGCTCGACGAGGCGAGAAGCTCCGGGNACTCGAACGCAGAACGATCG
TPAES       CGCTGCTCGACGAGGCGAGAAGCTCCGGGA-CTCGAACGCAGAACGATCG

```

Continuação

TPPARS CGCTGCTCGACGAGGCGAGAAGCTCCGGGA-CTCGAACGCAGAACGATCG
 TPPPMT CGCTGCTCGACGAGGCGAGAAGCTCCGGGA-CTCGAACGCAGAACGATCG
 TPJSP CGCTGCTCGACGAGGCGAGAAGCTCCGGGA-CTCGAACGCAGAACGATCG
 TPSPMT CGCTGCTCGACGAGGCGAGAAGCTCCGGGNACTCGAACGCAGAACGATCG
 TPPPB CGCTGCTCGACGAGGCGAGAAGCTCCGGGA-CTCGAACGCAGAACGATCG
 TPPPE CGCTGCTCGACNAGGCGAGAAGCTCCGGGA-CTCGAACGCANAACGATCG
 TPMVCE CGCTGCTCGACNAGGCGAGAAGCTCCGGGA-CTCGAACGCANAACGATCG
 TPPLMT CGCTGCTCGACGAGGCGAGAAGCTCCGGGA-CTCGAACGCAGAACGATCG

TPCVMT GAAGTACTCGCGCGCTTTTACACACGTGAGTACTCTCCAAGCGGTAAGCG
 TPRMT GAAGTACTCGCGCGCTTTTACACACGTGAGTACTCTCCAAGCGGTAAGCG
 TPAES GAAGTACTCGCGCGCTTTTACACACGTGAGTACTCTCCAAGCGGTAAGCG
 TPPARS GAAGTACTCGCGCGCTTTTACACACGTGAGTACTCTCCAAGCGGTAAGCG
 TPPMT GAAGTACTCNCNCNCTTTTACACACGTGAGTACTCTCCAAGCGGTAAGCG
 TPJSP GAAGTACTCGCGCGCTTTTACACACGTGAGTACTCTCCAAGCGGTAAGCG
 TPSPMT GAAGTACTCGCGTGTNNACACACGTGAGTACTCTNCAAGNGGTAAGCG
 TPPPB GAAGTACTCTNGCGCTTTTACACACGTGAGTACTCTCCAAGCGGTAAGCG
 TPPPE GAAGTACTCGCGCGCTTTTACACACGTGAGTACTCTCCAAGCGGTAAGCG
 TPMVCE GAAGTACTCGCGCGCTTTTACACACGTGAGTACTCTCCAAGCGGTAAGCG
 TPPLMT GAAGTACTTTTNNCCCTTTTACACACGTGNGGAAAANACAAGCGGTAAGCG
 ***** * ***** * * *****

TPCVMT CGCGCGCCAGCCAGACGAACGCCAATTCATCTTTTCTCTTGCGTTTCGTT
 TPRMT CGCGCGCCAGCCAGACGAACGCCAATTCATCTTTTCTCTTGCGTTTCGTT
 TPAES CGCGCGCCAGCCAGACNAACGCCAATTCATCTTTTCTCTTGCGTTTCGTT
 TPPARS CGCGCGCCAGCCAGACNAACGCCAATTCATCTTTTCTCTTGCGTTTCGTT
 TPPPMT CGCGCGCCAGCCAGACNAACGCCAATTCATCTTTTCTCTTGCGTTTCGTT
 TPJSP CGCGCGCCAGCCAGACGAACGCCAATTCATCTTTTCTCTTGCGTTTCGTT
 TPSPMT CGCGCGCCAGCCAGACGAACGCCAATTCATCTTTTCTCTTGCGTTTCGTT
 TPPPB CGCGCGCCAGCCAGACGAACGCCAATTCATCTTTTCTCTTGCGTTTCGTT
 TPPPE CGCGCGCCAGCCAGACNAACGCCAATTCATCTTTTCTCTTGCGTTTCGTT
 TPMVCE CGCGCGCCAGCCAGACNAACGCCAATTCATCTTTTCTCTTGCGTTTCGTT
 TPPLMT CGCGCGCCAGCCAGACGAACGCCAATTCATCTTTTCTCTTGCGTTTCGTT

TPCVMT TGAGGCGACGTGTGCGAGCACACACGCAC-ACTGCTATACTCTGAGAGAG
 TPRMT TGAGGCGACGTGTGCGAGCACACACGCAC-ACTGCTATACTCTGAGAGAG
 TPAES TGAGGCGACGTGTGCGAGCACACACGCAC-ACTGCTATACTCTGAGAGAG
 TPPARS TGAGGCGACGTGTGCGAGCACACACGCAC-ACTGCTATACTCTGAGAGAG
 TPPPMT TGAGGCGACGTGTGCGAGCACACACACTGCTGCTATACTCTGAGAGAG
 TPJSP TGAGGCGACGTGTGCGAGCACACGCACACTGCTGCTATACTCTGAGAGAG
 TPSPMT TGAGGCGACGTGTGCGAGCACACGCACACTGCTGCTATACTCTGAGAGAG
 TPPPB TGAGGCGACGTGTGCGCANACACGCACACTGCTGCTATACTCTGAGAGAG
 TPPPE TGAGGCGACGTGTGCGAGCACACGCACACTGNTGNTATACTCTNANANAG
 TPMVCE TGAGGCGACGTGTGCGAGCACACGCACACTGNTGNTATACTCTGANANAG
 TPPLMT TGAGGCGACGTGTGCGAGCACACGCACACTGCTGCTATACTCTGAGAGAG
 ***** * * * * * * * * * *

TPCVMT --CAAGAGATGGTGTGTGTG--CGCGACACGAGCGCCCAGATCAACGCTC
 TPRMT --CAAGAGATGGTGTGTGTG--CGCGACACGAGCGCCCAGATCAACGCTC
 TPAES --CAAGANATGGTGTGTGTG--CGCGACACNAGCGCCCANATCANCGCTC
 TPPARS --CAAGAGATGGTGTGTGTG--CGCGACACGAGCGCCCAGATCAACGCTC

Continuação

```

TPPPMT      AGCAAGAGATAGTGTGTGTGTGCGCGACACGAGCGCCCAGATCAACGCTC
TPJSP       AGCAAGAGATAGTGTGTGTGTGCGCGACACGAGCGCCCAGATCAACGCTC
TPSPMT      AGCAAGAGATAGTGTGTGTGTGCGCGACACGAGCGCCCAGATNAANGCTC
TPPPB       AGCAAGAGATAGTGTGTGTGTGCGNGACANGAGCGCCCANATNAACGCTC
TPPPE       AAAAAATANTGTGTGTGTG--NGCNNNACANGNGCNCNNANANANNNTNTN
TPMVCE      AAAAAATANTGTGTGTGTG--NGCANNACANCNNCCCANATANNNTNTN
TPPLMT      AGCAAGAGANAGNGNGNG--NGCGGANANGNGNGNNNANANNNANGN
              * * * * * * * * * * * * * * *

TPCVMT      TCTCTTGCGAGAGAGCAGTCGGGTTTCGTTTTTATAAACGACCCTCAGCCA
TPPARMT     TCTCTTGCGAGAGAGCAGTCGGGTTTCGTTTTTATAAACGACCCTCAGCCA
TPAES       TCTCTTGCGAGAGAGANNACAGGNTCNTTTTTTA-----
TPPARS      TCTCTTGCGAGAGAGCAGTCGGGTTTCGTTTTTATAAACGACCCTCANCCN
TPPPMT      TCTCTTGCGAGAGAGCAGTCGGGTTTCGTTTTTATAAACNACCCTCANCCA
TPJSP       TCTCTTGCGAGAGAGCAGTCGGGTTTCGTTTTTATAAACGACCCTCANCCA
TPSPMT      TCTCTTGNGAGAGAGNANTCGGGTTNGTTTTTATAAANGANNNTNANNNA
TPPPB       TCTCTTGNGANAAANNAGTAGGGTTTCGTTTTTANAAAANGACNNTNANNNN
TPPPE       TNTCTTNTGANANANAANNGTGGNTTTTTTTTTNTAAANNNCNCCNCNCC
TPMVCE      TNTCTTNTNANANAGAAGNGTGGNTTTTTTTTTNTAAANNNCNCCNCNCCN
TPPLMT      NCNCCNNNNGAGAGA-----
              * * *

TPCVMT      GG-CGTGGTCCGGG--AACGAGATCCGTGGACCGCAATGTGCGTTTCGAAA
TPRMT       GG-CGTGGTCCGGG--AACGAGATCCGTGGACCGCAATGTGCGTTTCGAAA
TPAES       -----
TPPARS      NG-CGTGNTCCGGG--AACNANANNNGNGGACCGNAATGTGNNT-----
TPPPMT      GG-NGTGGTNCGGGGNAACGAAATCNGGGNACCGNAATGNTGTNTTTNAA
TPJSP       GG-CGTGGTCCGGG--AACNAGATCCGTGGACCGCAATGTGNTTTCNAAA
TPSPMT      GGGNGNGGTNNGGG--AANNAGANNNGNGGANNGNNTGNGNGNTANAAAN
TPPPB       GG-NGTGNTANGNN--AAAAANAANNGTGNA---TGNNTGNNNNNNNAAA
TPPPE       GG-GGNGNGGGNGGGNAAAANATNTNNGGGCACCGNTGTGTGTNANAAAAAN
TPMVCE      GG-GGTGNGGGGNGAAAAANATATNNGGGNACCGNTGTGTGTNAAAAAAN
TPPLMT      -----

TPCVMT      TGTTCGATGTTTCATGTGTCTCCTGCAGTTCACAA-----
TPRMT       TGTTCGATGTTTCATGTGTCTCCTGCAGTTCACAA-----
TPAES       -----
TPPARS      -----
TPPPMT      AAATGNNAATNTTNTTGGTNCNGNNNNNANAAAAA
TPJSP       TGNCGATGTTTCATGTGTCTCCTGCANTTCAAA-----
TPSPMT      GNNNAANGNNNNNGNGNNNNNGNNNNNNAAAA-----
TPPPB       NGTNNNTTT-----
TPPPE       TGNNNTNTNTTGTGTGCCNTNAAAAA-----
TPMVCE      TGNTNTNTTGTGTGCCNTNAAAAA-----
TPPLMT      -----

```

Figura 2. Alinhamento múltiplo das sequências consensos da região ITS2 do DNA ribossomal de populações de *T. pretiosum* em 11 localidades. O traço (-) indica espaço, o asterisco (*) indica similaridades entre os nucleotídeos e o (N) indica nucleotídeo não identificado.

O alinhamento entre sequências de DNA pode ser utilizado para verificar homologias (Pereira, 2006).

Após o alinhamento das 11 sequências de *T. pretiosum*, foram encontrados 391 sítios conservados, que refletem aproximadamente 73 % do total de 536 sítios encontrados, confirmando a semelhança entre as amostras, bem como a confiabilidade nas sequências obtidas. O número de sítios variáveis foi de 135, os informativos a parcimônia foi de 63 e os sítios de mudança única foram de 70. Uma pequena quantidade de gaps (espaços) foi necessária para alinhar as sequências de *T. pretiosum*, demonstrando que as sequências são muito conservadas. Todos esses dados foram utilizados para a confecção da matriz de distância genética e dendrograma.

6.5.7. Matriz de distância genética

A matriz de distância genética para a região ITS2 do DNA ribossomal, utilizando o modelo P, foi calculada pelo programa MEGA versão 5.0. A média encontrada para essa matriz de distância foi de 0,30. Pode-se verificar que as amostras TPJSP e TPPPMT são semelhantes e as amostras mais próximas foram TPMVCE e TPPPE, TPAES e TPRMT, TPPARS e TPAES, com valores de 0,04. As amostras mais distantes foram TPAES e TPPLMT, TPRMT e TPPLMT, apresentando uma diferença genética de 0,69. As baixas distâncias genéticas entre as populações sugerem que estas constituem um grupo bastante homogêneo. De acordo com os valores encontrados para as 11 localidades, pode-se verificar que existe um alto grau de semelhanças entre as amostras, sugerindo que todas pertencem à mesma espécie, tomando como parâmetro a região ITS2 do DNA ribossomal (Tabela 9).

Tabela 9. Matriz de distância genética da região ITS2 do DNA ribossomal para populações de *Trichogramma pretiosum* em 11 localidades, utilizando o método P.

Amostras	TPCVMT	TPSPMT	TPPLMT	TPRMT	TPPPMT	TPPPB	TPPPE	TPMVCE	TPJSP	TPAES	TPPARS
TPCVMT	0,00										
TPSPMT	0,44	0,00									
TPPLMT	0,62	0,62	0,00								
TPRMT	0,07	0,36	0,69	0,00							
TPPPMT	0,18	0,26	0,44	0,26	0,00						
TPPPB	0,29	0,36	0,55	0,36	0,11	0,00					
TPPPE	0,26	0,36	0,51	0,33	0,11	0,22	0,00				
TPMVCE	0,29	0,40	0,55	0,36	0,15	0,26	0,04	0,00			
TPJSP	0,18	0,26	0,44	0,26	0,00	0,11	0,11	0,15	0,00		
TPAES	0,11	0,36	0,69	0,04	0,29	0,40	0,36	0,40	0,29	0,00	
TPPARS	0,07	0,40	0,66	0,07	0,26	0,36	0,33	0,36	0,26	0,04	0,00

Segundo Begon (2007), é de grande importância a preservação da diversidade genética devido ao potencial evolutivo, ao longo prazo que ela proporciona às populações, pois formas raras de um gene (alelos), ou combinações de alelos, podem não conferir vantagem imediata, mas poderiam tornar-se muito apropriadas no futuro, em resposta a mudanças nas condições ambientais, surgindo problemas pela perda da variabilidade nas pequenas populações.

6.5.8. Análise de agrupamento

De acordo com o dendrograma obtido a partir da matriz de distância genética pelo método do vizinho próximo (Neighbor-Joining), pode-se verificar a presença de quatro grupos: o primeiro, formado pelas populações TPAES, TPPARS, TPRMT e TPCVMT; o segundo, pela população de TPSPMT; o terceiro grupo, pelas populações de TPPPE, TPMVCE, TPPPB, TPPPMT, TPJSP; e o quarto pela população de TPPLMT, sendo a mais distante geneticamente (Figura 3).

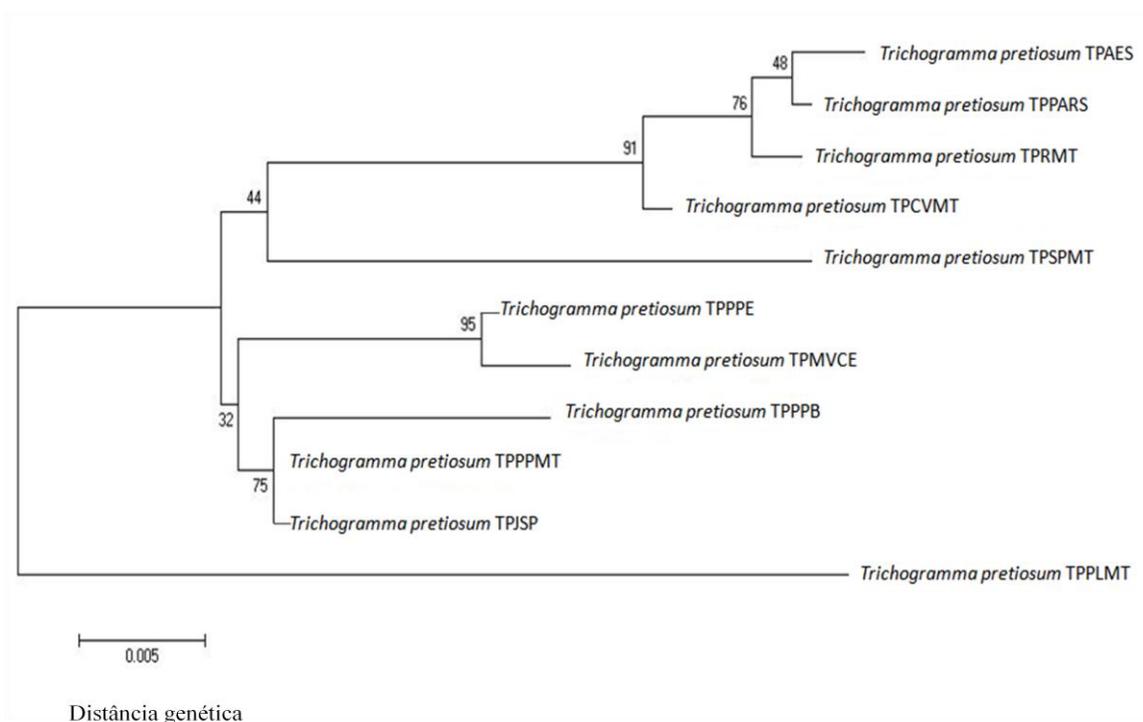


Figura 3. Dendrograma a partir do método NJ com bootstrap de 1000 replicações, agrupando as sequências obtidas.

De modo geral, a semelhança genética entre os grupos determinados, é devida, possivelmente, pelo fato de estas populações estarem inseridas em áreas de cultivo e aspectos ecológicos semelhantes.

6.5.9. Teste de Mantel para a região ITS2 do DNA ribossomal

O teste de Mantel foi utilizado para verificar a correlação entre distância genética e distância geográfica (Tabelas 9 e 10), respectivamente, das populações de *T. pretiosum*. A distância geográfica não afetou a similaridade ou dissimilaridade genética entre os parasitóides, não existindo diferenças significativas entre distância geográfica e a similaridade genética das amostras de *T. pretiosum*, nas localidades coletadas: o coeficiente de correlação obtido foi negativo e não significativo ($r = -0,39$), inferior ao valor crítico gerado pelo programa Mantel ($P < 0,05$), não existindo, portanto, autocorrelação espacial. Dessa forma, as comparações entre as amostras de *T. pretiosum* confirmam ser a mesma espécie, apesar do isolamento geográfico, confirmando a identificação morfológica, como sendo, de fato, *T. pretiosum*.

Tabela 10. Matriz da distância geográfica para populações de *T. pretiosum* em 11 localidades, valores expressos em quilômetros.

Amostras	TPCVMT	TPSPMT	TPPLMT	TPRMT	TPPPMT	TPPPB	TPPPE	TPMVCE	TPJSP	TPAES	TPPARS
TPCVMT	0,00										
TPSPMT	155,95	0,00									
TPPLMT	93,60	138,60	0,00								
TPRMT	117,60	38,40	107,80	0,00							
TPPPMT	141,00	18,60	119,90	24,10	0,00						
TPPPB	2169,00	2164,90	2084,40	2161,80	2154,20	0,00					
TPPPE	1734,00	1724,80	1647,87	1722,64	1714,5	442,45	0,00				
TPMVCE	1976,00	1978,33	1893,07	1973,48	1966,96	207,31	282,11	0,00			
TPJSP	962,36	817,83	894,26	851,76	827,67	1980,20	1563,2	1845,38	0,00		
TPAES	1553,97	1435,39	1468,26	1461,81	1439,65	1596,60	1269,90	1526,23	707,50	0,00	
TPPARS	1662,11	1511,29	1641,45	1549,11	1528,92	2947,50	2553,6	2833,44	1019,00	1418,30	0,00

6.6. Conclusões

1. As amostras coletadas são indistinguíveis em termos moleculares, sugerindo ser a mesma espécie, confirmando a identificação baseada em dados morfológicos para a espécie *T. pretiosum*.
2. O distanciamento geográfico não alterou o grau de semelhanças entre as populações de *T. pretiosum* estudadas.
3. O sequenciamento da região ITS2 do DNA ribossômico nuclear foi uma importante ferramenta para verificar as similaridades e dessimilaridades entre as populações de *T. pretiosum* estudadas.

6.7. Referências Bibliográficas

ALMEIDA, RP de., 2000. Distribution of parasitism by *Trichogramma pretiosum* on the cotton leafworm. *Proceedings Experimental Applied Entomology*, vol.11, p. 27-31.

ALMEIDA, RP de., 2004. *Trichogramma* and its relationship with *Wolbachia*: identification of *Trichogramma* species, phylogeny, transfer and costs of *Wolbachia* symbionts. The Netherlands: Wageningen University. Tese de Doutorado, p. 142.

ALTSCHUL, SF., GISH, W., MILLER, W., MYERS, EW. e LIPMAN, DJ. 1990., Basic local alignment search tool. *Journal Molecular Biology*, vol. 215, p. 403-410.

BALDWIN, BG., SANDERSON, MJ., PORTER, JN., WOJCIECHOWSKI, MF., CAMPBELL, CS. e DONOGHUE, MJ., 1995. The ITS region of nuclear ribosomal DNA: a valuable source of evidence on angiosperm phylogeny. *Annals of the Missouri Botanical Garden*, vol. 92, p. 247-277.

BEGON, M., TOWNSEND, CR. e HARPER, JL., 2007. *Ecologia de Indivíduos a Ecossistemas*. 4ªed, Artmed, Porto Alegre.

BESERRA, EB. e PARRA, JRP., 2003. Comportamento de parasitismo de *Trichogramma atopovirilia* Oatman & Platner e *Trichogramma pretiosum* Riley (Hymenoptera, Trichogrammatidae) em posturas de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera, Noctuidae). *Revista Brasileira de Entomologia*, vol. 47, p. 205-209.

CARVALHO, AOR. e VIEIRA, LGE., 2001. Determinação das condições ótimas para análise de PCR – RAPD em *Atta sexdens rubropilosa* Forel (Hymenoptera: Formicidae) *Neotropical Entomology*, Londrina, vol.4, n.30, p.593-600.

CIOCIOLA- JUNIOR., AI., ZUCCHI, RA. e STOUTHAMER, R., 2001. Molecular key to seven brazilian species of *Trichogramma* (Hymenoptera: Trichogrammatidae) using sequences of the ITS2 region and restriction analysis. *Neotropical Entomology*, vol. 30, no. 2, p. 259-262.

CRUZ, CD., 2008. Programa Genes: Diversidade Genética. Editora UFV. Viçosa (MG), p. 278.

ERSTS, PJ., 2009. Geographic Distance Matrix Generator 1.2.3. Available at http://biodiversityinformatics.amnh.org/open_source/gdmg/

ESPANÑA-LUNA, MP., GONZÁLEZ-HERNÁNDEZ, A., ALVARADO-GÓMEZ, OG. e LOZANO-GUTIÉRREZ, J., 2008. Identificación molecular de especies crípticas de

Trichogramma Westwood (Hymenoptera: Trichogrammatidae) de importancia agrícola en México. *Acta Zoologica Mexicana*, vol. 24 p.1-14.

FIGUEIREDO, GS., REIS, .CM., CASTRO, AS., BISOL, TB. e NETO, CRB., 2003. Reação de seqüenciamento de DNA e purificação – Protocolos Otimizados. Circular Técnica 22. EMBRAPA.

FRANKHAM, R., BALLOW, JD. e MCINNES, KH., 2004. A primer of conservation genetics. Cambridge, UK, Cambridge University Press, p. 234.

GORDON, D. ABAJIAN, C. e GREEN, P., 1998. Consed: a graphical tool for sequence finishing. *Genome Research*, vol 8, p.195-202.

HAIG, SM., 1998. Molecular contributions to conservation. *Ecology*, vol. 79, p. 413-425.

LA SALLE, J. e GAULD, ID., 1993. Hymenoptera and biodiversity. London: *C.A.B International*.348 pp.

MONNERAT, R., BERTIOLI, SL., BERTIOLI, D., BUTT, T. e BORDAT, D., 2004. Variabilidade genética de *Diadegma* sp., parasitóide da traça-das-crucíferas, através de RAPD-PCR. *Horticultura Brasileira*, vol. 22, n. 1, p.90-92.

MORRISON, RK., 1985. *Trichogramma* spp. In: SINGH, P., MOORE, RF. (Eds.). Handbook of insect rearing, vol. 1, p. 413-417.

OOSTERHOUT, CV., HEUVEN, MKV. e BRAKEFIELD, PM., 2004. On the neutrality of molecular genetic markers: pedigree analysis of genetic variations in fragmented populations. *Molecular Ecology*, vol. 13, p. 1025-1034.

ORREGO C. e SILVA, FA., 1993. Genetic variation in the parasitoid wasp *Trichogramma* (Hymenoptera: Trichogrammatidae) revealed by DNA amplification of a section of the nuclear ribosomal repeat. *Florida Entomologist*, vol, 76, p, 519-524.

PARRA, RP., BOTELHO, PSM., CORRÊA-FERREIRA, BS. e BENTO, JMS., 2002. Controle biológico: uma visão inter e multidisciplinar. In: PARRA, JRP., BOTELHO, PSM., CORRÊA-FERREIRA, B.S.; BENTO, JMS. Controle biológico no Brasil: parasitóides e predadores. São Paulo: Manole, p.125-142.

PAGE, RDM. e HOLMES, EC., 1998. Molecular evolution: a phylogenetic approach. 1ed. *Blackwell Science Ltd*, London, UK, p. 346.

PASTORI, PL., MONTEIRO, LB. e BOTTON, M., 2008. Biologia e exigências térmicas de *Trichogramma pretiosum* Riley (Hymenoptera, Trichogrammatidae) “linhagem bonagota” criado em ovos de *Bonagota salubricola* (Meyrick) (Lepidoptera, Tortricidae). *Revista Brasileira de Entomologia*, vol. 52, n.3, p. 472-476.

PEREIRA, FF., BARROS, R. e PRATISSOLI, D., 2004. Desempenho de *Trichogramma pretiosum* Riley e *T. exiguum* Pinto & Platner (Hymenoptera: Trichogrammatidae) submetidos a diferentes densidades de ovos de *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae). *Ciencia Rural*, vol. 34, p.1669-1674.

PEREIRA, JOP., 2006. Diversidade genética da abelha sem ferrão *Melipona* das regiões ITS-1 parcial e 18S do DNA ribossômico nuclear. Universidade Federal do Ceará. Tese de Doutorado, p. 142.

PINTO, JD., 1997. Taxonomia de Trichogrammatidae (Hymenoptera) com ênfase nos gêneros que parasitam Lepidoptera. p. 13-39. In PARRA, JRP. e ZUCCHI, RA. (eds.). *Trichogramma* e o controle biológico aplicado. Piracicaba, FEALQ, p. 324.

PINTO, JD., KOOPMANSCHAP, AB., PLATNER, GR. e STOUTHAMER R., 2002. The North American *Trichogramma* (Hymenoptera: Trichogrammatidae) parasitizing certain Tortricidae (Lepidoptera) on apple and pear, with ITS2 DNA characterizations and description of a new species. *Biological Control*, vol. 23, p. 134-142.

RODRIGUES, SMM. e SAMPAIO, MV., 2011. Armazenamento de *Trichogramma pretiosum* Riley (Hymenoptera: Trichogrammatidae) em baixas temperaturas. Arquivos do Instituto Biológico, vol. 78, n. 1, p. 45-51.

PRATISSOLI D., THULER, RT., ANDRADE, GS., ZANOTTI, LCM. e SILVA, AF. 2005. Estimativa de *Trichogramma pretiosum* para o controle de *Tuta absoluta* em tomateiro estaqueado. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*. vol. 40, p. 715-718.

PRATISSOLI, D., POLANCZYK, RA., VIANA, UR. , ANDRADE, GS. e OLIVEIRA, RGS., 2006. Desempenho de *Trichogramma pratissolii* em ovos de *Anagasta kuehniella* sob efeito de *Bacillus thuringiensis*. *Ciência Rural*, vol. 36, n. 2, p. 369-377.

SCHNEIDER, H., 2003. Métodos de análise filogenética: Um guia prático. 2ª ed. Ribeirão Preto, Holo, p. 114.

SOKAL, RR. e ROHLF, FJ., 1995. Biometry: the principles and practice of statistics in biological research. New York, Freeman. p. 887.

STOUTHAMER, R., HU, J., VAN KAN, FJPM., PLATNER, GR. e PINTO, JD., 1999. The utility of internally transcribed spacer 2 DNA sequences of the nuclear ribosomal gene for distinguishing sibling species of *Trichogramma*. *BioControl*, vol. 43, p. 421-440.

TAMURA, K. PETERSON D., PETERSON N., STECHER G., NEI, M. e KUMAR S., 2011. MEGA: molecular evolutionary genetics analysis, version 5.0. Tokyo: Metropolitan University, Pennsylvani: University Park, Arizona: State University.

THOMPSON, JD., GIBSON, T J., PLEWNIAC, F., JEANMOUGIN, F. e HIGGINS, DG., 1997. The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Research*, vol. 24, p. 4876 - 4882.

VAN KAN, FJPM., SILVA, IS., SCHILTHUIZEN M., PINTO JD e STOUTHAMER, R., 1996. Use of DNA-based methods for the identification of minute wasps of the genus *Trichogramma*. *Proceedings of the Section Experimental and Applied Entomology*, vol. 7, p. 233-237.

VANLERBERGHE-MASUTTI F., 1994. Molecular identification and phylogeny of parasitic wasp species (Hymenoptera : Trichogrammatidae) by mitochondrial DNA RFLP and RAPD markers. *Molecular Biology*, vol. 3, p. 229-237.

VIANNA, UR., PRATISSOLI, D., ZANUNCIO, JC., ALENCAR, JRCC. e ZINGER, FD., 2011. Espécies e/ ou linhagens de *Trichogramma* SPP. (Hymenoptera: Trichogrammatidae) para o controle de *Anticarsia gemmatalis* (Lepdoptera: Noctuidae) *Arquivos do Instituto Biológico*, vol.78, n.1, p.81-87.

VOLPE, HL., BORTOLI, SA., THULER, RT DE., VIANA, CLTP. e GOULART, RM., 2006. Avaliação de características biológicas de *Trichogramma pretiosum* Riley (Hymenoptera, Trichogrammatidae) criado em três hospedeiros. *Arquivos do Instituto Biológico*, vol. 73, n.3, p.311-315.

ZUCCHI, OLAD., PARRA, JRP., SILVERA-NETO, S. e ZUCCHI, RA., 1989. Desenvolvimento de um modelo determinístico compartimental para simular o controle de *Heliiothis virescens* (Fabr., 1781) através de *Trichogramma* spp. *Anais da Sociedade Entomológica do Brasil*, vol. 2, p. 357-365.

7. CAPÍTULO III

Detecção de Bactérias do Gênero *Wolbachia* em Populações de *Trichogramma pretiosum* Riley, 1879 (Hymenoptera:Trichogrammatidae)

7.1. Resumo

Espécies do gênero *Wolbachia* são simbioses facultativos comuns aos artrópodes e estão relacionadas à manipulação do sistema de reprodução, podendo induzir alterações reprodutivas. A detecção da presença desse simbiote em novas espécies de *Trichogramma* poderá contribuir para formação de novos grupos de *Wolbachia* associados à *Trichogramma*, além de possibilitar estudos da relação simbiote-parasitóide e permitir a seleção de populações a serem utilizadas em programas de controle biológico aplicado. Este trabalho teve por objetivo detectar em populações de *Trichogramma pretiosum* bactérias do gênero *Wolbachia* coletadas em diferentes regiões geográficas do Brasil. Cinco espécimes de *Trichogramma pretiosum* de cada população foram homogeneizadas em 100 µl chelex 5% e 4 µl de proteinase K. Na reação de PCR as amplificações foram realizadas com primers específicos (wsp), com um volume final da reação de 25 µl. O tamanho dos produtos de PCR foi determinado utilizando um marcador de peso molecular de 100 pb, sendo utilizado um controle negativo (sem DNA) e um controle positivo (com *Wolbachia*). Foi detectada a presença da endobactéria com base na amplificação do fragmento com aproximadamente 600 pb. Das populações analisadas, a presença da endobactéria ocorreu na população proveniente do Estado do Espírito Santo, sendo o primeiro registro local da presença de *Wolbachia* para a espécie.

Palavras - chave: Proteobactéria, simbiote, parasitóide.

7.2.

Abstract

Species of the genus *Wolbachia* are facultative symbionts common to arthropods and are related to the manipulation of the reproductive system and may cause reproductive disturbances. Detecting the presence of this symbiont in new species of *Trichogramma* may possibly contribute to the formation of new groups of *Wolbachia* associated to *Trichogramma*, in addition to enabling the study of parasitoid-symbiont relations and allow the selection of populations for use in applied biological control programs. This work aimed to detect in populations of *Trichogramma pretiosum* bacteria of the genus *Wolbachia* in different geographic regions of Brazil. Five specimens of *Trichogramma pretiosum* from each population were homogenized in 100 µl chelex 5% and 4 µl of proteinase K. The PCR amplifications were run with specific wsp primers, with a final reaction volume of 25 µl. The size of the PCR products was determined using a 100 bp molecular weight marker, having used a negative control (without *Wolbachia* DNA) and a positive control (with *Wolbachia* DNA). The presence of the endobacteria, based on amplification of the fragment with approximately 600 bp, was detected. From the analyzed populations, the presence of the endobacteria was found in the population from the state of Espírito Santo, being the first local record of the presence of *Wolbachia* in this species.

Keywords: Proteobacteria, symbiont, parasitoid.

7.3. Introdução

Espécies do gênero *Wolbachia* são bactérias intracelulares que têm sido encontradas na maioria dos artrópodes (Werren et al., 1995). Seu primeiro relato foi feito nas células do tecido reprodutivo do mosquito *Culex pipiens* Linnaeus, 1758 (Diptera: Culicidae) (Hertig e Wolbach, 1924).

São transmitidas através do citoplasma do ovo materno de seus hospedeiros para prole (transmissão vertical), assim como pela herança mitocondrial. Porém, a transmissão horizontal também foi sugerida como um possível mecanismo, a partir de isolados idênticos ou quase idênticos na sequência dos genes *ftsZ* (de ciclo celular) e *wsp* (de proteína de superfície) obtidos de hospedeiros das diferentes ordens (Coleoptera, Diptera, Hymenoptera e Lepidoptera) (Stouthamer, 1990). Inúmeros estudos são realizados com estas bactérias devido às alterações reprodutivas que podem causar em seus hospedeiros, como a incompatibilidade citoplasmática (IC) (O' Neill e Karr, 1990), a indução de paternogênese (Stouthamer, 1990), a feminização e morte de machos (Rousset et al., 1992). Essas bactérias endossimbiontes, além de provocarem alterações na reprodução, podem alterar vários atributos biológicos do hospedeiro, afetando sua aptidão biológica (Werren, 1997). Podem afetar processos evolutivos incluindo seleção sexual (Jiggins et al., 2000), determinação sexual (Rigaud et al., 1997) e especiação (Bordenstein et al., 2006) em seus hospedeiros artrópodes.

Foram encontradas espécies do gênero *Wolbachia* em 76% dos artrópodes (Jeyaprakash e Hoy, 2000) e extrapolações dessas estimativas sugerem que milhões de espécies de insetos podem estar infectadas por *Wolbachia*, fazendo desta bactéria um dos principais parasitas dos insetos (Shoemaker et al., 2003).

A combinação do uso de primers e as análises com base em filogenética molecular, possibilitaram que as espécies do gênero *Wolbachia* fossem divididas em onze supergrupos (A-K) (Lo et al., 2002., Ros et al., 2009).

Muitos autores discutem a possibilidade do uso dessas endobactérias em programas de controle biológico (Martins et al., 2007). Sua ocorrência em populações naturais pode ser um fator importante em termos de controle, existindo grande interesse na possível utilização desta endobactéria em controle biológico (Beard et al., 1993; Stouthamer, 1993; Girin e Bouletreau, 1995). Como as endobactérias atuam na reprodução dos insetos hospedeiros podem aumentar a taxa relativa de transmissão de linhagens infectadas (O'Neill et al., 1992; Bandi et al., 1998; Stouthamer et al., 1999).

A necessidade do uso de critérios adequados para avaliar a qualidade do parasitóide, antes de serem liberados é um pré-requisito para o sucesso no controle biológico. Embora um grande número de trabalhos tenha sido feitos para melhorar as estratégias de controle biológico, pouco têm sido estudado em espécies do gênero *Trichogramma* infectadas com essas bactérias do gênero *Wolbachia*, sendo poucos os estudos feitos para testar o desempenho de vespas infectadas com essas bactérias em comparação com aquelas livres da infecção (Almeida et al., 2010). O uso de formas partenogenéticas e suas vantagens no controle biológico de insetos pragas tem sido sugeridas (Almeida, et al., 2010).

Assim, dado o potencial de *Trichogramma* como agente de controle biológico e o papel desses simbiossomas em sua biologia, esse trabalho teve como objetivo verificar a presença de bactérias do gênero *Wolbachia* em populações de *Trichogramma pretiosum* encontradas no Brasil.

7.4. Material e Métodos

7.4.1. Obtenção das amostras de *Trichogramma pretiosum*

As populações de *Trichogramma pretiosum* utilizadas no estudo foram obtidas de oito localidades do Brasil (Tabela 1) e conduzidas ao Laboratório de Entomologia da Embrapa Algodão, Campina Grande, PB. Amostras das populações foram encaminhadas para a taxonomista em Trichogrammatidae, Dra. Ranyse Barbosa Querino (Embrapa Meio-Norte), para confirmação da espécie. Os estudos moleculares foram realizados no laboratório de Biotecnologia da Embrapa-Algodão - Campina Grande. Utilizou-se uma população de *T. pretiosum* originária do México (Obtida do Laboratório de Entomologia da Universidade de Wageningen, Holanda), (Almeida, 2004), como controle positivo contendo *Wolbachia*.

Tabela 1. Amostras de *Trichogramma pretiosum* de oito localidades do Brasil

Região	Município /Estado	Amostras
Centro-Oeste	Pedra Preta/Mato Grosso	TPPPMT
Nordeste	Bahia	TPBA
	Patos/Paraíba	TPPPB
	Petrolina/Pernambuco	TPPPE
	Missão velha/Ceará	TPMVCE
Sudeste	Jaboticabal/ São Paulo	TPJSP
	Alegre/Espírito Santo	TPPES
Sul	Porto Alegre/Rio Grande do Sul	TPPARS

7.4.2. Extração de DNA e PCR para detecção de *Wolbachia* em *Trichogramma pretiosum*

Cinco espécimes de *Trichogramma pretiosum* de cada amostra foram homogeneizadas em 100 µl chelex 5% e 4 µl de proteinase K. O homogenato foi incubado em banho-maria a 56° C por 6 horas, seguido de 10 minutos a 95° C.

As reações de amplificações foram realizadas por PCR utilizando-se os primers específicos (Tabela 2).

Tabela 2. Primers usados nas reações de PCR (Braig et al., 1998)

Primer	Sequência (5' → 3')
wsp - 81F	TGGTCCAATAATAAGTGATGAAGAAAC
wsp - 691R	AAAAATTAAACGCTACTCCA

Em um tubo tipo eppendorf foram misturados os componentes nos volumes especificados (Tabela 3). Na reação de PCR foi utilizado um controle negativo sem DNA e o restante dos componentes e um controle positivo para *Wolbachia*.

Tabela 3. Componentes e volumes utilizados na preparação das reações de PCR

Constituintes da reação de PCR	Volume utilizado
Tampão de reação 10X	2,5 µl
dNTP's	0,5 µl
Primer Forward	0,5 µl
Primer Reverse	0,5 µl
DNA genômico	2,5 µl
H ₂ O	16,70 µl
Taq DNA polimerase	0,25 µl
MgCl ₂	2,0 ul

As amplificações foram realizadas com volume final da reação de 25 µl em um termociclador programado para 94° C por 3 min, seguido por 40 ciclos a 94° C por 1 min, 50° C por 1 min, 72° C por 1 min e um ciclo final de 72° C por 5 min. Após o último ciclo,

as amostras permaneceram estocadas a 4⁰C no termociclador até serem armazenadas em freezer a 0⁰C (Almeida, 2004).

Para a análise do produto da reação, uma alíquota de 10 µl foi removida e submetida à eletroforese em gel de agarose 0,8% no tampão tris-Borato-EDTA / TBE (Tris 0,089 M; Ácido bórico 0,0089 M; EDTA 0,002 M, pH 8,3) 1,0X, corado com Sybr Green, com corrida eletroforética realizada a uma voltagem constante de 100V e visualizado em um transiluminador de ultravioleta. O tamanho dos produtos de PCR foi determinado utilizando um marcador de peso molecular de 100 pb. O fragmento amplificado pelos iniciadores wsp 81 F e wsp 691 R na detecção de bactérias do gênero *Wolbachia* (Obtida do Laboratório de Entomologia da Universidade de Wageningen, Holanda), utilizado como controle positivo foi sequenciado para confirmar a sua presença.

7.5. Resultados e Discussão

A detecção de bactérias do gênero *Wolbachia* em amostras de *Trichogramma pretiosum* coletadas no Brasil, foi visualizada com base na amplificação do fragmento do gene *wsp*, com banda de aproximadamente 600 pb. A detecção da infecção por *Wolbachia* tem se baseado em grande parte com a amplificação de DNA utilizando alelo-específico em reação de cadeia da polimerase (Almeida et al., 2001).

Das populações analisadas, a presença da endobactéria ocorreu apenas na população proveniente do Estado do Espírito Santo correspondente a amostra 6 e 1 - TPAES (Figura 1. A, B), sendo o primeiro registro de *Wolbachia* para a espécie no local.

Em populações naturais deve ser obrigatoriamente necessária uma reamplificação da reação de PCR em estudo da prevalência de infecção por bactérias do gênero *Wolbachia*, pois resultados falsos negativos podem ocorrer e levar a uma interpretação errônea (Nogueira, 2006).

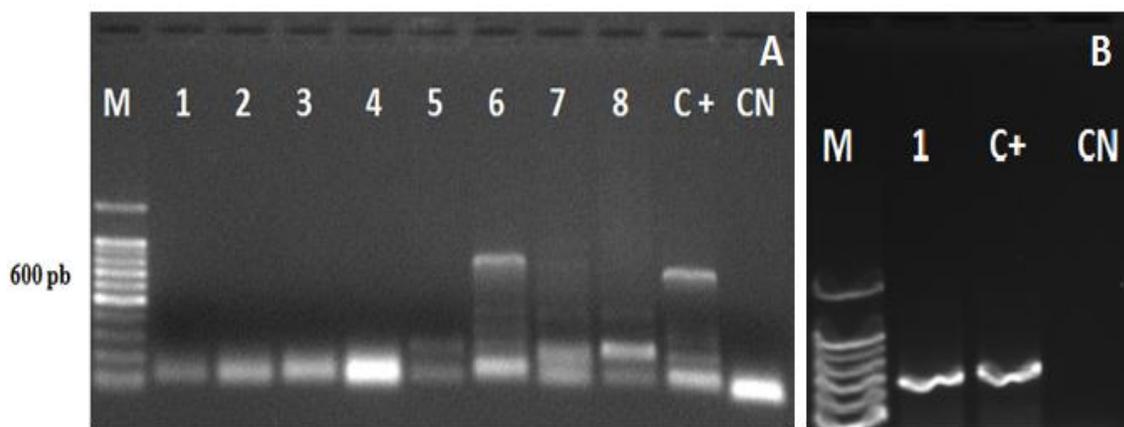


Figura 1. A - Reação de PCR de amostras de *T. Pretiosum*, (Colunas de 1 a 8), sendo (M) o marcador de peso molecular (100 pb); 1- TPPPMT; 2 - TPBA; 3 - TPPPB; 4 - TPPPE; 5 - TPMVCE; 6 - TPAES; 7- TPJSP; 8 - TPPARS; C + Controle Positivo e CN - Controle Negativo (amostra sem DNA). B - Reamplificação para confirmação da presença da bactéria do gênero *Wolbachia*, sendo (M) o marcador de peso molecular (100 pb); 1 - amostra de TPAES; C + Controle Positivo, CN Controle Negativo (amostra sem DNA).

Os estudos com informações sobre as espécies infectadas por bactérias do gênero *Wolbachia* vêm ganhando atenção na comunidade científica na América do sul, especialmente no Brasil e espera-se que o número de espécies infectadas, principalmente de artrópodes por *Wolbachia* seja muito alto (Almerão, 2009). Apesar das descobertas e avanços, as investigações acerca da presença de bactérias do gênero *Wolbachia* em espécies de *Trichogramma* no Brasil ainda são escassas.

Almeida et al. (2001) identificaram pela primeira vez, à presença de *Wolbachia* induzindo partenogênese em uma população de *T. pretiosum* coletada em Santa Catarina/Brasil, sendo sugerida populações partenogenéticas no controle biológico de insetos pragas (Almeida, et al., 2010). Ciociola Jr. et al. (2001) que também identificaram pela primeira vez no Brasil, no município de Sete Lagoas/Minas Gerais de clima tropical de altitude, com temperatura mais amena a presença de *Wolbachia* em uma população de *Trichogramma atapovirilia* Oatman e Platner, 1983 (Hymenoptera: Trichogrammatidae), por meio da técnica de PCR com o primer específico *wsp*. É importante ressaltar que a presença de *Wolbachia* em espécies de *Trichogramma* em um país de clima de tropical, com temperaturas elevadas, faz com que as populações de *Trichogramma* inicialmente telítocas passem a ser sexuadas, pois essas endobactérias não suportam calor (Ciociola Jr. et al., 2001). Entretanto Pintureau et al. (1999) estudando o efeito de altas temperaturas em populações de *Trichogramma cordubensis* Vargas e Cabello, 1985 (Hymenoptera: Trichogrammatidae), concluíram que existem possibilidades de adaptação dessas populações a altas temperaturas.

7.6. Conclusão

A amplificação utilizando a técnica de PCR de um fragmento do gene *wsp*, confirmou a presença da bactéria do gênero *Wolbachia* em população de *Trichogramma pretiosum* encontrada no Espírito Santo.

7.7. Referências Bibliográficas

ALMEIDA, RP. de., LENTEREN, JCV. e STOUTHAMER, R., 2010. Does *Wolbachia* infection affect *Trichogramma atopovirilia* behaviour? *Brazilian Journal. Biology*, vol. 70, no. 2, p. 435-442.

ALMEIDA, RP. de., 2004. *Trichogramma* and its relationship with *Wolbachia*: identification of *Trichogramma* species, phylogeny, transfer and costs of *Wolbachia* symbionts. The Netherlands: Wageningen University. Tese de doutorado, p. 142.

ALMEIDA, RP., CIOCIOLA-JÚNIOR, AI. e STOUTHAMER, R., 2001. *Wolbachia*-induced parthenogenesis: the first report in a Brazilian *Trichogramma pretiosum* population. In Annual Meeting of Entomologists in the Netherlands. *Proceedings of the Section Experimental and Applied Entomology*, vol. 12, p. 41-44.

ALMERÃO, MP., 2009. Primeiro registro de *Wolbachia* (Proteobacteria, Rickettsiales) em Isópodos Terrestres na América do Sul: Prevalência, Aspectos Fologenéticos de Suas Linhagens e Seu Possível Impacto Sobre a Estruturação Populacional Estimada Através de um Loco Mitocondrial Em Duas Espécies do Gênero *Balloniscus* (Crustacea: Oniscidea). Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Tese de doutorado, p. 147.

BANDI C, ANDERSON TJC, GENCHI C. e BLAXTER ML., 1998. Phylogeny of *Wolbachia*-like bacteria in filarial nematodes. *Proceedings of the Royal Society*, vol. 265, p. 2407–2413.

BEARD, CB., O'NEILL, SL., TESH, RB., RICHARD, FF. e AKSOY, S., 1993. Modification of arthropod vector competence via symbiotic bacteria. *Parasitology Today*, vol. 9, p. 179-183.

BORDENSTEIN, SR., MARSHALL, ML., FRY, AJ., KIM, U. e WERNEGREN, JJ., 2006. The tripartite associations between bacteriophage, *Wolbachia*, and arthropods. *PLoS Pathogens*, vol.2, no. 5, p.384-393.

BRAIG, HR., ZHOU, W., DOBSON, S. e O'NEILL, SL., 1998. Cloning and characterisation of a gene encoding the major surface protein of the bacterial endosymbiont *Wolbachia pipientis*. *Journal Bacteriology*, vol.180, p. 2373-2378.

CIOCIOLA-JÚNIOR, AI., ALMEIDA, RP., ZUCCHI, RA. e STOUTHAMER, R., 2001. Detecção de *Wolbachia* em uma população telítica de *Trichogramma atopovirilia* Oataman & Platner (Hymenoptera: Trichogrammatidae) via PCR com o primer específico wsp. *Neotropical Entomology*, vol.30, n.3, p. 489-491.

GIRIN, C. e BOULETREAU, M., 1995. Microorganism-associated variation in host infestation efficiency in a parasitoid wasp, *Trichogramma boutatachae* (Hymenoptera, Trichogrammatidae). *Experientia*, vol. 51, p. 398-401.

HERTIG, M. e WOLBACH, SB., 1924. Studies on rickettsia-like microorganism in insects. *Journal of Medical Research*. vol. 44, p. 329-374.

JEYAPRAKASH, A. e HOY, MA., 2000. Long PCR improves Wolbachia DNA amplification: wsp sequences found in 76% of sixty-three arthropod species. *Insect Molecular Biology*, vol. 9, p. 393-405.

JIGGINS, FM., HURST, GD. e MAJERUS, ME., 2000. Sex-ratio-distorting Wolbachia causes sex role reversal in its butterfly hosts. *Proceedings of the Royal Society of London Series Biology*, vol. 267, p.69-73.

LO, N., CASIRAGHI, M., SALATI, E., BAZZOCCHI, C. e BANDI, C., 2002. How many Wolbachia supergroups exist? *Molecular Biology and Evolution*, vol.19, n.3, p.341-346.

MARTINS, C., BUENO, OC. e MARTINS, VG., 2007. Detecção de Wolbachia em operárias de lava-pés, *Solenopsis* via PCR com o primer específico WSP. *Biológico*, São Paulo, vol.69, p.413-414.

NOGUEIRA, LA., 2006. Detecção e dinâmica da infecção da bactéria Wolbachia em mosquitos. *Aedes albopictus* (Díptera: Culicidae). Universidade Estadual Paulista. Instituto de Biociências de Botucatu. Dissertação de Mestrado. p. 109.

O'NEILL, SL. e KARR, TL., 1990. Bidirectional incompatibility between conspecific populations of *Drosophila simulans*. *Nature*, vol. 348, p. 178-180.

O'NEILL, SL., GIORDANO, R., COLBERT, AME., KARR, TL. e ROBERTSON, HM., 1992. 16S rRNA phylogenetic analysis of the bacterial endosymbionts associated with cytoplasmic incompatibility in insects. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol.89, p.2699-2702.

PINTUREAU, B., CHAPELLE, L. e DELOBEL, B., 1999. Effects of repeated and antibiotic treatments on a *Trichogramma* (Hymenoptera, Trichogrammatidae) symbiont. *Journal Applied Entomology*, vol, 123, p. 473-483.

RIGAUD, T., JUCHAULT, P. e MOCQUARD, JP., 1997. The evolution of sex determination in isopod crustaceans. *BioEssays*, vol.19, p.409-416.

ROS, VI., FLEMING, VM., FEIL, EJ. e BREEUWER, JA., 2009. How diverse is the genus Wolbachia? Multiple-gene sequencing reveals a putatively new Wolbachia supergroup recovered from spider mites (Acari: Tetranychidae). *Applied and Environmental Microbiology*, vol.75, n.4, p. 1036-1043.

ROUSSET, F., VAUTRIN, D. e SOLIGNAC, M., 1992. Molecular identification of Wolbachia, the agente of cytoplasmic incompatibility in *Drosophila simulans*, and variability in relation with host mitochondrial types. *Proceedings of the Royal Society of London Series Biology*, vol.247, p.163-168.

SHOEMAKER, DD., AHRENS, M., SHEIL, L., MESCHER, M., KELLER, L. e ROSS, KG., 2003. Distribution and prevalence of Wolbachia infections in native populations of the fire ant *Solenopsis invicta* (Hymenoptera: Formicidae). *Population Ecology*, vol.32, p.1329-1336.

STOUTHAMER, R., PINTO, JD., PLATNER, GR. e LUCK, RF., 1990. Taxonomic status of thelytokous forms of *Trichogramma* (Hymenoptera: Trichogrammatidae). *Annals of the Entomological Society of America*, vol. 83, p.475-581.

STOUTHAMER, R. e WERREN, JH., 1993. Microbes associated with parthenogenesis in wasps of the genus *Trichogramma*. *Journal of Invertebrate Pathology*, vol.61, p. 6-9.

STOUTHAMER, R., KAN, FJ PMV., PLATNER, GR. e PINTO, JD., 1999. The utility of internally transcribed spacer 2 DNA sequences of the nuclear ribosomal gene for distinguishing sibling species of *Trichogramma*. *Biocontrol*, vol. 43, p. 421-440.

WEREN, JH., 1997. Biology of *Wolbachia*. *Annual Review of Entomology*, vol. 42, p. 587-609.

WERREN, JH., WINDSOR, DW. e GUO, L., 1995. Distribution of *Wolbachia* in neotropical arthropods. *Proceedings of the Royal Society of London Series Biology*, vol.262, p. 147-204.

8. SUGESTÕES PARA NOVAS PESQUISAS

- Estudos utilizando dados combinados com caracteres morfológicos e moleculares devem ser realizados, para que sejam resolvidas dúvidas taxonômicas em espécies crípticas de *Trichogramma*.
- Ampliar o número de amostras de *T. pretiosum* e das demais espécies de *Trichogramma* em diversas culturas agrícolas e em áreas de reservas florestais, com realização de coletas em todas as regiões do Brasil, onde essas espécies ainda não foram relatadas, proporcionará uma maior visão de sua diversidade.
- Outras técnicas de biologia molecular, como Microsatélite, devem ser testadas e comparadas, a fim de confirmar ainda mais a proximidade entre as populações de *Trichogramma pretiosum*.
- Ampliar o número de amostras de *T. pretiosum* e demais espécies de *Trichogramma*, para seja possível verificar a existência de bactérias do gênero *Wolbachia*, onde ainda não foi relatada.
- Realizar estudos em laboratório sobre o comportamento de espécies ou populações de *Trichogramma* na presença da bactéria do gênero *Wolbachia*.

9. APÊNDICES

9.1. Sequências consenso obtidas da regiões ITS2 do DNA ribossomal de espécies de *Trichogramma* estudadas alinhadas no BLAST/GenBank

Amostra *Trichogramma galloi*

```

Nilene_A04_2x-T5_02
>gb|AY182764.1| Trichogramma galloi internal transcribed spacer 2, complete
sequence
Length=445

Score = 652 bits (353), Expect = 0.0
Identities = 402/442 (91%), Gaps = 4/442 (1%)
Strand=Plus/Minus

Query 9      GAG-AAG-AAGACTCATTCAACAAAATTTGACGAGCAAATTTTTATATTATCCGACCTAG 66
      ||| ||| |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct 442     GAGAAAGAAAGACTCATTCAACAAAATTTGACGAGCAAATTTTTATATTATCCGAACCTAG 383

Query 67     CCGTACAgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgTTTCNATAACCGAATN-TNGGANGAGCNTGANCGTG 125
      ||||||||||||||||||||||||||||| ||||||||| | ||| |||| ||| |||||
Sbjct 382     CCGTACAGCGCGCGCGCGCGCGCGGTTTCGATAACCGAATCAT-GGACGAGCCTGATCGTG 324

Query 126    TTCTAGCAGTNGGTCCGNTGCTCGANGAGGCGAGAAGCTCNGGGACTCGACGCANTACGA 185
      ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
Sbjct 323    TTCTAGCAGTCGGTCCGCTGCTCGACGAGGCGAGAAGCTCCGGGACTCGACGCAGTACGA 264

Query 186    TCGGAAGTTCTCGCGCTAAGCGGAACTCTCCAAGNGGTAAGCGCGCGCACGCCAGCTAG 245
      |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct 263    TCGGAAGTTCTCGCGCTAAGCGGAACTCTCCAAGCGGTAAGCGCGCGCACGCCAGCTAG 204

Query 246    anaaannaatTCATCTTTTTTCGTGCGTTTCGTNTGNGGCGACGCGTATCTCaaaaaaC 305
      |  |  |  ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||| |||||
Sbjct 203    ACGAACGAATTCATCTTTTTTCTGCGTTTCGTTCGTTGAGGCGACGCGTATCTCAAAAAAAC 144

Query 306    CCGCGCACACACGNTGCTCTCNTACTCGNTACTACGTGAGTANTAGTGNTagagagagag 365
      ||||||||||||| ||||| ||||| ||||||||||||| ||||| |||||||||
Sbjct 143    CCGCGCACACACGCTGCTCTTACTCGCTACTACGTGAGTAGTAGTGCTAGAGAGAGAG 84

Query 366    agatgtgcnnagannagagagagagTCNCGAGCGCCANATNAACNCTCTCTCGNGAGAG 425
      ||||| |||| | ||||||||| ||||||||| || ||| ||||| |||||
Sbjct 83     AGATGTGCACGAGATTGAGAGAGAGTCACGAGCGCCAGATCAACGCTCTCTCGCGAGAG 24

Query 426    CAGTNGGGTTNNTTTTTATAAA 447
      |||| ||||| |||||||||
Sbjct 23     CAGTCGGGTTTCGTTTTATAAA 2
    
```

Amostra *Trichogramma pretiosum*

>gb|DQ525178.1| *Trichogramma pretiosum* from USA 5.8S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence
 Length=526

Score = 797 bits (431), Expect = 0.0
 Identities = 482/509 (95%), Gaps = 12/509 (2%)
 Strand=Plus/Minus

```

Query 7   CGAT-GAG-AAAAAGACTCGTTGTTGTTGTTTCGAGCTAGCCAGGCGCTATAATAAAATCC 64
      ||||| ||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
Sbjct 504  CGATCGAGAAAAAAGACTCGTTGTTGTTGTTTCGAGCTAGCCAGGCGCTATAATAAAAT-A 446

Query 65  CCGAGAGCGCGNGNGCGCCTTTCTAGTGTACCGAATCATGGTACNAGCCTGATCGTGTAC 124
      ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
Sbjct 445  GCGAGAGCGCGCGCGCGCCTTTCTAGTGTACCGAATCATGG-ACGAGCCTGATCGTGTAC 387

Query 125 TGACAGTCGGTCCGCTGCTCGACGAGGCGAGAAGCTCCGGGACTCGAACGCAGAACGATC 184
      ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
Sbjct 386  TGACAGTCGGTCCGCTGCTCGACGAGGCGAGAAGCTCCGGGACTCGAACGCAGAACGATC 327

Query 185  GGAAGTACTCGCGCGCTTTTACACACGTGAGTACTCTCCAAGCGGTAAGCGCGCGGCCA 244
      ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
Sbjct 326  GGAAGTACTCGCGCGCTTTTACACACGTGAGTACTCTCCAAGCGGTAAGCGCGCGGCCA 267

Query 245  GCCAGACGAACGCCAATTCATCTTTTCTCTTTCGTTTCGTTTGAGGCGACGTGTGCGAGC 304
      ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
Sbjct 266  GCCAGACGAACGCCAATTCATCTTTTCTCTTTCGTTTCGTTTGAGGCGACGTGTGCGAGC 207

Query 305  ACACGCACACTGCTGCTATACTCTGAGAGAGAGCAAGAGATAGTGTGTG--TGTGCGCGA 362
      ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
Sbjct 206  ACACGCACACTGCTGCTATACTCTGAGAGAG--CAAGAGATAGTGTGTGCGTGTGCGCGA 149

Query 363  CACGAGCGCCCAGATCAACGCTCTCTCTTGCGAGAGAGCAGTCGGGTTTCGTTTTTATAAA 422
      ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
Sbjct 148  CACGAGCGCCCAGATCAACGCTCTCTCTTGCGAGAGAGCAGTCGGGTTTCGTTTTTATAAA 89

Query 423  CGACCCCTCANCCAGGCGTGGTCCGGGAACNAGATCCGTGGACCGCAA-TGTGNTTTCNAA 481
      ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
Sbjct 88   CGACCCCTCAGCCAGGCGTGGTCCGGGAACGAGATCCGTGGA--GCAAATGTGCGTTCCTT 31

Query 482  ATGNCGATGTTTCATGTGTCCTGCANTTCA 510
      || | ||||| ||||| ||||| |||||
Sbjct 30   -TGTC AATGTTTCATGTGTCCTGCAGTTCA 3
  
```

Amostra *Trichogramma exiguum*

>gb|AY182769.1| *Trichogramma exiguum* internal transcribed spacer 2, complete sequence
 Length=381

Score = 527 bits (285), Expect = 3e-146
 Identities = 346/378 (92%), Gaps = 11/378 (3%)
 Strand=Plus/Minus

```

Query 25  AAG-AAGA-TCATTCGC-AAATTCGAGGTGGCCAA--tgtgtgtgtgtgtTTTTTC-TCTN 78
      ||| |||| ||||||| ||||||| ||||||| ||||||| ||||||| ||||||| |||
Sbjct 374  AAGAAAGACTCATTCGCAAATTCGAGCTGGCCAATGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTTCACAC-A 316

Query 79  CGCACGCGNGGGAACACATTCTAGAACCGAATCATGGGANGATTGATCGTGTGCTAGA 138
      | ||||| | | ||||||| ||||||| ||||||| ||| | | ||||||| |||||||
Sbjct 315  CACACGCGCGCACACATTCTAGAACCGAATCAT-GGACGAGCCTGATCGTGTGCTAGA 257

Query 139 AAANGGTCCGCTGCTCGTTTATGAGGCGAGAAGCTCCGGGACTCGACGCAGAACGATCGG 198
      ||||||| ||||||| ||||||| ||||||| ||||||| ||||||| ||||||| |||
Sbjct 256  CGTCGGTCCGCTGCTCGTTTATGAGGCGAGAAGCTCCGGGACTCGACGCAGAACGATCGG 197

Query 199 AAGTGCACGTTTTTNCACGAGCACTCTCCAAGNGNNAAGCGTGCGGCCAGCCAGACGAA 258
      ||||||| ||| ||||||| ||||||| ||||||| ||||||| ||||||| ||||||| |||
Sbjct 196  AAGTGCACGCTTTTACACGAGCACTCTCCAAGCGGTAAGCGTGCGGCCAGCCAGACGAA 137

Query 259 GGAATTTTCATCTTTTTTCTTGCGTTTCGTTTGAGGCGACGTATCCATCAACGCTCTCgag 318
      ||||||| ||||||| ||||||| ||||||| ||||||| ||||||| ||||||| |||
Sbjct 136  GGAATTTTCATCTTTTTTCTTGCGTTTCGTTTGAGGCGACGTATCCATCG-CGCTCTCGAG 78

Query 319 agagagagagagaTGGAGACGAGCGCCAGATCAACGCTCTTCTCTTGCGAGAGAGCAGT 378
      |||| | ||||||| ||||||| ||||||| ||||||| ||||||| ||||||| |||
Sbjct 77  AGAG-G-GAGAGATGGAGACGAGCGCCAGATCAACGCTCTTCTCTTGCGAGAGAGCAGT 20

Query 379 CGGGTTCGTTTTTATAAA 396
      ||||||| |||||||
Sbjct 19  CGGGTTCGTTTTTATAAA 2
  
```


Trichogramma pretiosum – Amostra TPPLMT

*Trichogramma pretiosum*_TPPLMT

>gb|JF306651.1| *Trichogramma pretiosum* isolate 10A internal transcribed spacer
2, partial sequence
Length=413

Score = 414 bits (224), Expect = 2e-112
Identities = 297/338 (88%), Gaps = 7/338 (2%)
Strand=Plus/Minus

```

Query   6      CGACGAGAAAAGACTCGTTGTTGTTGTTTCGAGCTAGCCAGGCGCTATAATAAAACNNNGA   65
      ||| || |||||
Sbjct  411    CGA-GAAAAAAGACTCGTTGTTGTTGTTTCGAGCTAGCCAGGCGCTATAATAAAATAGCGA   353

Query   66      GAGCGGNNNAAGCCTTTCTAGTGTACCGAATCATGGTTCNCNG-NTGATCGNGGaaan   124
      ||||| |
Sbjct  352    GAGCGCG-CGCGCGCCTTTCTAGTGTACCGAATCATGG-AC-GAGCCTGATCGTGTACTG   296

Query   125     anaGTCGGTCCGCTGCTCGACGAGGCGAGAAGCTCCGGGACTCGAACGCAGAACGATCGG   184
      | |||||
Sbjct  295    ACAGTCGGTCCGCTGCTCGACGAGGCGAGAAGCTCCGGGACTCGAACGCAGAACGATCGG   236

Query   185     AAGTACTTTTNCCTTTACACACGTGNGGAAAANACAAGCGGTAAGCGCGCGGCCAGC   244
      ||||| |
Sbjct  235    AAGTACTCGCGCGCTTTTACACACGTGAGTACTCTCCAAGCGGTAAGCGCGCGGCCAGC   176

Query   245     CAGACGAACGCCAATTCATCTTTTCTCTTTCGTTTCGTTTGAGGCGACGTGTCGAGCAC   304
      |||||
Sbjct  175    CAGACGAACGCCAATTCATCTTTTCTCTTTCGTTTCGTTTGAGGCGACGTGTCGAGCAC   116

Query   305     ACGCACACTGCTGCTATACTCTgagagagagcaagaga   342
      |||||
Sbjct  115    ACGCACACTGCTGCTATACTCTGAGAGAG--CAAGAGA   80
    
```


Trichogramma pretiosum – Amostra TPPPB

>gb|JF306651.1| *Trichogramma pretiosum* isolate 10A internal transcribed spacer
2, partial sequence
Length=413

Score = 610 bits (330), Expect = 3e-171
Identities = 378/408 (93%), Gaps = 7/408 (2%)
Strand=Plus/Minus

```

Query 12 AAAGA-TCGTTGTTGTTGTTTCGAGCTAGCCAGGCGCTATAATAAAACNNNGAGAGCGNGG 70
      ||||| ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||| ||||| |
Sbjct 404 AAAGACTCGTTGTTGTTGTTTCGAGCTAGCCAGGCGCTATAATAAAATAGCGAGAGCGCGC 345

Query 71 GAGCGCCTTTCTAGTGTACCGAATCATGGTNTC-NGCCTGNATCGTGTACTGACAGTCGG 129
      | ||||||||||||||||||||||||| | ||||| |||||||||||||||||||
Sbjct 344 GCGCGCCTTTCTAGTGTACCGAATCATGG--ACGAGCCTG-ATCGTGTACTGACAGTCGG 288

Query 130 TCCGCTGCTCGACGAGGCGAGAAGCTCCGGGACTCGAACGCAGAACGATCGGAAGTACTC 189
      |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct 287 TCCGCTGCTCGACGAGGCGAGAAGCTCCGGGACTCGAACGCAGAACGATCGGAAGTACTC 228

Query 190 TNGCGCTTTTACACACGTGAGTACTCTCCAAGCGGTAAGCGCGCGCCAGCCAGACGAA 249
      |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct 227 GCGCGCTTTTACACACGTGAGTACTCTCCAAGCGGTAAGCGCGCGCCAGCCAGACGAA 168

Query 250 CGCCAATTCATCTTTTCTCTTGCGTTTCGTTTGAGGCGACGTGTCGCANCACACGCACAC 309
      |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct 167 CGCCAATTCATCTTTTCTCTTGCGTTTCGTTTGAGGCGACGTGTCGCAGCACACGCACAC 108

Query 310 TGCTGCTATACTCTGAGAGAGAGCAAGAGATAGTGTGTGTGTGCGNGACANGAGCGCCCA 369
      ||||||||||||||||||||| ||||||||||||||||||||| ||||| |||||||
Sbjct 107 TGCTGCTATACTCTGAGAGAG--CAAGAGATAGTGTGTGTGTGCGCGACACGAGCGCCCA 50

Query 370 NATNAACGCTCTCTCTTGNGanaaannagtagggttcgtttttanaaa 417
      || ||||||||||||||| || | | ||| ||||||||||||| |||
Sbjct 49 GATCAACGCTCTCTCTTGCGAGAGAGCAGTCGGGTCGTTTTTATAAA 2
    
```


***Trichogramma pretiosum* – Amostra TPMVCE**

>gb|JF306651.1| *Trichogramma pretiosum* isolate 10A internal transcribed spacer
2, partial sequence
Length=413

Score = 547 bits (296), Expect = 2e-152
Identities = 322/340 (95%), Gaps = 3/340 (1%)
Strand=Plus/Minus

```

Query   8      AAAGACTCGTTGTTGTTGTTTCGAGCTAGCCAGGCGCTATAATAAAAAT-NCNGAGAGCGCG 66
          |||
Sbjct  404    AAAGACTCGTTGTTGTTGTTTCGAGCTAGCCAGGCGCTATAATAAAAATAGC-GAGAGCGCG 346

Query   67      NGCGCGCCTTTCTAGTGTACCGAATCATGGAACGNCCCTGATCGTGTACTGACAGTCGGT 126
          |||
Sbjct  345    CGCGCGCCTTTCTAGTGTACCGAATCATGG-ACGAGCCTGATCGTGTACTGACAGTCGGT 287

Query   127     CCGTGCTCGACNAGGCGAGAAGCTCCGGGACTCGAACGCANAACGATCGGAAGTACTCG 186
          |||
Sbjct  286    CCGTGCTCGACGAGGCGAGAAGCTCCGGGACTCGAACGCAGAACGATCGGAAGTACTCG 227

Query   187     CGCGCTTTTACACACGTGAGTACTCTCCAAGCGGTAAGCGCGCGCGCCAGCCAGACNAAC 246
          |||
Sbjct  226    CGCGCTTTTACACACGTGAGTACTCTCCAAGCGGTAAGCGCGCGCGCCAGCCAGACGAAC 167

Query   247     GCCAATTCATCTTTTCTCTTGCGTTTCGTTTGAGGCGACGTGTCGCAGCACACGCACACT 306
          |||
Sbjct  166    GCCAATTCATCTTTTCTCTTGCGTTTCGTTTGAGGCGACGTGTCGCAGCACACGCACACT 107

Query   307     GNTGNTATACTCTGananagaaaaaanatantgtgtgtgtg 346
          |||
Sbjct  106    GCTGCTATACTCTGAGAGAGCAAGAGATAGTGTGTGTGTG 67
    
```

Trichogramma pretiosum – Amostra TPJSP

>gb|DQ525178.1| *Trichogramma pretiosum* from USA 5.8S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence
 Length=526

Score = 797 bits (431), Expect = 0.0
 Identities = 482/509 (95%), Gaps = 12/509 (2%)
 Strand=Plus/Minus

```

Query 7      CGAT-GAG-AAAAAGACTCGTTGTTGTTGTTTCGAGCTAGCCAGGCGCTATAATAAAATCC 64
          |||| ||| ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct 504     CGATCGAGAAAAAAGACTCGTTGTTGTTGTTTCGAGCTAGCCAGGCGCTATAATAAAAT-A 446

Query 65     CCGAGAGCGCGNGNGCGCCTTTCTAGTGTACCGAATCATGGTACNAGCCTGATCGTGTAC 124
          ||||||||| | ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct 445     GCGAGAGCGCGCGCGCCTTTCTAGTGTACCGAATCATGG-ACGAGCCTGATCGTGTAC 387

Query 125    TGACAGTCGGTCCGCTGCTCGACGAGGCGAGAAGCTCCGGGACTCGAACGCAGAACGATC 184
          ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct 386     TGACAGTCGGTCCGCTGCTCGACGAGGCGAGAAGCTCCGGGACTCGAACGCAGAACGATC 327

Query 185    GGAAGTACTCGCGCGCTTTTACACACGTGAGTACTCTCCAAGCGGTAAGCGCGCGGCCA 244
          ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct 326     GGAAGTACTCGCGCGCTTTTACACACGTGAGTACTCTCCAAGCGGTAAGCGCGCGGCCA 267

Query 245    GCCAGACGAACGCCAATTCATCTTTTCTCTTGCGTTTCGTTTGAGGCGACGTGTCGCAGC 304
          ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct 266     GCCAGACGAACGCCAATTCATCTTTTCTCTTGCGTTTCGTTTGAGGCGACGTGTCGCAGC 207

Query 305    ACACGCACACTGCTGCTATACTCTGAGAGAGAGCAAGAGATAGTGTGTG--TGTGCGCGA 362
          |||||||||||||||||||||||||||| |||||||||||| ||||||||
Sbjct 206     ACACGCACACTGCTGCTATACTCTGAGAGAG--CAAGAGATAGTGTGTGCGTGTGCGCGA 149

Query 363    CACGAGCGCCCAGATCAACGCTCTCTCTTGCGAGAGAGCAGTCGGGTTTCGTTTTTATAAA 422
          ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct 148     CACGAGCGCCCAGATCAACGCTCTCTCTTGCGAGAGAGCAGTCGGGTTTCGTTTTTATAAA 89

Query 423    CGACCCTCANCCAGGCGTGGTCCGGGAACNAGATCCGTGGACCGCAA-TGTGNTTTCNAA 481
          ||||||||| |||||||||||||||||||| ||||||||| ||| ||| |||
Sbjct 88      CGACCCTCAGCCAGGCGTGGTCCGGGAACGAGATCCGTGGA--GCAAATGTGCGTTCCTTT 31

Query 482    ATGNCGATGTTTCATGTGTCCTGCANTTCA 510
          || | |||||||||||||||||||| ||||
Sbjct 30      -TGTCAATGTTTCATGTGTCCTGCAGTTCA 3
    
```

Trichogramma pretiosum – Amostra TPAES

ALIGNMENTS

>gb|U76226.1|TPU76226 *Trichogramma pretiosum* PRV4 rRNA gene, internally transcribed spacer 2
 Length=409

Score = 573 bits (310), Expect = 3e-160
 Identities = 359/389 (92%), Gaps = 6/389 (2%)
 Strand=Plus/Minus

```

Query 4      CGAG-AAAAAGACTCGGTTGTTGTTGTTTCGAGNTAGCCAGAGCTATAATAAAATAGCGNC 62
          ||||| ||||||| ||||||| ||||||| ||||||| ||||||| ||||||| |||||||
Sbjct 407    CGAGAAAAAAGACTC-GTTGTTGTTGTTTCGAGCTAGCCAGAGCTATAATAAAATAGCG-- 351

Query 63     NNNNGCGCGCGGGGGAAANNTAGTGTACCGAATCATGGNACGAGCCTTCNCGTGTACTG 122
          ||||| | | ||||||| ||||||| ||||||| ||||||| |||||||
Sbjct 350    -AGAGCGCGCGCGCCTTTCTAGTGTACCGAATCATGG-ACGAGCCTGATCGTGTACTG 293

Query 123    ACNGANAGTCCGCTGCTCGACGAGGCGAGAAGCTCCGGGACTCGAACGCAGAACGATCGG 182
          || | ||||||| ||||||| ||||||| ||||||| ||||||| |||||||
Sbjct 292    ACAGTTGGTCCGCTGCTCGACGAGGCGAGAAGCTCCGGGACTCGAACGCAGAACGATCGG 233

Query 183    AAGTACTCGCGCGCTTTTACACACGTGAGTACTCTCCAAGCGGTAAGCGCGCGGCCAGC 242
          ||||||| ||||||| ||||||| ||||||| ||||||| ||||||| |||||||
Sbjct 232    AAGTACTCGCGCGCTTTTACACACGTGAGTACTCTCCAAGCGGTAAGCGCGCGGCCAGC 173

Query 243    CAGACNAACGCCAATTCATCTTTTCTCTTGCCTTCGTTTGAGGCGACGTGTCGCAGCAC 302
          ||||| ||||||| ||||||| ||||||| ||||||| ||||||| |||||||
Sbjct 172    CAGACGAACGCCAATTCATCTTTTCTCTTGCCTTCGTTTGAGGCGACGTGTCGCAGCAC 113

Query 303    ACACGCACACTGCTATACTCTGAGAGAGCAAGANATGGTGTGTGTGCGCGACACNAGCGC 362
          ||||||| ||||||| ||||||| ||||||| ||||||| ||||||| |||||||
Sbjct 112    ACACGCACACTGCTATACTCTGAGAGAGCAAGAGATGGTGTGTGTGCGCGACACGAGCGC 53

Query 363    CCANATCANCGCTCTCTCTTGCGAGAGAG 391
          ||| |||| ||||||| |||||||
Sbjct 52      CCAGATCAACGCTCTCTCTTGCGAGAGAG 24
  
```

Trichogramma pretiosum – Amostra TPPARS

>gb|U76226.1|TPU76226 *Trichogramma pretiosum* PRV4 rRNA gene, internally transcribed spacer 2
 Length=409

Score = 643 bits (348), Expect = 0.0
 Identities = 392/415 (94%), Gaps = 9/415 (2%)
 Strand=Plus/Minus

```

Query 7      CGACGANAAAAGACTCGGTTGGTTGTTGTTTCGAGTCTAGCCAGAGCTATAATAAAATAGC 66
          ||| || ||||| ||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
Sbjct 407     CGA-GAAAAAAGACTC-GTT-GTTGTTGTTTCGAG-CTAGCCAGAGCTATAATAAAATAGC 352

Query 67     GNCNNNTGCGCGCGNG-GNAAATCTAGTGTACCGAATCATGGNACGAGCCTTCTCGTGTA 125
          | ||||| | | ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
Sbjct 351     G---AGAGCGCGCGCGCCTTTCTAGTGTACCGAATCATGG-ACGAGCCTGATCGTGTA 296

Query 126    CTGACAGTCNGTCCGCTGCTCGACGAGGCGAGAAGCTCCGGGACTCGAACGCAGAACGAT 185
          ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
Sbjct 295    CTGACAGTTGGTCCGCTGCTCGACGAGGCGAGAAGCTCCGGGACTCGAACGCAGAACGAT 236

Query 186    CGGAAGTACTCGCGCGCTTTTACACACGTGAGTACTCTCCAAGCGGTAAGCGCGCGGCC 245
          ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
Sbjct 235    CGGAAGTACTCGCGCGCTTTTACACACGTGAGTACTCTCCAAGCGGTAAGCGCGCGGCC 176

Query 246    AGCCAGACNAACGCCAATTCATCTTTTCTCTTGCGTTTCGTTTGAGGCGACGTGTCGCAG 305
          ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
Sbjct 175    AGCCAGACGAACGCCAATTCATCTTTTCTCTTGCGTTTCGTTTGAGGCGACGTGTCGCAG 116

Query 306    CACACACGCACACTGCTATACTCTGAGAGAGCAAGAGATGGTGTGTGTGCGCGACACGAG 365
          ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
Sbjct 115    CACACACGCACACTGCTATACTCTGAGAGAGCAAGAGATGGTGTGTGTGCGCGACACGAG 56

Query 366    CGCCCAGATCAACGCTCTCTCTTGCGAGAGAGCAGTCGGGTTTCGTTTTTATAAAC 420
          ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
Sbjct 55     CGCCCAGATCAACGCTCTCTCTTGCGAGAGAGCAGTCGGGTTTCGTTTTTATAAAC 1
  
```


10. Lista de Publicações (2007 - 2011)

ALMEIDA, SA de; SANTOS, NR dos., . 2007. Efeito de extratos Vegetais Sobre o Caruncho do feijão Vigna (*Callosobruchus maculatus*) através de diferentes métodos de aplicação. Periódico de Divulgação Científica e Tecnológica da Academia Roraimense de Ciências, vol. 2. n. 1. p. 73-76.

FRANÇA, SM de., OLIVEIRA, MAP., SANTOS, NR dos., ESTEVES- FILHO, AB., OLIVEIRA, JV de., 2007. Efeito de nim e abamectina na mortalidade de ovos do ácaro-rajado (*Tetranychus urticae*) Koch (Acari: Tetranychidae) In: I Simpósio de Entomologia da Paraíba, 2007, Campina Grande, PB.

SANTOS, NR dos., GUIMARÃES, AS de., MEZZOMO, JÁ., 2008. Avaliação do desenvolvimento de *Spodoptera frugiperda* (J. E. SMITH, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae) em dieta artificial e natural em laboratório. Periódico de Divulgação Científica e Tecnológica da Academia Roraimense de Ciências. Boa Vista, RR v. 3. n. 1. p. 45-50.

GUIMARÃES, AS., SANTOS, NR., BELTRÃO, NEM., 2009. Fontes e doses crescentes de adubos orgânicos e mineral no crescimento inicial de pinhão manso. Mens Agitat, v. 4, n. 2, p. 21-28.

SANTOS, NR dos., LUCENA, M., MARTINS, WFS., CREÃO-DUARTE, AJ., ALMEIDA, RP de., 2010. Utilização de PCR na diferenciação de espécies de *Trichogramma* (Hymenoptera: Trichogrammatidae). In: XXIII CONGRESSO BRASILEIRO DE ENTOMOLOGIA, 2010, Natal-RN. **Anais...** Natal-RN: SEB, 2010, CD-Rom.