**IDENTIFICAÇÃO DE ESPÉCIES DE *Trichogramma*
(HYMENOPTERA:TRICHOGRAMMATIDAE) UTILIZANDO O
SEQÜENCIAMENTO DA REGIÃO ITS2 DO rDNA**

AMÉRICO IORIO CIOCIOLA JUNIOR

Engenheiro Agrônomo

Orientador: Prof. Dr. **ROBERTO ANTONIO ZUCCHI**

Co-orientador: Prof. Dr. **JOSÉ ROBERTO POSTALI PARRA**

Tese apresentada à Escola Superior de
Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade
de São Paulo, para obtenção do título de
Doutor em Ciências. Área de concentração:
Entomologia.

PIRACICABA

Estado de São Paulo - Brasil

Julho - 2000

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - Campus "Luiz de Queiroz"/USP

Ciociola Junior, Américo Iório

Identificação de espécies de *Trichogramma* (Hymenoptera: Trichogrammatidae) utilizando o sequenciamento da região ITS2 do rDNA / Américo Iório Ciociola Junior. -- Piracicaba, 2000.

60 p. : il.

Tese (doutorado) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 2000.
Bibliografia.

1. Controle biológico 2. Himenóptero 3. Inseto-parasitóide 4. Taxonomia 5. Sequência do DNA 6. Tricogramatídeo I. Título

CDD 595.79

"Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte – O autor"

Agradeço a Deus por tudo, sem o qual nada seria possível,

À minha irmã Débora e irmão Frederico,

Ofereço.

Dedico a minha mãe Maria Elizabete,
e pai, Américo, por sempre acreditarem
na minha formação profissional,

e a minha namorada Cláudia,
pelo carinho, amor e compreensão.

AGRADECIMENTOS

- Ao Dr. Roberto Antonio Zucchi, professor Titular do Departamento de Entomologia, Fitopatologia e Zoologia Agrícola, da ESALQ/USP, pela orientação, apoio, amizade e compreensão;
- Ao Dr. José Roberto Postali Parra, professor Titular do Departamento de Entomologia Fitopatologia e Zoologia Agrícola, da ESALQ/USP pelo apoio e incentivo na realização deste trabalho, além dos ensinamentos transmitidos.
- À Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", da Universidade de São Paulo (ESALQ/USP), pela oportunidade de realizar o curso;
- Ao Dr. Joop C. van Lenteren, chefe do Departamento de Entomologia da Universidade de Wageningen, Holanda, pelo aceite na realização do meu Doutorado Sanduíche em seu laboratório;
- Ao Dr. Richard Stouthamer, professor da Universidade de Wageningen, Holanda, pela co-orientação dos meus trabalhos de biologia molecular no laboratório de Entomologia;
- Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão da bolsa de estudo;
- À Fundação Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de Doutorado "Sanduíche";
- Aos Professores do Departamento de Entomologia, Fitopatologia e Zoologia Agrícola, da ESALQ/USP, pelos ensinamentos transmitidos.
- Aos pesquisadores Raul P. Almeida (CNPq/EMBRAPA), Dr. Ivan Cruz (CNPq/EMBRAPA) e aos técnicos do LACRI, em especial Geraldo Magela da Fonseca e Isaias Tadeu Barbosa Duarte, pelo envio de algumas populações de *Trichogramma*, além da grande amizade e companheirismo;
- Ao Dr. Luiz A. Foerster, professor do Departamento de Zoologia, da Universidade Federal do Paraná e a pós-graduanda Carolina Canete, pelo envio das populações de *Trichogramma rojasi* e *T. lasallei*.
- Ao Dr. Paulo DeGrande, professor (UFMS) e ao Dr. Dirceu Pratisoli, professor (UFES) pelo envio de populações de *Trichogramma*.
- Ao Dr. Edilson Paiva (CNPq/EMBRAPA) e ao técnico Miguel F. A. Reis, pela amizade, atenção, companheirismo e pelos valiosos ensinamentos na área de biologia molecular;

- Aos funcionários Regina, Neide, Solange, Augusto, Negri, João Forte, Aninha, "Tutu", João Gorá, Edilene, Carlinhos e Vítor pela atenção e préstimos oferecidos.
- Às bibliotecárias da ESALQ/USP, Eliana Sabino e Katia Andrade pela orientação no uso da biblioteca e revisão das referências bibliográficas;
- A todos os colegas da PG-Entomologia da ESALQ/USP, em especial: Eduardo, Lusinério, Charles, Ranyse, Odinete, Luciana, Clarice, Terezinha, Geraldo, Jorge, Everaldo, Manoel Guedes, Marccone, Crébio e Maurício Zacarias pelo convívio, amizade e companheirismo;
- Ao Dr. Américo Iorio Ciociola, professor do Departamento de Entomologia da Universidade Federal de Lavras (UFLA), que além de um grande pai e amigo, sempre me incentivou e apoiou na minha formação profissional;
- Ao Dr. Luciano V. Paiva, professor da Universidade Federal de Lavras (UFLA), pelos valiosos conselhos, apoio e incentivo, na realização do Doutorado "Sanduíche" na Holanda, além da grande amizade e companheirismo.
- A todos aqueles que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

RESUMO	Página vii
SUMMARY	ix
1 INTRODUÇÃO	1
2 REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1 Taxonomia de <i>Trichogramma</i> Westwood, 1833	3
2.1.1 Taxonomia de <i>Trichogramma</i> no Brasil	4
2.2 Técnicas Moleculares Como Auxílio à Taxonomia de <i>Trichogramma</i>	5
2.2.1 Isoenzimas	6
2.2.2 RAPD, RFLP, Microssatélites e Sequenciamento da Região ITS2 do rDNA	9
2.3 Detecção de <i>Wolbachia</i> em <i>Trichogramma</i> usando PCR	11
2.3.1 Importância de <i>Wolbachia</i> em Insetos	13
2.3.2 Transmissão Horizontal de <i>Wolbachia</i>	14
3 MATERIAL E MÉTODOS	15
3.1 Obtenção das Linhagens de Isofêmeas	16
3.2 Identificação e Manutenção das Linhagens de <i>Trichogramma</i>	18
3.3 PCR, Clonagem e Sequenciamento da Região ITS2 do rDNA	18
3.4 Alinhamento das Sequências e Elaboração de uma Chave Molecular	23
3.5 PCR para Constatação de <i>Wolbachia</i> em <i>Trichogramma atopovirilia</i>	24
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	25
4.1 PCR, Clonagem e Sequenciamento da Região ITS2 do rDNA	25

4.2 Caracterização Molecular de Algumas Populações Brasileiras de <i>Trichogramma</i>	30
4.3 Importância da Região ITS2 do rDNA.....	37
4.4 Caracterização Molecular e Morfológica de <i>Trichogramma lasallei</i> e <i>T. rojasi</i>	39
4.5 Detecção de <i>Wolbachia</i> em uma População de <i>Trichogramma atopovirilia</i>	42
5 CONCLUSÕES.....	45
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	47

IDENTIFICAÇÃO DE ESPÉCIES DE *Trichogramma* (HYMENOPTERA: TRICHOGRAMMATIDAE) UTILIZANDO O SEQUENCIAMENTO DA REGIÃO ITS2 DO rDNA

Autor: AMÉRICO IORIO CIOCIOLA JUNIOR

Orientador: Prof. Dr. ROBERTO ANTONIO ZUCCHI

Co-Orientador: Prof. Dr. JOSÉ ROBERTO POSTALI PARRA

RESUMO

A identificação de espécies de *Trichogramma* é feita principalmente através da análise da genitália do macho. Há, entretanto, a presença de espécies crípticas e/ou próximas, de difícil caracterização, além do fato do parasitóide ser muito pequeno (0,25 mm) e de difícil preparação em lâminas microscópicas. A técnica, apresentada neste trabalho, trata do sequenciamento da região ITS2 do rDNA com o objetivo de facilitar a identificação de espécies desse grupo de parasitóides. A técnica foi desenvolvida na Universidade de Wageningen, Holanda, e possibilita, em conjunto com dados taxonômicos, uma segura identificação das espécies utilizadas em programas de controle biológico aplicado. Utilizando-se essa técnica, é possível ainda a construção de uma chave molecular precisa, baseada em enzimas de restrição, juntamente com o comprimento de cada sequenciamento. Populações de diversas localidades do Brasil foram coletadas e mantidas em laboratório em condições controladas. A partir de populações de isofêmeas, cinco espécimens de cada população foram macerados em Chelex 5% e amplificados com "primers" específicos para a região ITS2 do rDNA. Cada DNA foi ligado a um vetor pGEM®-T da Promega, sendo posteriormente plaqueados em meio LB para o crescimento de colônias brancas. A partir dessas colônias, foi obtido o "miniprep", que foi enviado ao sequenciador. As sequências foram alinhadas com o

auxílio do programa de computador ESEE 3.0. A partir dos resultados obtidos, elaborou-se uma chave molecular de algumas espécies brasileiras de *Trichogramma*. Comparando-se as seqüências obtidas com dados taxonômicos, confirmou-se a ocorrência no Brasil de *T. lasallei* Pinto, 1998 espécie recentemente registrada no País, baseado em características morfológicas. Utilizando-se um PCR com "primers" específicos, foi constatado pela primeira vez no Brasil, a presença de *Wolbachia*, em uma população telítica de *T. atopovirilia* Oatman & Platner, 1983.

IDENTIFICATION OF *Trichogramma* SPECIES (HYMENOPTERA: TRICHOGRAMMATIDAE) USING THE SEQUENCE OF THE ITS2 REGION OF THE rDNA

Author: AMÉRICO IORIO CIOCIOLA JUNIOR

Adviser: Prof. Dr. ROBERTO ANTONIO ZUCCHI

Co-Adviser: Prof. Dr. JOSÉ ROBERTO POSTALI PARRA

SUMMARY

Trichogramma identification nowadays is done basically by the analysis of the male genitalia. Nevertheless, there are cryptic or closely related species, which are difficult to identify using microscopic slides, and because they are very tiny (0.25 mm). The technique reported in this work uses the sequence of the ITS2 region of the rDNA with the purpose to identify *Trichogramma* species. The technique was carried out at Wageningen University (Netherlands), and together with taxonomic methods, may allow a precise species identification used in biological control programs. By using this technique, it is possible to construct a precise molecular key based on restriction enzymes and on length of each sequence. Samples of *Trichogramma* populations from several regions of Brazil were collected and brought to the laboratory and reared under controlled conditions. From isofemale colonies, 5 individuals of each one were ground in Chelex 5% and amplified with specific primers for the ITS2 region of the rDNA. Each DNA was linked to a pGEM®-T vector by Promega and placed in Petri dishes with LB medium to grow white colonies. From these colonies a miniprep was obtained and sent to the sequencer. The sequences were aligned using the software ESEE 3.0. From the data obtained, a molecular key to some Brazilian species was elaborated. Comparing the sequences of each population and together with taxonomic data, it was

confirmed the occurrence of *T. lasallei* Pinto, 1998 in Brazil, which had been recorded in this country recently, based on morphological characters. Also, this is the first record of a thelytokous population of *T. atopovirilia* Oatman & Platner, 1983 infected with *Wolbachia* in Brazil, using PCR with specific primers.

1 INTRODUÇÃO

Parasitóides oófagos do gênero *Trichogramma* são os mais utilizados em programas de controle biológico contra pragas da ordem Lepidoptera (Parra, 1997).

Anualmente, 32 milhões de hectares são tratados no mundo com liberações inundativas de *Trichogramma*, sendo que em primeiro lugar vem a antiga União Soviética, seguida pela China e México (Li, 1994).

Esse parasitóide é identificado taxonomicamente a nível de espécie através da morfologia da genitália do macho (Pinto & Stouthamer, 1994). Para que haja sucesso no controle de diversas pragas, é de suma importância a correta identificação da espécie do inimigo natural a ser utilizada (Zucchi & Monteiro, 1997). Em alguns casos, a identificação é dificultada pelo tamanho reduzido (0,25 mm) e/ou a presença de espécies crípticas.

No início, a identificação das espécies de *Trichogramma* era realizada pelo estudo da morfologia externa dos adultos. Entretanto, Nagarkatti & Nagaraja (1971) mostraram o valor da genitália do macho como caráter importante na identificação específica. A partir dessa data, um grande avanço ocorreu na identificação das espécies de *Trichogramma*, e atualmente são conhecidas aproximadamente 180 espécies (Pinto, 1998).

A biologia molecular, como auxílio à identificação taxonômica de diversos grupos de insetos, vem sendo utilizada com bastante intensidade no mundo atualmente (Landry et al., 1993, Black IV et al., 1992, Orrego & Agudelo Silva, 1993, Stouthamer et al., 1999). Desse modo, espécies particularmente de difícil identificação com o emprego das técnicas taxonômicas tradicionais podem ter suas identidades esclarecidas mediante

o emprego da biologia molecular, seja ela através de uma eletroforese de isoenzimas ou de DNA.

Dentre as técnicas de extração de DNA para a identificação de espécies de insetos, destacam-se RAPD-PCR, RFLP, marcadores baseados em amplificação de microssatélites, e o seqüenciamento da região ITS2 do DNA ribossomal. De posse do conhecimento dessas técnicas, um grande avanço poderá ser obtido, não só na área de identificação de insetos, mas em todas as áreas da Entomologia. Essas técnicas moleculares poderão representar para a identificação de espécies de *Trichogramma*, um avanço tão grande quanto aquele obtido por Nagarkatti & Nagaraja (1971). O presente trabalho tem como objetivos: 1) o emprego do seqüenciamento da região ITS2 do rDNA, como metodologia para a identificação de algumas espécies de *Trichogramma* assinaladas no Brasil; 2) elaborar uma chave molecular baseada em enzimas de restrição e com o comprimento dos seqüenciamentos das populações e 3) utilizar "primers" específicos para constatar a presença de *Wolbachia* em uma população de *Trichogramma atopovirilia* Oatman & Platner, 1983.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Taxonomia de *Trichogramma* Westwood, 1833

O gênero *Trichogramma* foi criado por Westwood (1833), sendo *T. evanescens* a espécie-tipo (Zucchi, 1985). O primeiro exemplar do gênero foi coletado em folha de carvalho, na floresta do Epping, Inglaterra (Flanders, 1930). A taxonomia deste micro-himenóptero é difícil e depende de especialistas.

A identificação das espécies de *Trichogramma* no início era baseada em caracteres biológicos e ecológicos (Bowen, 1936; Flanders & Quednau, 1960). Desde o início do século, várias espécies foram identificadas por diferentes autores. Entretanto, um grande impulso ocorreu a partir do início da década de 70, quando foi realizado o trabalho clássico de Nagarkatti & Nagaraja (1971), que redescreveram algumas espécies de *Trichogramma*, mostrando a importância da genitália do macho para as identificações. A partir desse trabalho, inúmeros pesquisadores identificaram várias espécies de *Trichogramma* em todo o mundo (Nagaraja & Nagarkatti, 1973; Oatman & Platner, 1973; Nagarkatti & Nagaraja, 1977; Pinto et al., 1978; Voegelé & Pintureau, 1982; Pinto et al., 1983; Pinto & Oatman, 1985, 1996; Pintureau, 1987; Voegelé, 1988; Pintureau & Babault, 1988; Zucchi, 1988; Pinto et al., 1992; Pinto & Stouthamer, 1994).

Recentemente, Pinto (1998) publicou uma ampla revisão sobre as espécies norte-americanas de *Trichogramma* com a descrição de 27 novas espécies, distribuídas em três subgêneros (*Trichogramma*, *Trichogrammanza* e *Vanlisus*).

2.1.1 Taxonomia de *Trichogramma* no Brasil

No Brasil, parasitóides do gênero *Trichogramma* foram primeiramente estudados por Gomes (1949), que criou em grande escala esse parasitóide para o controle de *Neoleucinodes elegantalis* (Guenée, 1854). Gomes (1962) relatou que os resultados de ensaios feitos na Estação Experimental de São Bento e nas liberações realizadas em plantações do Estado do Rio de Janeiro, levaram a criação de *T. minutum* para o controle da praga da cana-de-açúcar, *Diatraea saccharalis* (Fabr., 1794), o que tornou possível a sua distribuição regular em outras regiões do país.

Entretanto, somente na década de 80 foram realizados estudos taxonômicos no Brasil. Assim, Voegelé & Pointel (1980) descreveram *T. maxacalii*, um parasitóide de *Euselasia euploea eucerus* Hewitson. Nagaraja (1983) descreveu *T. bruni*, *T. demoraesi* e *T. soaresi*. Brun et al. (1984) descreveram mais três espécies: *T. manicobai*, *T. caiaposi* e *T. acacioi*.

Trabalhando com a taxonomia de *Trichogramma*, Zucchi (1985) estudou algumas espécies associadas a pragas agrícolas. Desse trabalho quatro espécies novas foram descritas (Zucchi, 1988). Em livro recente (Parra & Zucchi, 1997) encontram-se dois capítulos: um sobre taxonomia da família Trichogrammatidae com ênfase no gênero *Trichogramma* (Pinto, 1997) e outro sobre ocorrência das espécies de *Trichogramma* e seus hospedeiros na América do Sul (Zucchi & Monteiro, 1997). De acordo com esses últimos autores, 14 espécies de *Trichogramma* estavam registradas no Brasil (Zucchi & Monteiro, 1997). Entretanto, recentemente *T. lasallei* Pinto, 1998 foi constatada no País (Querino et al., 2000).

Apesar do grande avanço na identificação de *Trichogramma* até os dias de hoje, que conta com quase 180 espécies descritas (Pinto, 1998), ainda existem problemas de difícil solução, como espécies crípticas e/ou formas telitocas de várias populações existentes.

2.2 Técnicas Moleculares como Auxílio à Taxonomia de *Trichogramma*

Na área de controle biológico, existem diversos trabalhos realizados no exterior para a identificação de espécies de *Trichogramma*. Alguns métodos utilizados são a eletroforese de isoenzimas, RAPD-PCR, RFLP, microssatélites e seqüenciamento da região ITS2 do rDNA. A eletroforese baseia-se na separação de proteínas em géis, pelas características de peso e carga elétrica. A enzima resulta da transcrição e tradução da informação contida na fita de DNA (Ferreira & Grattapaglia, 1995).

De acordo com Berlocher (1984), o termo geral para qualquer enzima revelada pela técnica de eletroforese é isoenzima, ou seja uma proteína complexa constituída por subunidades de polipeptídeos sendo codificadas por diferentes locos. As variantes produzidas por formas alélicas de um mesmo loco são um subconjunto das isoenzimas denominado alozimas.

Vários trabalhos foram feitos a partir de isoenzimas durante a década de 80 e no começo de 90, para a identificação de espécies de *Trichogramma* (Pintureau & Babault, 1981, 1982 ; Marques, 1982; Babi et al., 1984; Hung & Huo, 1985; Yu-Ling et al., 1988; Miura et al., 1990; Pinto et al., 1991,1993).

Mullis & Faloona (1987) desenvolveram uma técnica chamada de reação de polimerase em cadeia conhecida como PCR ("Polymerase Chain Reaction") (reação da polimerase em cadeia), visando o entendimento de processos biológicos fundamentais, o que causou uma grande revolução na biologia. Esta descoberta foi tão importante, que Mullis ganhou no início dos anos 90 o prêmio Nobel de Medicina, através dessa pesquisa (Ferreira & Grattapaglia, 1995).

Esta técnica envolve três etapas (Silva, 2000):

- a) Desnaturação da fita dupla de DNA através da elevação da temperatura para 92-95°C;
- b) Anelamento de um par de oligonucleotídeos indicadores ("primers") a sítios flanqueadores da região a ser amplificada;
- c) Extensão - onde cadeias complementares à região entre os "primers" são sintetizados pela ação de uma polimerase do DNA (Taq), que é termoestável.

A técnica denominada RAPD ("Random Amplified Polimorphic DNA") (DNA polimórfico amplificado ao acaso) é mais precisa do que isoenzimas, pois baseia-se em análise de DNA para a identificação das espécies. Essa técnica foi inicialmente descrita por Williams et al. (1990), como uma derivação do PCR, que envolve a amplificação simultânea de vários locos casualizados do genoma, utilizando "primers" de sequência arbitrária. Através das derivações do PCR, foi possível agilizar métodos tradicionais de clonagem, seqüenciamento e análise de polimorfismo de DNA (Ferreira & Grattapaglia, 1995). Utilizando-se essa técnica, vários trabalhos foram realizados na identificação de espécies de *Trichogramma* (Orrego & Agudelo-Silva, 1993; Vanlerberghe-Masutti, 1994; Landry et al., 1993; Kan et al., 1996, 1997; Laurent et al., 1998).

A técnica de RFLP ("Restriction Fragment Length Polymorphism"), (polimorfismo do comprimento de fragmentos de restrição) tem como base o polimorfismo, evidenciado pela fragmentação do DNA, através de enzimas de restrição e observado por hibridação desses fragmentos com seqüências homólogas de DNA, marcadas com radioatividade ou compostos que desencadeiam uma reação de luminescência. Para que o polimorfismo seja detectado, é necessário que as seqüências de nucleotídeos de dois ou mais indivíduos comparados sejam distintos (Ferreira & Grattapaglia, 1995). Trabalhos com *Trichogramma* utilizando essa técnica foram feitos por Vanlerberghe (1991), Vanlerberghe-Masutti (1994), e Sappal et al. (1995), entre outros.

2.2.1 Isoenzimas

Na década de 80 e início de 90, a utilização de isoenzimas na identificação de *Trichogramma* foi bastante intensa. Pintureau & Babault (1981) usaram três sistemas enzimáticos (esterases, malato desidrogenase e tetrazólio oxidase), na distinção de *T. evanescens* e *T. maidis* Pintureau & Voegelé, 1980. Os autores concluíram que as esterases e a malato desidrogenase auxiliaram na caracterização das linhagens dessas espécies e as esterases dos híbridos interespecíficas F₁ e F₂; confirmaram que o

fenômeno de indução de telitoquia ocorre em algumas fêmeas. Esses mesmos autores, em 1982, fizeram um estudo enzimático de 10 linhagens dos grupos *evanescens*, *chilonis* e *euproctidis*, através de três sistemas enzimáticos. As esterases permitiram distinguir bem as espécies, mesmo as de um grupo próximo. O sistema enzimático malato desidrogenase apenas auxiliou em informações complementares e o sistema tetrazólio oxidase conseguiu separar apenas espécies de grupos mais distantes.

Marques (1982), trabalhando com aspectos da biologia e do perfil eletroforético de alguns Tricogramatídeos brasileiros, concluiu que nem sempre a taxonomia bioquímica baseada em zimogramas tem a sensibilidade para diferenciar espécies do mesmo gênero.

Babi et al. (1984) estudaram populações de *Trichogramma dendrolimi* Matsumura, 1926 originárias do Japão, França e China. Segundo esses autores, a análise dos cruzamentos entre populações em conjunto com esterases e dados morfométricos permitiram descrever a subespécie *T. dendrolimi liliyingae*.

Hung & Huo (1985), trabalhando com três sistemas enzimáticos para identificar catorze diferentes espécies de *Trichogramma*, concluíram que a enzima málica é tetrâmera em *Trichogramma* e os sistemas enzimáticos PGM e PGI são respectivamente monômeros e dímeros. Os sistemas PGM e PGI possuem cada um, um único loco e cada um com quatro alelos. Esses autores ressaltaram a importância de uma padronização da nomenclatura enzimas-loco-alelo, para a possível comparação com outros trabalhos. O número de alelos, locos e sua nomenclatura, foi estabelecido para ME (enzima málica), PGM (fosfoglucomutase) e PGI (isomerase fosfoglucofósica) e poderão servir como referência para outros trabalhos, sendo utilizados em comparações de níveis intra e inter-específicos do gênero *Trichogramma*.

Pintureau (1987) trabalhou com os sistemas enzimáticos chamados esterase, malato-desidrogenase e tetrazólio oxidase de espécies européias de *Trichogramma* com o objetivo de identificá-las. Os resultados mostraram que as esterases podem ser utilizadas na identificação de algumas espécies. Para estudos de polimorfismo, o sistema enzimático malatodesidrogenase é mais variável que as esterases e que o tetrazólio oxidase.

Pintureau & Babault (1988) trabalharam na sistemática de espécies africanas de *Trichogramma*. Nas coletas realizadas, foram conduzidas análises eletroforéticas usando esterases na separação das espécies, sendo descritas três novas espécies, além da separação em sete grupos distintos: *dendrolimi*, *evanescens*, *kalkae*, *minutum*, *perkinsi*, *pintoi* e *pretiosum*.

Yu-Ling et al. (1988), trabalhando com 10 populações de *T. dendrolimi* através de estudos morfométricos e utilizando isoenzimas, concluíram que a frequência de genes difere de uma população para outra.

Miura et al. (1990), avaliando esterases de *T. chilonis* Ishii, 1941 e *T. ostrinae* Pang & Chen, 1974, relataram que as duas espécies apresentam diferentes bandas no gel e que o número de bandas variou entre os indivíduos de cada espécie.

Pinto et al. (1991), pesquisando as relações enzimáticas no complexo de *T. minutum* Nagarkatti & Nagaraja, 1971, concluíram que as duas formas de *T. platneri* Nagarkatti, 1975 podem ser separadas eletroforeticamente e que também apresentam alelos únicos, sendo que *T. platneri* é identificado pela ausência desses alelos.

Pinto et al. (1992) trabalharam com 22 linhagens do complexo *T. minutum* e concluíram que os resultados de compatibilidade reprodutiva estão significativamente correlacionados a 14 locos aloenzimáticos. Esses dados mostraram o reconhecimento de três formas morfologicamente similares de *T. platneri* distribuídas a oeste das montanhas rochosas e *T. minutum* que ocorre na região leste da América do Norte.

Pinto et al. (1993), realizando estudos eletroforéticos e morfológicos com duas espécies próximas de *Trichogramma*, *T. pretiosum* Riley, 1879 e *T. deion* Pinto & Oatman, 1986, utilizaram 13 sistemas enzimáticos e 48 populações. Dos locos avaliados, α Gpd-I, Hk e Gapd foram fixos para todas as populações, sendo que os outros 10 locos foram polimórficos. Os resultados mostraram que a variação aloenzimática é consistente e conjuntamente com dados morfológicos e de cruzamento indicaram que as espécies estudadas são crípticas. As espécies *T. pretiosum* e *T. deion* diferenciaram-se em apenas um loco. Esses autores ressaltaram que os estudos de diferenças alélicas não são necessariamente comuns entre espécies próximas de *Trichogramma*, como em *T. pretiosum* e *T. minutum*, onde não foi encontrada nenhuma diferença alélica para separar

essas duas espécies. No entanto, usando espécies de grupos distantes puderam-se encontrar grandes variações aloenzimáticas.

2.2.2 RAPD, RFLP, Microssatélites e Sequenciamento da Região ITS2 do rDNA.

Os trabalhos com extração de DNA são mais frequentes devido à precisão dos resultados. Sequências de DNA como fonte básica de variação têm sido realizadas com frequência em questões taxonômicas e filogenéticas (Moritz & Hillis, 1996). Estudos comparativos de sequências do gene do RNA ribossomal, realizados por White et al. (1990) e King & Schall (1989), permitiram avaliar as relações filogenéticas de vários níveis taxonômicos e descrever a estrutura genética de populações.

Orrego & Agudelo-Silva (1993) sugeriram a utilização do sequenciamento da região ITS1 (espaço interno transcrito) para o reconhecimento de espécies de *Trichogramma*, além de também ser uma técnica promissora para uma rápida monitoração de populações de *Trichogramma* em criações de laboratório.

Segundo Hoy (1994), os genes ribossomais nucleares (rRNA) estão entre as várias sequências propostas para se distinguir espécies morfologicamente próximas.

Kan et al. (1996) relataram que a sequência ITS2 ou região do espaço interno transcrito está posicionada entre as regiões codificadoras 5.8S e 28S do gene de rRNA e que esta região é útil na identificação de espécies de *Trichogramma*, mostrando-se promissora para a separação de espécies próximas. Pinto et al. (1997) trabalharam a partir dessa idéia, para separar espécies de *Trichogramma* próximas, oriundas do deserto de Mojave na Califórnia, USA. Das espécies estudadas, houve diferenças nos tamanhos dos sequenciamentos e utilizando enzimas de restrição, outras diferenças foram encontradas. Junto a esses dados, trabalhos de cruzamentos entre *T. deion* e *T. kaykai* Pinto & Stouthamer, 1997 foram completamente incompatíveis, mostrando que as espécies são distintas.

Silva et al. (1995), utilizando a técnica molecular de RAPD-PCR e sequenciamento das regiões ITS1 e ITS2 do rDNA, relataram que foi possível distinguir

diferentes espécies de *Trichogramma* através de diferentes padrões de bandas de DNA e também foi possível reconhecer populações híbridas. Usando o sequenciamento das regiões ITS1 e ITS2 do rDNA, foi possível diferenciar diversas espécies e biótipos.

Vanlerberghe-Masutti (1994), trabalhando com identificação molecular e filogenia de *Trichogramma* spp. através de mtDNA, RFLP e RAPD, mostrou que esses métodos são apropriados como marcadores moleculares para a identificação de espécies. Comparações de mapas de mtDNA revelaram uma considerável diferença entre sete espécies de *Trichogramma*.

Landry et al. (1993) utilizaram marcadores moleculares RAPD na identificação de espécies de *Trichogramma*. As populações de *T. pretiosum*, *T. dendrolimi* e *T. evanescens* diferiram claramente em relação aos padrões de amplificação de bandas no gel, quando foi usado o "primer" C5. Os autores concluíram que as análises de RAPD podem ser úteis para esclarecer o "status" de formas telítocas de *Trichogramma*.

Sappal et al. (1995), trabalhando com a técnica de RFLP na identificação de três espécies de *Trichogramma*, relataram que uma variação foi observada na região do espaçador interno transcrito (ITS). Utilizando enzimas de restrição *RsaI* e *SacII*, diferenciaram essas três espécies, sendo, portanto, viável a utilização de marcadores baseados no rDNA.

Laurent et al. (1998) relataram a importância de marcadores RAPD na construção de um mapa genético de *T. brassicae* Bezdenko, 1968.

Técnicas recentes têm sido usadas com sucesso no sequenciamento das regiões ITS2 como os trabalhos de Kan et al. (1996, 1997), que utilizando a técnica de extração de DNA através de Chelex 5%, seguidos por um PCR com "primers" específicos, obtiveram DNA suficiente para a clonagem e o sequenciamento. Os resultados mostraram que o sequenciamento da região ITS2 do rDNA é útil na identificação de *Trichogramma*.

Em trabalho recente, Stouthamer et al. (1999) mostraram a utilidade do sequenciamento da região ITS2 do rDNA, como nova técnica de identificação de *Trichogramma*. Além do sequenciamento e comparações do seu comprimento, diferenças foram encontradas quando usaram-se enzimas de restrição. Através dessas

enzimas foi possível elaborar uma simples e precisa chave molecular das espécies estudadas.

Silva et al. (1999) utilizaram a técnica de seqüenciamento da região ITS2 do rDNA e marcadores isoenzimáticos na identificação de cinco populações de *Trichogramma* de Portugal. As espécies foram separadas pelo comprimento de cada seqüenciamento auxiliado por enzimas de restrição. Usando essas duas técnicas foi possível diferenciar claramente as espécies estudadas. A técnica de seqüenciamento da região ITS2 do rDNA de *Trichogramma* foi desenvolvida no Departamento de Entomologia da Universidade de Wageningen, Holanda (Stouthamer et al., 1999).

Unruh & Woolley (1999) relataram que marcadores moleculares proporcionam novos caracteres de estudo de relações filogenéticas para identificações de espécies crípticas e biótipos. Segundo esses autores, existem várias técnicas que podem ser utilizadas, como o estudo das regiões ITS1 e ITS2 do rDNA, que são as que tem se mostrado bastante homogêneas com a evolução. Outras técnicas podem ser usadas como a utilização do mtDNA, polimorfismo de enzimas, RAPD, RFLP, microsátélites para estudos de genética de populações e a nova técnica de AFLP("Amplified Fragment Length Polimorfism") (polimorfismo do comprimento de fragmento amplificado) que poderá ser extremamente útil para o mapeamento genômico e estudos de genética de populações de insetos.

Ciociola Jr. et al. (2000) concluíram que é possível obter-se DNA para o seqüenciamento de *T. pretiosum* e *T. acacioi* até 10 dias após a morte dos exemplares.

2.3 Detecção de *Wolbachia* em *Trichogramma* usando PCR

Bactérias endocelulares do gênero *Wolbachia* pertencem à família das Rickettsias (α -proteobactéria) e infectam várias espécies de artrópodes (Werren et al., 1995), inclusive algumas espécies de *Trichogramma* (Stouthamer & Luck, 1993; Stouthamer et al., 1993).

Em *Trichogramma*, podem ocorrer algumas alterações reprodutivas como incompatibilidade citoplasmática, aumento de fecundidade e telitoquia (Meer, 1999).

Com a mudança de reprodução para telitoquia, algumas vantagens podem ser observadas: 1) desenvolvimento mais rápido da população telitoca; 2) redução do custo de produção; 3) estabelecimento mais fácil em campo, uma vez que as populações arrenótocas precisam acasalar para produzir descendentes. Em populações infectadas por *Wolbachia* não existe este problema e ainda podem reproduzir eficientemente em baixa densidade hospedeira (Stouthamer, 1993). Entretanto, podem também apresentar algumas desvantagens, pois como uma população telitoca é homozigota e a reprodução sexual não existe, a variação genética nas populações é relativamente pequena (Plantard et al., 1998). Um outro fator é a implicação ecológica das populações, que passam a ser telitocas artificialmente através do uso de protocolos de microinjeção e que são liberadas para controle biológico (Meer, 1999).

Uma ampla revisão feita por Werren (1997) abordou vários aspectos da biologia de *Wolbachia* (histórico, filogenia, distribuição, incompatibilidade citoplasmática e implicações no controle biológico), que são de fundamental importância quando se usa *Trichogramma* infectado por essa bactéria, no controle de insetos de importância econômica.

Desde o início dos anos 90, com o estabelecimento de modernas técnicas moleculares como metodologia importante em várias áreas de pesquisa, inclusive em insetos, foi possível a utilização da técnica de PCR para detecção de *Wolbachia* em algumas populações de *Trichogramma* (Meer, 1999), usando "primers" específicos (Braig et al., 1998).

Além de *Trichogramma*, outros organismos importantes, presentes em nosso agroecossistema são os ácaros, que também podem estar infectados por *Wolbachia*, que pode ser detectada, utilizando-se a mesma técnica de extração de DNA de *Trichogramma*, porém com "primers" específicos para ácaros e um programa de PCR diferente. Ácaros de algumas famílias como Tetranychidae, entre eles *Tetranychus urticae* Koch, 1836 e *T. turkestanii* (Ugarov & Nikolskii, 1937), quando infectados por *Wolbachia*, apresentam incompatibilidade citoplasmática (Breeuwer, 1997). Essa bactéria já foi encontrada em mais de 80 espécies de insetos (Werren et al., 1995) e 17 isópodes (Rousset et al., 1992).

Opijnen & Breeuwer (1999) relataram que criando populações de ácaros contendo *Wolbachia* a $32 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$, durante seis gerações, é possível eliminar completamente essa bactéria.

Stouthamer & Werren (1993) citaram que há duas variantes na partenogênese de *Trichogramma*: 1) partenogênese reversível - população inicialmente telitoca pode ser revertida para sexuada utilizando-se um tratamento com antibióticos (como rifanpim) ou criação em altas temperaturas (acima de 30°C) e 2) partenogênese irreversível - nem tratamento com altas temperaturas ou antibióticos poderão reverter uma população telitoca para sexuada. Esta população é chamada de telitoca por hibridação (Pinto & Stouthamer, 1994).

Pintureau et al. (1999) utilizaram antibióticos e altas temperaturas em diversas populações telitocas de *T. cordubensis* Vargas & Cabello, 1985 infectadas por *Wolbachia*. Concluíram que existem potencialidades de adaptação dessa bactéria a altas temperaturas, o que pode explicar em parte a sua ampla distribuição.

2.3.1 Importância de *Wolbachia* em Insetos

Incompatibilidade Citoplasmática

O emprego de insetos, que possuem incompatibilidade citoplasmática devido à presença de *Wolbachia*, pode ser útil no controle de pernilongos onde o macho estéril copula com a fêmea e com isto não há descendentes (Stouthamer et al., 1999a). Um trabalho com pernilongos com esse objetivo foi realizado por Laven (1967).

Uma outra utilidade da incompatibilidade citoplasmática é a técnica de reposição populacional de um grande número de insetos em ambiente de uma outra população da mesma espécie, mas que sejam menos danosas às culturas (Stouthamer et al., 1999a).

Indução de Partenogênese

Em programas de controle biológico com a utilização de parasitóides, a presença de fêmea é de fundamental importância. Particularmente em *Trichogramma*, a presença de *Wolbachia* causa a indução de partenogênese telítoca, onde apenas fêmeas são produzidas e com isso várias vantagens são obtidas em relação à população sexuada (Stouthamer, 1993).

Esforços têm sido feitos com o objetivo de transferir *Wolbachia* de uma população de *Trichogramma* infectada para outra população sexuada. Até o momento, apenas um trabalho apresentou com sucesso a transmissão horizontal de *Wolbachia*, através de um protocolo de microinjeção (Grenier et al., 1998).

2.3.2 Transmissão Horizontal de *Wolbachia*

Stouthamer et al. (1999a) relataram que a congruência entre filogenias dos artrópodes hospedeiros e *Wolbachia* mostra claramente que a transmissão horizontal entre hospedeiros ocorrem com uma certa frequência, sendo que duas espécies diferentes de artrópodes compartilham a mesma linhagem de *Wolbachia* e que também está associado com a sua ocorrência ou à sua ecologia.

O primeiro exemplo de uma transmissão horizontal foi relatado por Werren et al. (1995), que descobriram que o parasitóide do gênero *Nasonia* (Hymenoptera, Pteromalidae) e seu hospedeiro *Sarcophaga* (Diptera, Sarcophagidae) possuem *Wolbachia* muito semelhante. Um caso semelhante foi relatado com o parasitóide *Trichogramma bourarache* Pintureau & Babault, 1988 e seu hospedeiro *Ephestia kuehniella* (Zeller, 1879) (Meer et al., 1999).

O grupo *Wolbachia*, que causa indução de partenogênese telítoca em diferentes espécies de *Trichogramma*, é muito próximo e é monofilético (Schilthuizen & Stouthamer, 1997).

3 MATERIAL E MÉTODOS

Foram estudadas seis espécies de *Trichogramma* (*T. acacioi*, *T. bruni*, *T. galloi*, *T. lasallei*, *T. pretiosum* e *T. rojasi*) coletadas em dez Estados brasileiros (Tabela 1), sendo mantidas no laboratório de criação de *Trichogramma*, do Departamento de Entomologia, Fitopatologia e Zoologia Agrícola da ESALQ/USP. A manutenção das populações foi feita mediante o emprego de ovos inviabilizados por UV do hospedeiro alternativo, *Anagasta kuehniella* (Zeller, 1879) (Lep., Pyralidae). Além dessas espécies estudou-se uma população de *T. atopovirilia* originária da Venezuela, que estava armazenada no Departamento de Entomologia da Universidade de Wageningen, Holanda.

As populações foram mantidas a $60 \pm 10\%$ de umidade relativa, $25 \pm 2^\circ\text{C}$ e 14h de fotofase, conforme metodologia proposta por Parra (1996). As cartelas com os ovos parasitados foram acondicionadas em tudos de ensaio de 2,5 cm x 8,5 cm contendo mel para os adultos e tampados com algodão hidrófilo. Para as ofertas, cartões de cartolina azul-clara foram cortados no tamanho de 2,0 cm x 8,0 cm e os ovos foram colados com solução aquosa de goma arábica a 20%. A partir das espécies de *Trichogramma* coletadas em campo, linhagens de isofêmeas foram obtidas antes de se iniciar os trabalhos de biologia molecular.

Para a criação de *T. rojasi*, utilizaram-se ovos de *Anticarsia gemmatalis* Hueb., 1818, pois essa espécie não parasita bem ovos de *A. kuehniella*. Vinte ovos de *A. gemmatalis* foram fixados em uma cartela de 2,0 cm x 8,0 cm contendo mel puro para alimentação dos adultos.

3.1 Obtenção das Linhagens de Isofêmeas

Inicialmente, 50 ovos de *A. kuehniella* previamente parasitados foram individualizados em tubos de ensaio de 2,5 cm x 8,5 cm, para a obtenção de dez fêmeas virgens e dez machos. Em todos os vidros foi ofertado mel puro para a alimentação dos adultos. Para a obtenção das linhagens de isofêmeas, individualizou-se em cada tubo de ensaio, uma fêmea virgem de cada espécie junto com um macho, durante o período de 24 h para cópula. Após este período, foram ofertados para cada casal uma cartela contendo ovos de *A. kuehniella* previamente inviabilizados. Junto com a cartela de ovos ofertou-se mel puro. Dos dez casais obtidos, apenas o casal com maior parasitismo foi mantido e os demais foram descartados. Para *T. rojasi*, o mesmo procedimento foi realizado, porém com a utilização de ovos de *A. gemmatalis*.

Tabela 1. Populações de *Trichogramma* utilizadas no sequenciamento da região ITS2 do rDNA. (* Dados obtidos na Universidade de Wageningen, Holanda).

Populações	Códigos	Locais/Coletores	Hospedeiros
<i>T. pretiosum</i>	TP-02	EPAGRI-SC/ Dirceu Pratissoli	-
<i>T. pretiosum</i>	TP-03	Quixadá-CE/ Raul Almeida	<i>A. argillacea</i>
<i>T. pretiosum</i>	TP-04	Alegre-ES/ Dirceu Pratissoli	<i>Tuta absoluta</i>
<i>T. pretiosum</i>	TP-05	V. N. Imigrante-ES/ Dirceu Pratissoli	<i>Tuta absoluta</i>
<i>T. pretiosum</i>	TP-06	Lavras-MG/ Lusinério Prezotti	<i>Helicoverpa zea</i>
<i>T. pretiosum</i>	TP-07	PiracicabaSP/ Lusinério Prezotti	<i>Helicoverpa zea</i>
<i>T. pretiosum</i>	TP-10	Campo Novo dos Parecis-MT/Raul Almeida	<i>Alabama argillacea</i>
<i>T. pretiosum</i>	TP-11	Campina Grande-PB/ Raul P. Almeida	Ovos (Neuroptera)
<i>T. pretiosum</i>	TP-12	Campina Grande-PB Raul P. Almeida	<i>Trichoplusia ni</i>
<i>T. pretiosum</i>	TP-13	Barreiras-BA/ Ivan Cruz	<i>Spodoptera frugiperda</i>
<i>T. pretiosum</i>	TP-15	CNPMS/EMBRAPA (área n. 1)/Ivan Cruz	<i>Helicoverpa zea</i>
<i>T. pretiosum</i>	TP-16	CNPMS/EMBRAPA (área n. 2)/Ivan Cruz	<i>Helicoverpa zea</i>
<i>T. pretiosum</i>	TP-17	Dourados-MS/ Paulo DeGrande	<i>Alabama argillacea</i>
<i>T. acacioi</i>	TAC-18	Botucatu-SP/ Elisabete Bernardi	<i>Euselasia</i> sp.
<i>T. galloi</i>	TG-19	Copersucar/ Piracicaba-SP	<i>Diatraea saccharalis</i>
<i>T. lasallei</i>	TL-20	Fazenda Rio Grande Curitiba-PR/L. A. Foerster	<i>Anticarsia gemmatalis</i>
<i>T. atopovirilia</i> *	TA-21	Venezuela Francisco Ferrer	-
<i>T. bruni</i>	TB-22	ESLAQ/USP João Cerignoni	<i>Heliconius phyllis</i>
<i>T. rojasi</i>	TR-23	Fazenda Rio Grande Curitiba-Pr/L. A. Foerster	<i>Anticarsia gemmatalis</i>

3.2 Identificação e Manutenção das Linhagens de *Trichogramma*

Para a identificação das espécies, foram preparadas lâminas microscópicas e analisadas no laboratório de taxonomia do setor de Entomologia (ESALQ/USP) (R.A. Zucchi e R.B. Querino). Parte dos exemplares foram conservados em álcool 100% e mantidos em refrigerador no referido laboratório. O seqüenciamento foi realizado na Universidade de Wageningen, Holanda. As populações foram colocadas em uma câmara climática (Figura 1), regulada para uma temperatura de 25 ± 2 °C e $60 \pm 10\%$ de umidade relativa. As ofertas foram feitas utilizando-se ovos esterilizados de *A. kuehniella* (fornecidos semanalmente pela empresa Koppert), sendo fixados através de fita adesiva de dupla face, em pequenas cartelas brancas de fichário, com 1 cm x 10 cm, sendo a fita adesiva colocada nas duas extremidades de cada cartela. Essas foram acondicionadas em tubos de ensaio de 1,6 cm x 15,0 cm contendo mel e tampados com algodão hidrófilo. A confecção das cartelas com os ovos foi realizada em câmara especial tipo incubadora (Figura 2), para evitar qualquer tipo de contaminação.

Para a extração de DNA, cinco indivíduos de cada população de isofêmeas, foram colocados em tubos "eppendorf" e macerados com 100 µl de Chelex 100 (5%), 4 µl de proteinase K (20mg/ml) e incubados por pelo menos seis horas a 56°C, seguido por 10 minutos a 95°C.

3.3 PCR, Clonagem e Seqüenciamento da Região ITS2 do rDNA

A reação de PCR foi feita num volume total de 50 µl. Para cada reação, foram usados 5µl de amostra de DNA, com 45 µl do "mix" de PCR (5 µl (10X tampão de PCR), 1 µl de dNTP (10mM), 1 µl do "primer" ITS2 F (5'-TGTGAACTGCAGGACACATG-3'), localizado na região 5.8s do rDNA, 1 µl do "primer" ITS2 R (5'-GTCTTGCCTGCTCTGAG-3'), localizado na região 28s do rDNA, 0,14 µl de super TAQ polimerase e 36,86 µl de água bidestilada e autoclavada). O programa do termociclador usado foi: um ciclo de 3 minutos a 94°C, 33 ciclos de 40

segundos a 94°C, 45 segundos a 55°C e 45 segundos a 72°C, com um ciclo final de 5 minutos a 72°C após o 33º ciclo.

O produto de PCR posteriormente foi purificado através do "PCR-Purification kit" da Qiagen® e ligado a um vetor pGEM-T da Promega (Figura 3). Dois µl da solução de ligação foram transformados através de um choque térmico com células de DH5-α de *Escherichia coli* e plaqueados em meio LB contendo ágar, ampicilina, X-GAL e IPTG. Em seguida, as placas foram incubadas a 37°C durante a noite. No dia seguinte, as colônias brancas foram retiradas das placas através de palitos de dente previamente esterilizados e colocados em tubos de ensaio contendo 3,5 ml de meio LB líquido, com os mesmos ingredientes do meio LB citado anteriormente, menos ágar. Os tubos de ensaio foram acondicionados em incubadora a 37°C e com agitação constante de 250 rpm durante mais uma noite (Figura 4). Dez µl da cultura de bactérias foram usados para verificar se a parte correta do DNA havia sido clonada. Adicionaram-se a 10µl dessa cultura, 100 µl de Chelex 100 (5%) e o produto foi submetido a temperaturas de 60°C durante 15 minutos e de 95°C por 5 minutos. O PCR foi feito num volume final de 25 µl. Dessa colônia de bactérias, 850 µl foram adicionados a 150 µl de glicerol (87%) e armazenados em freezer a -80°C. O restante da cultura foi utilizada para o "miniprep" antes de ser seqüenciado. O "miniprep" foi purificado com o uso do "QAgik Miniprep kit" da Quiagen®, e enviado ao seqüenciador. Utilizou-se para o seqüenciamento o "primer" T7 (5'-AATACGACTCACTATAG-3'). O seqüenciador utilizado foi o da Applied Biosystems 377 DNA Sequencer, wtr 36 cm. A reação foi preparada com Amplitaq DNA polimerase, FS.

Figura 1. Câmara climática utilizada para a criação das populações de *Trichogramma*.
Departamento de Entomologia, Universidade de Wageningen, Holanda.

Figura 2. Incubadora utilizada para a confecção das cartelas com ovos de *Anagasta kuehniella*, para a manutenção das populações de *Trichogramma*. Departamento de Entomologia, Universidade de Wageningen, Holanda.

Figura 3. Vetor pGEM®-T usado para a clonagem dos produtos de PCR (PROMEGA, 1998).

Figura 4. Agitador com controle de temperatura usado para o crescimento das colônias de bactérias. Departamento de Entomologia, Universidade de Wageningen, Holanda.

3.4 Alinhamento das Seqüências e Elaboração de uma Chave Molecular

As seqüências foram alinhadas manualmente usando o programma ESEE 3.0 (Cabot, 1995). A chave molecular foi construída baseando-se no comprimento de cada seqüenciamento juntamente com a utilização das enzimas de restrição *EcoRI*, *MseI*, *NruI* e *PvuI*, que foram escolhidas por possibilitar a diferenciação das populações em estudo.

Antes da digestão, as seqüências foram colocadas no programa Webcutter 2.0 (Heiman, 1997), para a escolha das enzimas a serem usadas no laboratório. Para a digestão com as enzimas, usaram-se 5 µl do produto de PCR, 3µl de água bidestilada e autoclavada, 1µl do tampão de restrição e 1µl da enzima escolhida. O produto da mistura

foi incubado por uma hora a 37°C e posteriormente aplicado em gel de agarose a 1%. Após uma hora a 60 volts, o gel foi retirado da cuba e fotografado.

3.5 PCR Para Constatação de *Wolbachia* em *Trichogramma atopovirilia*

Para a detecção de *Wolbachia*, utilizou-se uma população de *T. atopovirilia* coletada no CNPMS/Embrapa, Sete Lagoas-MG. A manutenção dessa população também foi feita usando-se a mesma metodologia para as outras populações em estudo.

As etapas de extração de DNA, PCR e eletroforese de fragmentos de DNA, foram conduzidos no laboratório de Biologia Molecular do Departamento de Entomologia da Universidade de Wageningen, Holanda. Maceraram-se cinco insetos em tubos "eppendorf" de 0,5 ul, juntamente com 100 ul de Chelex 5% e 4 ul de proteinase K, sendo a seguir incubados em banho-maria a 56°C por pelo menos 6 horas seguido de 10 minutos a 95°C. O "mix" para o PCR foi preparado com 5 ul da amostra. Os "primers" utilizados foram *wsp* 81F e *wsp* 691R (Braig et al., 1998) e *ftsZ* F (5'-CCGATGCTCAAGCGTTAGAG-3') e *ftsZ* R (5'-CCACTTAACCTCTTTCGTTTG-3') (Meer, 1999). Utilizou-se para o primer *wsp* o programa de PCR regulado para: 94°C por 3 minutos (1 ciclo), 94°C por 1 minuto, 50°C por 1 minuto e 72°C por 1 minuto (40 ciclos) e 72°C por 5 minutos (1 ciclo). Já para o "primer" *ftsZ* o programa de PCR usado foi: 94°C por 3 minutos (1 ciclo), 94°C por 45 segundos, 55°C por 1 minuto e 72°C por 1 minuto (35 ciclos) e 72°C por 5 minutos (1 ciclo). Esses programas apresentam pequenas modificações do apresentado por Meer (1999).

Após o término do programa, as amostras foram aplicadas em gel de agarose a 1% contendo brometo de etídio. O gel foi fotografado após uma hora de corrida na cuba, ligada a uma fonte regulada para 70 volts.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 PCR, Clonagem e Seqüenciamento da Região ITS2 do rDNA

Utilizando-se a técnica de extração através de Chelex 5% e cinco espécimens de cada população, foi obtido DNA suficiente para a clonagem e para o seqüenciamento da região ITS2 de *Trichogramma* (Figura 5). O comprimento dos seqüenciamentos variou de 522 a 669 pb. A estes valores, estão adicionadas as regiões flangeadoras de 89 pb da região 5.8S do rDNA + 24 pb da região 28S do rDNA (Tabela 2). O tamanho real do seqüenciamento das populações variou de 409 a 556 pb (Tabela 3). As enzimas usadas (Tabela 2), foram escolhidas por serem as que possibilitaram uma fácil elaboração da chave molecular.

Tabela 2. Comprimento (em número de nucleotídeos), do seqüenciamento da região ITS2 + áreas flangeadoras das regiões 5.8S e 28S do rDNA e locais de restrição gerados pelas enzimas *Eco* RI, *Mse* I e *Pvu* I e *Nru* I de espécies de *Trichogramma*.

Populações	Tamanho dos produtos de PCR	<i>Eco</i> RI	<i>Mse</i> I	<i>Pvu</i> I	<i>Nru</i> I
<i>T. acacioi</i>	668	-	106	217	-
<i>T. atopovirilia</i>	669	-	699	-	-
<i>T. pretiosum</i>	522-528	-	-	-	-
<i>T. galloi</i>	556	192	-	-	-
<i>T. lasallei</i>	566	566	-	-	161
<i>T. rojasi</i>	639	639	-	-	639
<i>T. bruni</i>	662	-	98	204, 363	-

Figura 5 Gel de agarose a 1% mostrando os produtos de PCR, juntamente com as regiões flanqueadoras das espécies de *Trichogramma*. Linha 1 e 8 marcadores moleculares, Linha 2: *T. pretiosum* (TP-07), Linha 3: *T. galloi*, Linha 4: *T. lasallei*, Linha 5: *T. rojasi*, Linha 6: *T. acacioi* e Linha 7: branco.

Tabela 3. Populações de *Trichogramma* com o comprimento de cada seqüenciamento.

(*Dados do Departamento de Entomologia da Universidade de Wageningen, Holanda).

Populações	Códigos	Comprimentos (pb)
<i>T. pretiosum</i>	TP-02	410
<i>T. pretiosum</i>	TP-03	409
<i>T. pretiosum</i>	TP-04	409
<i>T. pretiosum</i>	TP-05	412
<i>T. pretiosum</i>	TP-06	409
<i>T. pretiosum</i>	TP-07	410
<i>T. pretiosum</i>	TP-10	414
<i>T. pretiosum</i>	TP-11	414
<i>T. pretiosum</i>	TP-12	415
<i>T. pretiosum</i>	TP-13	409
<i>T. pretiosum</i>	TP-15	415
<i>T. pretiosum</i>	TP-16	413
<i>T. pretiosum</i>	TP-17	409
<i>T. acacioi</i>	TAC-18	555
<i>T. galloi</i>	TG-19	443
<i>T. lasallei</i>	TL-20	453
<i>T. atopovirilia</i> *	TA-21	556
<i>T. bruni</i>	TB-22	549
<i>T. rojasi</i>	TR-23	526

Através do comprimento dos seqüenciamentos juntamente com a utilização de enzimas de restrição, foi possível a elaboração de uma precisa chave molecular das espécies estudadas (Tabela 4).

Tabela 4. Chave molecular de algumas espécies brasileiras de *Trichogramma* baseada no produto de ITS2 PCR + áreas flanqueadoras e com o auxílio das enzimas de restrição *Eco* RI, *Mse* I, *Pvu* I e *Nru* I. (pb = pares de bases).

1. Tamanho do produto de PCR maior que 660 pb	2
1' Tamanho do produto de PCR menor que 660 pb	3
2. Produto de PCR cortado pela enzima <i>Mse</i> I	4
2' Produto de PCR não é cortado pela enzima <i>Mse</i> I	<i>T. atopovirilia</i>
3. Produto de PCR maior que 550 pb	5
3' Produto de PCR entre 522-528 pb	<i>T. pretiosum</i>
4. Produto de PCR cortado uma vez pela enzima <i>Pvu</i> I	<i>T. acacioi</i>
4' Produto de PCR não é cortado pela enzima <i>Pvu</i> I	<i>T. bruni</i>
5. Produto de PCR cortado pela enzima <i>Eco</i> RI	<i>T. galloi</i>
5' Produto de PCR não é cortado pela enzima <i>Eco</i> RI	6
6. Produto de PCR cortado pela enzima <i>Nru</i> I	<i>T. lasallei</i>
6' Produto de PCR não é cortado pela enzima <i>Nru</i> I	<i>T. rojasi</i>

Baseando-se no tamanho dos produtos de ITS2-PCR (Tabela 2), nota-se que existem três grupos distintos: 1) *T. pretiosum* (522-528 pb), 2) *T. galloi* (556 pb)/*T. lasallei* (566 pb) e as demais espécies no grupo 3, com a variação de 639-669 pb. Um agrupamento semelhante foi obtido por Silva et al. (1999), trabalhando na identificação de cinco espécies de *Trichogramma* coletadas em campos de tomate de Portugal.

A chave molecular (Tabela 4), apresenta sete espécies de *Trichogramma* registradas no Brasil e mostra que o tamanho dos seqüenciamentos juntamente com a utilização de algumas enzimas de restrição permite elaborar uma chave molecular precisa para a identificação dessas espécies. É importante ressaltar que essa chave é válida apenas para as espécies seqüenciadas neste trabalho e que coletas de outras populações devem ser realizadas no futuro, para a construção de uma chave mais completa e abrangente das espécies de *Trichogramma* existentes no Brasil. As chaves moleculares podem ser elaboradas em relação às culturas e também em relação ao hospedeiro em que foram encontrados, resultando numa precisão ainda maior. Uma chave semelhante foi feita por Stouthamer et al. (1999), utilizando várias populações de *Trichogramma* dos EUA.

Os seqüenciamentos das populações de *Trichogramma pretiosum* juntamente com *T. acacioi*, *T. galloi*, *T. rojasi*, *T. bruni* e *T. lasallei* (esta recentemente registrada no País) Querino et al. (2000) estão na Tabela 5.

Não se obteve sucesso na extração de DNA de populações brasileiras de *T. atopovirilia*. Portanto, usaram-se os dados já seqüenciados de uma população de *T. atopovirilia* originária da Venezuela (dado obtido junto ao Laboratório de Entomologia da Universidade de Wageningen, Holanda), para a elaboração da chave molecular (Tabela 4).

A técnica de extração de DNA, seguindo as várias etapas de laboratório até o seqüenciamento final foi bem sucedida, no sentido de que os "primers" usados (Campbell et al., 1993), com modificação no "primer" reverso, amplificaram com sucesso a região desejada das populações em estudo. Todas as seqüências obtidas (Tabela 5), foram enviadas ao Genbank do NCBI (National Center for Biothecnology

Information: www.ncbi.nlm.nih.gov/) e possuem os números de acesso AF282222-AF282239.

4.2 Caracterização Molecular de Algumas Populações Brasileiras de *Trichogramma*

Comparando-se as populações de *T. pretiosum* de diversas regiões do Brasil, nota-se que a diferença entre elas é muito pequena, mostrando que existe um padrão no seqüenciamento dessas populações. Pequenas diferenças em relação à posição de algum nucleotídeo desses seqüenciamentos não alteram a identificação da espécie. Já nas outras espécies seqüenciadas, diferenças visíveis foram encontradas em relação as populações de *T. pretiosum*, tanto no tamanho do seqüenciamento quanto no posicionamento dos nucleotídeos. Essas diferenças foram visíveis através do programa de computador ESEE 3.0 (Cabot, 1995), onde os seqüenciamentos foram alinhados (Tabela 5).

Tabela 5 Alinhamento dos seqüenciamentos das espécies de *Trichogramma*, com o código de cada população, através do programa ESEE 3.0.

Populações	Seqüenciamentos
TP-02	GTTTATAAAAACGAACCCGACTG-----CTCTCTC-----GCAA
TP-03	GTTTATAAAAACGAACCCGACTG-----CTCTCTC-----GCAA
TP-04	GTTTATAAAAACGAACCCGACTG-----CTCTCTC-----GCAA
TP-05	GTTTATAAAAACGAACCCGACTG-----CTCTCTC-----GCAA
TP-06	GTTTATAAAAACGAACCCGACTG-----CTCTCTC-----GCAA
TP-07	GTTTATAAAAACGAACCCGACTG-----CTCTCTC-----GCAA
TP-10	GTTTATAAAAACGAACCCGACTG-----CTCTCTC-----GCAA
TP-11	GTTTATAAAAACGAACCCGACTG-----CTCTCTC-----GCAA
TP-12	GTTTATAAAAACGAACCCGACTG-----CTCTCTC-----GCAA
TP-13	GTTTATAAAAACGAACCCGACTG-----CTCTCTC-----GCAA

Continuação

TP-02	GAGAGAGC-----GTTGATCTGGGCGCTCGTGT-----CGCGCACACACACCGTCT
TP-03	GAGAGAGC-----GTTGATCTGGGCGCTCGTGT-----CGCGCGCACACACACCAT
TP-04	GAGAGAGC-----GTTGATCTGGGCGCTCGTGT-----CGCGCACACACACACTAT
TP-05	GAGAGAGC-----GTTGATCTGGGCGCTCGTGT-----CGCGCACACACACACTAT
TP-06	GAGAGAGC-----GTTGATCTGGGCGCTCGTGT-----CGCGCGCACACACACCAT
TP-07	GAGAGAGC-----GTTGATCTGGGCGCTCGTGT-----CGCGCACACACACCATCT
TP-10	GAGAGAGC-----GTTGATCTGGGCGCTCGTGT-----CGCGCGCACACACACCAT
TP-11	GAGAGAGC-----GTTGATCTGGGCGCTCGTGT-----CGCGCACACACACACTAT
TP-12	GAGAGAGC-----GTTGATCTGGGCGCTCGTGT-----CGCGCACACACACACACT
TP-13	GAGAGAGC-----GTTGATCTGGGCGCTCGTGT-----CGCGCACACACACCGTCT
TP-15	GAGAGAGC-----GTTGATCTGGGCGCTCGTGT-----CGCGCACACACACACTAT
TP-16	GAGAGAGC-----GTTGATCTGGGCGCTCGTGT-----CGCGCACACACACACTAT
TP-17	GAGAGAGC-----GTTGATCTGGGCGCTCGTGT-----CGCGCACACACACCATCT
TAC-18	GAGAGAGGGAGAAGCGTTGATCTGGGCGTTCGTCTCGATTTTAGAGAACGTCGCCTTAAA
TG-19	GAGA--GC-----GTTGATCTGGGCGCTCGTGA CTCTCTCAATCTCGTGCACATCT
TL-20	GTCTCGATTTTAGAGAACGTCGCCTCAAACGATTAGCAAGAAAATAAAAGATGAACTCGT
TB-22	GAGAGAA-----GCGTTGATCTGGGCGTTCGTCTCGATTTTAGAGAACGTCGCCTTAAA
TR-23	ACGTTGATCTGGGTGTTCTGTCTCGTCTT-AGAGAACGTACCTTAAACGATTAGCAAGAA
	-----70+-----80+-----90+-----100+-----110+-----120+

TP-02 GAGAGAGC-----GTTGATCTGGGCGCTCGTGT-----CGCGCACACACACCGTCT
TP-03 GAGAGAGC-----GTTGATCTGGGCGCTCGTGT-----CGCGCGCACACACACCAT
TP-04 GAGAGAGC-----GTTGATCTGGGCGCTCGTGT-----CGCGCACACACACACTAT

Continuação

Continuação

TP-05 GAGAGAGC-----GTTGATCTGGGCGCTCGTGT-----CGCGCACACACACACTAT
 TP-06 GAGAGAGC-----GTTGATCTGGGCGCTCGTGT-----CGCGCGCACACACACCAT
 TP-07 GAGAGAGC-----GTTGATCTGGGCGCTCGTGT-----CGCGCACACACACCATCT
 TP-10 GAGAGAGC-----GTTGATCTGGGCGCTCGTGT-----CGCGCGCACACACACCAT
 TP-11 GAGAGAGC-----GTTGATCTGGGCGCTCGTGT-----CGCGCACACACACACTAT
 TP-12 GAGAGAGC-----GTTGATCTGGGCGCTCGTGT-----CGCGCACACACACACACT
 TP-13 GAGAGAGC-----GTTGATCTGGGCGCTCGTGT-----CGCGCACACACACCCGTCT
 TP-15 GAGAGAGC-----GTTGATCTGGGCGCTCGTGT-----CGCGCACACACACACTAT
 TP-16 GAGAGAGC-----GTTGATCTGGGCGCTCGTGT-----CGCGCACACACACACTAT
 TP-17 GAGAGAGC-----GTTGATCTGGGCGCTCGTGT-----CGCGCACACACACCATCT
 TAC-18 CGATTAGCAAGAAAATAAAAGATGAACACACTCGTGCTCGTCCTTAGCTGGCGCGCGTGC
 TG-19 CTCTCTCTCTAGCACTACTACTCACGTAGTAGCGAGTAAGAGAGCAGCGTGTGTGCGCGG
 TL-20 GCTCGTCTTAGCTGGCGCGCGCGCCGACCGTCTGGAGGGAGCTCGTTCGCGAGTTCTCGT
 TB-22 CGATTAGCAAGAAAATAAAAGATGAACGCACTCGTGCTCGTC-TTAGCTGGCGCGCGCGC
 TR-23 AATAAAAAGATGAACTCGTGCTCGTCTTAGCTGGCGCGCGCGCCGACCGTCTGGAGGGAG
 -----130+-----140+-----150+-----160+-----170+-----180+

TP-02 GCCTCAAACGAAACGCAAGAGAAAAGATGAATTGGCGTTCGTCTGGCTGGCGCGCGCGCT
 TP-03 GCCTCAAACGAAACGCAAGAGAAAGGATGAATTGGCGTTCGTCTGGCTGGCGCGCGCGCT
 TP-04 GCCTCAAACGAAACGCAAGAGAAAGGATGAATTGGCGTTCGTCTGGCTGGCGCGCGCGCT
 TP-05 GCCTCAAACGAAACGCAAGAGAAAAGATGAATTGGCGTTCGTCTGGCTGGCGCGCGCGCT
 TP-06 GCCTCAAACGAAACGCAAGAGAAAGGATGAATTGGCGTTCGTCTGGCTGGCGCGCGCGCT
 TP-07 GCCTCAAACGAAACGCAAGAGAAAAGATGAATTGGCGTTCGTCTGGCTGGCGCGCGCGCT
 TP-10 GCCTCAAACGAAACGCAAGAGAAAAGATGAATTGGCGTTCGTCTGGCTGGCGCGCGCGCT
 TP-11 GCCTCAAACGAAACGCAAGAGAAAAGATGAATTGGCGTTCGTCTGGCTGGCGCGCGCGCT
 TP-12 GCCTCAAACGAAACGCAAGAGAAAAGATGAATTGGCGTTCGTCTGGCTGGCGCGCGCGCT
 TP-13 GCCTCAAACGAAACGCAAGAGAAAAGATGAATTGGCGTTCGTCTGGCTGGCGCGCGCGCT
 TP-15 GCCTCAAACGAAACGCAAGAGAAAAGATGAATTGGCGTTCGTCTGGCTGGCGCGCGCGCT
 TP-16 GCCTCAAACGAAACGCAAGAGAAAAGATGAATTGGCGTTCGTCTGGCTGGCGCGCGCGCT
 TP-17 GCCTCAAACGAAACGCAAGAGAAAAGATGAATTGGCGTTCGTCTGGCTGGCGCGCGCGCT
 TAC-18 CGACCGTCTGTGGAGGGAGCTCGTTTCGGCGAGTTCTCGTTCGCGATCGTCGTGTTGCAC
 TG-19 GTTTTTTTGAGATACGCGTCGCTCAAACGAAACGCAAGAAAAGATGAATTGTTTCGT
 TL-20 TCGATCGTCTGTGTCACGTGTCGAGTCCCGGAGCTCCTTGCCTCGTTGCGAGAGCGGAC

Continuação

TB-22 CGACCGTCTGG--AGGGAGCTCGCTTCGGCGAGTTCTCGTTCGATCGCGTCGTGTTGCAC
 TR-23 CTCGCTTGCGAGTTCTCGTTCGATCGTCGTGTTGCACGTGTCGAGTCCCGAGCTGCTTG
 -----190+-----200+-----210+-----220+-----230+-----240+

TP-02 TACCGCTTGGAGAGTACTCACGTGTGTAAAAGCGCGCGAGTACTTCCGATCGTTCTGCGT
 TP-03 TACCGCTTGGAGAGTAATCACGTGTGTAAAAGCGCGCGAGTACTTCCGATCGTTCTGCGT
 TP-04 TACCGCTTGGAGAGTAATCACGTGTGTAAAAGCGCGCGAGTACTTCCGATCGTTCTGCGT
 TP-05 TACCGCTTGGAGAGTACTCACGTGTGTAAAAGCGCGCGAGTACTTCCGATCGTTCTGCGT
 TP-06 TACCGCTTGGAGAGTAATCACGTGTGTAAAAGCGCGCGAGTACTTCCGATCGTTCTGCGT
 TP-07 TACCGCTTGGAGAGTACTCACGTGTGTAAAAGCGCGCGAGTACTTCCGATCGTTCTGCGT
 TP-10 TACCGCTTGGAGAGTACTCACGTGTGTAAAAGCGCGCGAGTACTTCCGATCGTTCTGCGT
 TP-11 TACCGCTTGGAGAGTACTCACGTGTGTAAAAGCGCGCGAGTACTTCCGATCGTTCTGCGT
 TP-12 TACCGCTTGGAGAGTACTCACGTGTGTAAAAGCGCGCGAGTACTTCCGATCGTTCTGCGT
 TP-13 TACCGCTTGGAGAGTACTCACGTGTGTAAAAGCGCGCGAGTACTTCCGATCGTTCTGCGT
 TP-15 TACCGCTTGGAGAGTACTCACGTGTGTAAAAGCGCGCGAGTACTTCCGATCGTTCTGCGT
 TP-16 TACCGCTTGGAGAGTACTCACGTGTGTAAAAGCGCGCGAGTACTTCCGATCGTTCTGCGT
 TP-17 TACCGCTTGGAGAGTACTCACGTGTGTAAAAGCGCGCGAGTACTTCCGATCGTTCTGCGT
 TAC-18 GTGTCGAGTCCCGAGCTACTTGCCTCGTTGCGAGAGCGGACCGACACTTCGTCTTCTTC
 TG-19 CTAGCTGGCGTGCGCGCGCTTACCGCTTGGAGAGTTCTCGCTTAGCGCGAGAACTTCCGA
 TL-20 CGACACTTCGCCGCACAATTAGTGCGTGTGACAACACTGCGAGGCGGACCTCTATTGTCC
 TB-22 GTGTCGAGTCCCGAGCTACTTGCCTCGTTGCGAGAGCGGACCGACACTTCGTCTCTTGT
 TR-23 CCTCGTTGCGAGAGCGGACCGACACCTCGTATGTGTTATCATATATTATATGATGATATA
 -----250+-----260+-----270+-----280+-----290+-----300+

TP-02 TCGAGTCCCGAGCTTCTCGCCTCGTCGAGCAGCGGACCGACTGTCAGTACACGATCAGG
 TP-03 TCGAGTCCCGAGCTTCTCGCCTCGTCGAGCAGCGGACCGACTGTCAGTACACGATCAGG
 TP-04 TCGAGTCCCGAGCTTCTCGCCTCGTCGAGCAGCGGACCGACTGTCAGTACACGATCAGG
 TP-05 TCGAGTCCCGAGCTTCTCGCCTCGTCGAGCAGCGGACCGACTGTCAGTACACGATCAGG
 TP-06 TCGAGTCCCGAGCTTCTCGCCTCGTCGAGCAGCGGACCGACTGTCAGTACACGATCAGG
 TP-07 TCGAGTCCCGAGCTTCTCGCCTCGTCGAGCAGCGGACCGACTGTCAGTACACGATCAGG
 TP-10 TCGAGTCCCGAGCTTCTCGCCTCGTCGAGCAGCGGACCGACTGTCAGTACACGATCAGG
 TP-11 TCGAGTCCCGAGCTTCTCGCCTCGTCGAGCAGCGGACCGACTGTCAGTACACGATCAGG

Continuação

Continuação

TP-12 TCGAGTCCCGGAGCTTCTCGCCTCGTcGAGCAGCGGACCGACTGTCAGTACACGATCAGG
 TP-13 TCGAGTCCCGGAGCTTCTCGCCTCGTTCGAGCAGCGGACCGACTGTCAGTACACGATCAGG
 TP-15 TCGAGTCCCGGAGCTTCTCGCCTCGTTCGAGCAGCGGACCGACTGTCAGTACACGATCAGG
 TP-16 TCGAGTCCCGGAGCTTCTCGCCTCGTTCGAGCAGCGGACCGACTGTCAGTACACGATCAGG
 TP-17 TCGAGTCCCGGAGCTTCTCGCCTCGTTCGAGCAGCGGACCGACTGTCAGTACACGATCAGG
 TAC-18 TTGTGTGTGTGTGTGTGTGCCAAGCGCGCGGCCACACACAGTGATGATGTGTACGACAA
 TG-19 TCGTACTGCGTCGAGTCCCGGAGCTTCTCGCCTcGTCGAGCAGCGGACCGACTGCTAgAA
 TL-20 ACGACGCGTTTGCAGCGTGCTCTCGTGCGTGCGTGCGGACGGCGATTCAATTCGACGT
 TB-22 ACGTGTTGTGTGTTTATACAACGCACACACGTACGCGGCGACAACACTGCGAGCCNGACCT
 TR-23 AAATAATACGACAACGCGGCGAGCCGAACCTCTATTGTCCACGACTTGTAAGCGAACGTG
 -----310+-----320+-----330+-----340+-----350+-----360+

TP-02 CTCGTCCATGATTCGGTACACTAGAAAAGGCGCGCGCGCTCT-GCTTATTTTATTATA
 TP-03 CTCGTCCATGATTCGGTACACTAGAAA-GGCGCGCGCGCGCTC--GC-TATTTTATAATA
 TP-04 CTCGTCCATGATTCGGTACACTAGAAA-GGCGCGCGCGCGCTC--GC-TATTTTATTATA
 TP-05 CTCGTCCATGATTCGGTACACTAGAAA-GGCGCGCGCGCGCTCTCGC-TATTTTATTATA
 TP-06 CTCGTCCATGATTCGGTACACTAGAAA-GGCGCGCGCGCGCTC--GC-TATTTTATTATA
 TP-07 CTCGTCCATGATTCGGTACACTAGAAA-GGCGCGCGCGCGCTCTCGC-TATTTTATAATA
 TP-10 CTCGTCCATGATTCGGTACACTAGAAA-GGCGCGCGCGCGCTCTCGC-TATTTTATTATA
 TP-11 CTCGTCCATGATTCGGTACACTAGAAA-GGCGCGCGCGCGCTCTCGC-TATTTTATTATA
 TP-12 CTCGT-CATGATTCGGTACACTAGAAA-GGCGCGCGCGCGCTCTCGC-TATTTTATTATA
 TP-13 CTCGCCCATGATTCGGTACACTAGAAA-GGCGCGCGCGCGCTCTCGC-TATTTTATTATA
 TP-15 CTCGTCCATGATTCGGTACACTAGAAA-GGCGCGCGCGCGCTCTCGC-TATTTTATTATA
 TP-16 CTCGTCCATGATTCGGTACACTAGAAA-GGCGCGCGCGCGCTCTCGC-TATTTTATTATA
 TP-17 CTCGTCCATGATTCGGTACACTAGAAA-GGCGCGCGCGCGCTCTCGC-TATTTTATAATA
 TAC-18 CACTGCGAGCCGGACCTCTATTGTACAGACGCGTAGGCGAGCGTGCTCTCGTGCGTGCG-
 TG-19 CACGATCAGGCTCGTCCATGATTCGGTTATCGAAACGCGCGCGCGCGCGCTGTACGGC
 TL-20 TGCGAGCGTCGCGTACGCGACAAGGCTAGGACGGTACATTACATGGCACCGAGTTGCTCC
 TB-22 NTATTGTACGACNCGTAGGCGANCGTGCTCTCGCGCGTGCGTGCCNACGGCGATTCACT
 TR-23 CTCTCGTGCGTGCGTGCGGACGGCGATTCAATTCGACGTTGCGAGCGTC----ACGCGC
 -----370+-----380+-----390+-----400+-----410+-----420+

Continuação

Continuação

TP-02 NCTC-TGGCTTNCTCGAACAACAACAACGA-GTCTTTTTTTTCGAT.....
 TP-03 GCTC-TGGCTAGCTCGAACAACAACAACGA-GTCTTTTTTCTCGAT.....
 TP-04 GCTC-TGGCTAGCTCGAACAACAACAACGA-GTCTTTTTTCTCGAT.....
 TP-05 GCTC-TGGCTAGCTCGAACAACAACAACGA-GTCTTTTTTCTCGAT.....
 TP-06 GCTC-TGGCTAGCTCGAACAACAACAACGA-GTCTTTTTTCTCGAT.....
 TP-07 GCTCCTGGCTAGCTCGAACAACAACAACGA-GTCTTTTTTCTCGAT.....
 TP-10 GCGCCTGGCTAGCTCGAACAACAACAACGA-GTCTTTTTTCTCGAT.....
 TP-11 GCGCCTGGCTAGCTCGAACAACAACAACGAAGTCTTTTTTCTCGAT.....
 TP-12 GCGCCTGGCTAGCTCGAACAACAACAACGA-GTCTTTTTTCTTGAT.....
 TP-13 GCTC-TGGCTAGCTCGAACAACAACAACGA-GTCTTTTTTCTCGAT.....
 TP-15 GCGCCTGGCTAGCTCGAACAACAACAACGA-GTCTTTTTTCTCGAT.....
 TP-16 GCTC-TGGCTAGCTCGAACAACAACAACGAAGTCTTTTTTCTCGAT.....
 TP-17 GCTC-TGGCTAGCTCGAACAACAACAACGA-GTCTTTTTTCTCGAT.....
 TAC-18 TGCGCGACGGCCGATTCAATTCGACGTTGCGAGCGTCACGCGCGCTTGACAAGGCTAGGA
 TG-19 TAGTTCGGATAATATAAAAAATTGCTCGCAAATTTTGTTGAATGAGTCTTCTTTCTCGAT
 TL-20 TCGCTTAGGTGAGGGTCATCTTTGTCGAAAATTTTCTTGAT.....
 TB-22 TCGACGTTNCGAAGCCGTCACGCGCGCTTGACAANGGNTAGGACGGNATATTACAATGGC
 TR-23 GCTTGACAAGGCTAGGACGGTATATTACATGGCACGTAGGTACTTATTTTTTTTTTTTCA
 -----430+-----440+-----450+-----460+-----470+-----480+

TP-02
 TP-03
 TP-04
 TP-05
 TP-06
 TP-07
 TP-10
 TP-11
 TP-12
 TP-13
 TP-15

Continuação

Continuação

TP-16
 TP-17
 TAC-18 CCGTATATTACATGGCACGTTGGTGGTTCTTTNTGGNCGATCCATTTCGATACAGAAAAAA
 TG-19
 TL-20
 TB-22 ACGCTGGGCTTCNTTTTTTTTTCTCTGGTTCGGTTCGNNCCNACCAGAAAGAAACNAAAA
 TR-23 TATTTNATATAAAAAAAAAAATTAACATCTTTGTNAAAAAANTTTTTTTGAT
 -----490+-----500+-----510+-----520+-----530+-----540+

 TP-02
 TP-03
 TP-04
 TP-05
 TP-06
 TP-07
 TP-10
 TP-11
 TP-12
 TP-13
 TP-15
 TP-16
 TP-17
 TAC-18 ACATCTTGTTGAAAATTTTNTTCGAT
 TG-19
 TL-20
 TB-22 ANGACATNTTGGTGAAAATTTTTTTCGAT
 TR-23
 -----550+-----560+-----570+-----580+-----590+-----600+

4.3 Importância da Região ITS2 do rDNA

É importante ressaltar que taxonomia e seqüenciamento da região ITS2 do rDNA caminham juntas, ou seja, apenas o seqüenciamento isolado de diversas amostras de *Trichogramma* não é suficiente para a identificação de uma determinada espécie.

O uso do seqüenciamento da região ITS2 foi escolhido por se tratar de uma região que se tem mostrado pouco modificada através da evolução (Orrego & Agudelo-Silva, 1993). O rDNA está presente em todos os organismos e é composto de várias regiões (genes e espaçadores), que envolvem diferentes níveis. O DNA ribossomal é útil para estudos filogenéticos em vários níveis taxonômicos, inclusive ao nível de espécie (Silva, 1999). Entre espécies, as regiões dos espaçadores internos (ITS1 e ITS2) são freqüentemente usadas como auxílio à taxonomia em vários grupos, como fungos (Carbone & Kohn 1993) e também em insetos (Campbell et al., 1993, Hoy, 1994). Portanto, como todos os organismos possuem rDNA composto de várias regiões (genes e espaçadores) (Silva et al., 1999), pode-se utilizar a técnica não só para a identificação de *Trichogramma*, mas em vários insetos como para espécies de parasitóides do gênero *Nasonia* (Hymenoptera: Pteromalidae) (Campbell et al., 1993) e gafanhotos da subfamília Melanopline (Orthoptera: Acrididae) (Kuperus & Chapco, 1994) utilizando a região ITS2 do rDNA para sua identificação.

Além da identificação de espécies, o seqüenciamento é útil na análise filogenética usando o programa PAUP 3.1.1 e a posterior elaboração de cladogramas (Campbell et al., 1993, Stouthamer et al., 1999).

A técnica do seqüenciamento da região ITS2 do rDNA pode ser usada na identificação de *Trichogramma*, porque a variação do seqüenciamento dentro de espécies é pequena quando comparada entre espécies e todas as espécies morfológicamente semelhantes (espécies crípticas) são separadas pelas diferenças no seqüenciamento (Stouthamer et al., 1999). Entre indivíduos da mesma espécie, as seqüências da região ITS2 são similares e não há evidências de duas ou mais famílias de genes que diferem dentro do genoma de um simples indivíduo, como observado neste

trabalho para os indivíduos de *T. pretiosum* e por Vogler & Desalle (1994) em Coleoptera. Os dados encontrados neste trabalho estão de acordo com os obtidos por Silva (1999) e Stouthamer et al. (1999).

A técnica de sequenciamento da região ITS2, além de auxiliar na identificação de espécies, pode detectar possíveis contaminações em criações de laboratório para pesquisas ou para liberação inundativa em campo. Uma outra utilidade, é o estudo de dispersão do parasitóide e avaliação do parasitismo após a liberação. Para avaliar este parasitismo no campo, pode-se usar um simples PCR com ovos parasitados por *Trichogramma*, para auxiliar na tomada de decisões rápidas de controle, pois esse parasitismo pode ser detectado em apenas doze horas após a oviposição (Amornsak et al., 1998).

A obtenção dos produtos de PCR, juntamente com a análise de restrição, pode ser facilmente realizada em laboratórios que possuem máquinas de PCR e o DNA usado nos trabalhos pode ser preservado de várias maneiras seja em álcool 100%, organismo vivo, congelado ou material seco (Kan et al., 1996). Esta é uma grande vantagem em relação a marcadores baseados em isoenzimas que necessitam de material fresco ou armazenado em nitrogênio líquido (Stouthamer et al., 1999). A identificação de *Trichogramma* baseado em RAPD-PCR, usado por Vanlerberghe-Massutti (1994), tem como desvantagem a necessidade de pelo menos 50 indivíduos para se ter resultados positivos no sentido de extração de DNA. Outra técnica também utilizada por Vanlerberghe-Massutti (1994), mostra que a utilização de DNA mitocondrial de *Trichogramma* requer uma quantidade muito grande de indivíduos para se ter sucesso, ao passo que utilizando-se a técnica de sequenciamento da região ITS2, com apenas um indivíduo é possível extrair DNA suficiente para o sequenciamento. A técnica apresentada neste trabalho é rápida, relativamente barata e para a realização dos trabalhos, desde a extração do DNA até o sequenciamento, basta ter uma certa rotina laboratorial.

4.4 Caracterização Molecular e Morfológica de *Trichogramma lasallei* e *T. rojasi*

Recentemente, *T. lasallei* foi registrada no Brasil (Querino et al., 2000). Trata-se de uma espécie muito semelhante morfológicamente a *T. rojasi*, já registrada há alguns anos no país. Além dessa semelhança morfológica, essas espécies são simpátricas, tendo sido coletadas no Estado do Paraná e criadas no Departamento de Zoologia da UFPR. Os caracteres morfológicos para a separação dessas espécies foram discutidos por Pinto (1998), que relacionou os seguintes caracteres para separar *T. lasallei* de *T. rojasi*: cápsula genital mais larga; processos ventrais mais anteriores; flagelo do macho com cerdas mais longas e mais estreitas; cerda mesoescutelar anterior mais curta e fileira posterior de cerdas da asa posterior mais curta. Em *T. rojasi*, a cápsula genital é aproximadamente 0,30 tão larga quanto longa, os processos ventrais estão posicionados a menos que 0,1 da distância basal e a fileira de cerdas da asa posterior apresenta cerca de 12 cerdas alongadas, atingindo o ápice da asa. Comparado com *T. rojasi*, *T. lasallei* apresenta a cápsula genital de aproximadamente 0,35 tão larga quanto longa, o processo ventral está posicionado a cerca de 0,20 da distância basal e a fileira de cerdas da asa posterior é curta, contendo apenas 5-8 cerdas que não atingem o ápice da asa. Nota-se portanto, que as diferenças são mínimas e identificações errôneas podem ocorrer.

Portanto, a separação morfológica entre *T. lasallei* e *T. rojasi* só pode ser feita por especialistas no grupo. Entretanto, ambas podem ser também perfeitamente caracterizadas através do sequenciamento da região ITS2 do rDNA. Com base nesse sequenciamento, foram constatadas diferenças tanto no tamanho da sequência quanto na posição de vários nucleotídeos, mostrando claramente que são espécies distintas (Tabela 6).

Continuação

```

TL-20 -----CAAGGCTAGGACGGTACATTACATGGCACCGAGTTGCTCCTCGCTTAGGTGAGG
TR-23 GCTTGACAAGGCTAGGACGGTATATTACATGGCACGTAGGTACTTATTTTTTTTTTTTCA
      -----430+-----440+-----450+-----460+-----470+-----480+

TL-20 GT-----CATCTTTGTCGAAAATTTTC--TTGAT
TR-23 TATTTNATATAAAAAAAAAAATTAACATCTTTGTNAAAAAANTTTTTTTGAT
      -----490+-----500+-----510+-----520+-----530+-----540+

```

Este é um exemplo claro da utilidade do seqüenciamento da região ITS2 do rDNA como auxílio a identificação de espécies próximas de *Trichogramma*.

Assim, uma vez caracterizada morfológicamente uma espécie de *Trichogramma*, por mais sutis que sejam as diferenças, a análise molecular permitirá posteriormente, que um técnico de laboratório, com conhecimento da rotina dessa análise, possa separar espécies muito semelhantes entre si ou mesmo para tirar dúvidas que possam aparecer na caracterização morfológica.

Com os resultados dos seqüenciamentos, tem-se uma maior precisão na escolha das espécies a serem usadas em programas de controle biológico aplicado, ocasionando aumento da credibilidade em se utilizar *Trichogramma* no controle de lepidópteros pragas.

Portanto, é preciso estimular trabalhos futuros com o objetivo de abranger não só as espécies brasileiras, mas também de toda a América Latina, numa visão mais ampla das espécies encontradas no continente.

Um vez que as espécies são seqüenciadas, forma-se um banco de dados, como o que foi feito nesta tese, através do alinhamento das seqüências da região ITS2 do rDNA (Tabela 5). De posse desses dados, comparações futuras serão feitas para a identificação de espécies de *Trichogramma*. Tomando-se como exemplo, se uma população de

Trichogramma foi coletada e há dúvidas na identificação, faz-se o sequenciamento, comparando-se esta população recebida com as populações já sequenciadas. Com isso, a identificação será feita analisando-se a sequência dessa população (tamanho e posição dos nucleotídeos) com as outras já sequenciadas e alinhadas. Se esse sequenciamento for diferente dos demais, possivelmente estará sendo identificada uma nova espécie, sempre levando em consideração os caracteres morfológicos.

Com o registro de *T. lasallei*, tem-se no momento 15 espécies registradas no Brasil. Portanto é preciso coletar as espécies que ainda não foram sequenciadas neste trabalho para completar a chave. Assim uma chave molecular completa de todas as espécies brasileiras de *Trichogramma* poderá ser elaborada, facilitando a comprovação de espécies novas ou novos registros que poderão ser detectados no País.

4.5 Detecção de *Wolbachia* em uma População de *Trichogramma atopovirilia*

Os resultados mostraram que se utilizando um PCR com "primers" específicos *wsp* (Braig et al., 1998) e *ftsZ* (Meer, 1999) para a constatação de *Wolbachia* em *Trichogramma*, puderam ser verificadas bandas de DNA amplificadas no gel. Isso mostra que a população de *T. atopovirilia* coletada estava infectada por *Wolbachia* (Figura 6),

Trabalhando com a mesma população e utilizando-se Tetrex 500 (tetraciclina) na base de 100mg/ml de mel (Parra et al., 1991), para reverter a razão sexual de *Trichogramma* (Prezotti, inf. pes.), foram obtidos machos já na primeira geração. Isto mostra que há um microorganismo presente, responsável pela partenogênese reversível, que foi identificado através do PCR, como *Wolbachia*.

Figura 6. Amplificação do DNA de *Wolbachia* em gel de agarose a 1%. Linhas 1 e 6 marcadores moleculares; Linha 2: *Wolbachia* ("primer" *wsp*); Linha 3: branco; Linha 4: *Wolbachia* ("primer" *ftsZ*) e Linha 5: branco.

Pinto & Stouthamer (1994) relataram que populações telítocas podem ou não estar contaminadas por *Wolbachia*. A população telítoca sem *Wolbachia* é denominada população telítoca por hibridação. Essa população é suspeita de ser permanentemente telítoca, onde não há possibilidade de reverter essa razão sexual da população telítoca para sexuada, através do tratamento com antibióticos e/ou altas temperaturas.

inicialmente deve-se liberar a população sexuada, pois ela é mais agressiva do que a telítoca e um maior número de descendentes fêmeas é produzido. Quando a densidade do hospedeiro diminui, utiliza-se a população telítoca. Hospedeiros que ocorrem esporadicamente podem ser controlados com a população telítoca, pois ela tem uma maior capacidade de colonização. Em liberações inundativas, a população telítoca é mais indicada, pelo fato de ter um menor custo de produção/fêmea.

Meer (1999) mostrou que, comparando populações telítocas com sexuadas em casa-de-vegetação, a população com a presença de *Wolbachia* foi mais eficiente em relação ao número de ovos parasitados. Por outro lado, em relação à dispersão, a população sexuada levou a melhores resultados. É importante ressaltar que para as condições climáticas de um país tropical, a presença de *Wolbachia* em *Trichogramma*, em temperaturas elevadas, faz com que populações inicialmente telítocas passem a sexuadas, pois essas α -proteobactérias não suportam calor. Um outro fator a ser considerado é que Meer (1999) trabalhou apenas em condições de laboratório e não em campo. Porém, como relatado anteriormente, foi constatada uma população brasileira com *Wolbachia*, mostrando a sua adaptação a regiões de temperaturas mais elevadas.

Pintureau et al. (1999) estudaram o efeito de altas temperaturas e o tratamento com antibióticos em populações telítocas de *Trichogramma cordubensis* Vargas & Cabello, 1985. Esses autores concluíram que existem potencialidades de adaptação dessas populações a altas temperaturas, o que explicaria em parte a distribuição desses simbiossistemas entre diversas populações hospedeiras. Essa mesma adaptação pode estar ocorrendo com *Wolbachia* da população de *T. atopovirilia* de Sete Lagoas, MG. Este é o primeiro trabalho no Brasil utilizando um PCR com "primers" específicos para detecção de *Wolbachia* e também o primeiro relato dessa α -proteobactéria infectando uma população brasileira de *Trichogramma*. Pesquisas futuras devem ser feitas com o objetivo de avaliar a biologia comparada de populações sexuadas com populações telítocas (com e sem *Wolbachia*).

De posse dos resultados, pode-se tomar a decisão correta da população a ser utilizada em liberações inundativas, visando o controle de lepidópteros pragas em agroecossistemas agrícolas.

5 CONCLUSÕES

- A utilização do seqüenciamento da região ITS2 do rDNA é uma importante técnica na identificação de espécies de *Trichogramma*.
- DNA suficiente para o seqüenciamento é obtido pela técnica de extração, através de Chelex 5%, com cinco indivíduos de *Trichogramma*.
- As populações de *T. pretiosum* seqüenciadas mostram um padrão repetível e podem ser usadas para comparação de futuros seqüenciamentos de populações desta espécie.
- É possível a elaboração de uma precisa e eficiente chave molecular de espécies de *Trichogramma*, utilizando-se enzimas de restrição e os comprimentos dos seqüenciamentos.
- Os seqüenciamentos da região ITS2 do rDNA de *T. rojasi* e *T. lasallei*, espécies morfológicamente muito semelhantes, confirmam a ocorrência de *T. lasallei* no Brasil.
- *Wolbachia* ocorre em uma população telítica de *T. atopovirilia* do Brasil.

- A técnica do seqüenciamento da região ITS2 do rDNA deve ser aplicada em conjunto com características taxonômicas para a correta identificação de *Trichogramma*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AMORNSAK, W., GORDH, G.; GRAHAM, G. Detecting parasitised eggs with polymerase chain reaction and DNA sequence of *Trichogramma australicum* Girault (Hymenoptera: Trichogrammatidae). **Australian Journal of Entomology**, v.37, p.174-179. 1998.
- BABI, A.; PINTUREAU, B.; VOEGELÉ, J. Étude de *Trichogramma dendrolimi* (Hym.:Trichogrammatidae) description d'une nouvelle sous-espèce. **Entomophaga**, v.29, p.369-379. 1984.
- BERLOCHER, S.H. Insect Molecular Systematics. **Annual Review of Entomology**, v. 29, p.403-433. 1984.
- BLACK IV, W.C.; DUTEAU, N.M.; PUTERKA, G.J.; NECHOLS, J.R.; PETTORINI, J.M. Use of random amplified polymorphic DNA polymerase chain reaction (RAPD-PCR) to detect DNA polymorphisms in aphids (Homoptera: Aphididae). **Bulletin of Entomological Research**, v.82, p.151-159. 1992.
- BOWEN, M.F. A biometrical study of two morphologically similar species of *Trichogramma*. **Annals of the Entomological Society of America**, v.29, p.119-125. 1936.

- BRAIG, H.R.; ZHOU, W.; DOBSON, S.; O' NEILL, S.L. Cloning and characterization of a gene encoding the major surface protein of the bacterial endosymbiont *Wolbachia*. **Journal of Bacteriology**, v.180, p.2373-2378. 1998.
- BREEUWER, J.A.J. *Wolbachia* and cytoplasmatic incompatibility in the spider mites *Tetranychus urticae* and *T. turkestanii*. **Heredity**, v.79, p.41-47. 1997.
- BRUN, P.G.; MORAES, G.W. de; SOARES, L.A. Três espécies novas de Trichogrammatidae parasitóides de lepidópteros desfolhadores da mandioca e do eucalipto. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.19, p. 805-810. 1984.
- CABOT, E.L. **The Eyeball Sequence Editor (ESEE)**, version 3.0s. Department of Biology, University of Rochester, Rochester, NY. 1995.
- CAMPBELL, B.C., STEFFEN-CAMPBELL, J.D.; WERREN, J.H. Phylogeny of the *Nasonia* species complex (Hymenoptera: Pteromalidae) inferred from an internal transcribed spacer (ITS2) and 28S rDNA sequences. **Insect Molecular Biology**, v.2, p.225-237. 1993.
- CARBONE, I. ; KOHN, L. Ribosomal DNA sequence divergence within transcribed spacer 1 of the Sclerotiniaceae. **Mycologia**, v.85, p. 15-427. 1993.
- CIOCIOLA, JR, A.I.; ALMEIDA, R.P.; STOUTHAMER, R. Does degradation of DNA in dead *Trichogramma* individuals lead to failure of their identification using ITS2 PCR ? **Proceedings of the section Experimental and Applied Entomology of the Netherlands Entomological Society (N.E.V.)**, v.11, p.33-36. 2000.
- FERREIRA, M.E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares RAPD e RFLP em análise genética**. Brasília: EMBRAPA-CENARGEM, 1995. 220p. (EMBRAPA-CENARGEM Documento 20).

FLANDERS, S.E. Mass production of egg parasites of the genus *Trichogramma*. **Hilgardia**, California, v.4, n.16, p.465-501. 1930.

FLANDERS, S.E.; QUEDNAU, W. Taxonomy of the genus *Trichogramma* **Entomophaga**, v.4, p.285-294. 1960.

GOMES, J. Instruções para remessa e liberação de *Trichogramma* no combate aos ovos da broca dos frutos do tomateiro (*Nealeucinodes elegantalis*). **Boletim do Campo**, n.5, v.27, p.15-26. 1949.

GOMES, J. Histórico do combate biológico no Brasil. **Botelim do Instituto de Experimentação Agrícola do Estado do Rio de Janeiro**, n.21, p.89-97. 1962.

GRENIER, S.; PINTUREAU, B.; HEDDI, A.; LASSABLIERE, F.; JAGER, C.; LOUIS, C.; KHATCHADOURIAN, C. Successful horizontal transfer of *Wolbachia* symbionts between *Trichogramma* wasps. **Proceedings of the Royal Society of London, Series B**. v.265, p.1441-1445. 1998.

HEIMAN, M. **Webcutter 2.0** <http://www.ccsi.com/firstmarket/firstmarket/cutter/cut2.html> 1997(10 de Agosto de 1999).

HOY, M. A. **Insect molecular genetics. An introduction to principles and applications**. San Diego: Academic Press Inc. 1994. 546p.

HUNG, C.F.H.; HUO, S. Malic enzyme, phosphoglucomutase and phosphoglucose isomerase isoenzymes in *Trichogramma* (Hym.:Trichogrammatidae). **Entomophaga**, v.30, p.143-149. 1985.

- KAN, F.J.P.M. van; SILVA, I.M.M.S.; SCHILTHUIZEN, M.; PINTO, J.D.; STOUTHAMER, R. Use of DNA-based Methods for the identification for the identification of minute wasps of the genus *Trichogramma*. **Proceedings of the section Experimental and Applied Entomology of the Netherlands Entomological Society (N.E.V.)**, v.7, p.233-237, 1996.
- KAN, F.J.P.M. van; HONDA, J.; PINTO, J.D.; STOUTHAMER, R. Molecular Based Techniques for *Trichogramma* identification. **Proceedings of the section Experimental and Applied Entomology of the Netherlands Entomological Society (N.E.V.)**, v.8, p.59-62, 1997.
- KING, L.M.; SCHAAL, B.A. Ribosomal-DNA variation and distribution in *Rubeckia missouriensis*. **Evolution**, v.43, n.5, p. 1117-1119. 1989.
- KUPERUS, W.R.; CHAPCO, W. Usefulness of internal transcribed spacer regions of ribosomal DNA in Melanopline (Orthoptera, Acrididae) systematics. **Annals of the Entomological Society of America**, v.87, p.751-754. 1994.
- LANDRY, B.S.; DEXTRASE, L.; BOIVIN, G. Random amplified polymorphic DNA markers for DNA fingerprinting and genetic variability assessment of minute parasitic wasp species (Hymenoptera: Mymaridae and Trichogrammatidae) used in biological control programs of phytophagous insects. **Genome**. v.36. p.580-587. 1993.
- LAURENT, V.; WAJNBERG, E.; MANGIN, B.; SCHIEX, T.; GASPIN, C.; VANLERBERGHE-MASUTTI, F. A composite genetic map of the parasitoid wasp *Trichogramma brassicae* based on RAPD markers. **Genetics**, v.150, p.275-282, 1998.

- LAVEN, H. Eradication of *Culex pipiens fatigans* through cytoplasmatic incompatibility. **Nature**, v.261, p.383-384. 1967.
- LI, L.Y. Worldwide Use of *Trichogramma* for Biological Control on different Crops: A Survey. In: Wajnberg, E. & Hassan, S.A.eds. **Biological Control With Egg Parasitoids**. Oxon, UK: CAB Internacional. 1994. p. 37-53.
- MARQUES, J. Aspectos da biologia e do perfil eletroforético enzimático de alguns Trichogrammatidae brasileiros. Belo Horizonte, 1982. 56p. Tese (Mestrado) UFMG.
- MEER, M.M.M. van Phylogeny and host interactions of thelytoky inducing *Wolbachia* in Hymenoptera. Wageningen, 1999. 118p. Thesis (PhD) - Wageningen Agricultural University.
- MEER, M.M.M. van; WITTEVELDT, J.; STOUTHAMER, R. Phylogeny of the arthropod endosymbiont *Wolbachia* based on the wsp gene. **Insect Molecular Biology**, v.8, p.399-408. 1999.
- MIURA, K.; MATSUDA, S.; MURAI, T. Esterase zymograms of *Trichogramma chilonis* Ishii and *T. ostrinae* Pang et Chen (Hymenoptera, Trichogrammatidae). **Japan Journal of Entomology**, v.58, p.689-692, 1990.
- MORITZ, C.; HILLIS, D.M. Molecular systematics: context and controversies. In: **Molecular Systematics**. HILLIS, D.M.; MORITZ, C.; MABLE, K.K. (Eds.) Sunderland, MA, EUA. 1996. p. 1-13.
- MULLIS, K.B.; FALOONA, F.A. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. **Methods in Enzymology**, v.155, part F, p.333-350, 1987.

- NAGARAJA, H. Descriptions of new Trichogrammatidae (Hymenoptera) from Brazil. **Revista Brasileira de Biologia**, v.43, p.37-44. 1983.
- NAGARAJA, H.; NAGARKATTI, S. A key to some new world species of *Trichogramma* (Hymenoptera: Trichogrammatidae), with descriptions of four new species. **Proceedings of the Entomological Society of Washington**, v.75, p.288-297. 1973.
- NAGARKATTI, S.; NAGARAJA, H. Redescriptions of some known species of *Trichogramma* (Hymenoptera: Trichogrammatidae) showing the importance of the male genitalia as a diagnostic character. **Bulletin of Entomological Research**, v.61, p.13-31, 1971.
- NAGARKATTI, S.; NAGARAJA, H. Biosystematics of *Trichogramma* and *Trichogrammatoidea* species. **Annual Review of Entomology**, v.22, p.157-176. 1977.
- OATMAN, E.R.; PLATNER, G.R. Biosystematic studies of *Trichogramma* species: 1. Populations from California and Missouri. **Annals of the Entomological Society of America**, v.66, p.1099-1102. 1973.
- OPIJEN, T. van; BREEUWER, J.A.J. High temperatures eliminate *Wolbachia*, a cytoplasmic incompatibility inducing endosymbiont, from the two-spotted spider mite. **Experimental and Applied Acarology**, v.23, p.871-881. 1999.
- ORREGO, C.; AGUDELO-SILVA, F. Genetic variation in the parasitic wasp *Trichogramma* (Hymenoptera: Trichogrammatidae) revealed by DNA amplification of a section of the nuclear ribosomal repeat. **Florida Entomologist**, v.76, p.519-524, 1993.

- PARRA, J.R.P.; SCHMIDT, F.G.V; ZUCCHI, R.A. Antibióticos utilizados para obtenção de machos de *Trichogramma*. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENTOMOLOGIA, 12.; SIMPÓSIO INTERNACIONAL SOBRE "BICUDO" DO ALGODOEIRO, 1.; ENCONTRO SOBRE "COCHONILHA DA PALMA FORRAGEIRA", 2.; ENCONTRO SOBRE MOSCAS-DAS-FRUTAS, 3., Recife, 1991. **Resumos**. Recife, SEB, 1991. p.260.
- PARRA, J.R.P. Técnicas de criação de *Anagasta kuehniella*, hospedeiro alternativo para produção de *Trichogramma* spp. In: **Curso de Controle Biológico com *Trichogramma***. ESALQ/USP. 111p. 1996.
- PARRA, J.R.P. Técnicas de criação de *Anagasta kuehniella*, hospedeiro alternativo para produção de *Trichogramma*. In: Parra, J.R.P. & R.A. Zucchi (eds.) ***Trichogramma e o Controle Biológico Aplicado***, p.121-150. 1997.
- PARRA, J.R.P.; ZUCCHI, R.A. (Eds.) ***Trichogramma e o Controle Biológico Aplicado***. Piracicaba: FEALQ. 1997. 324p.
- PINTO, J.D. Taxonomia de Trichogrammatidae (Hymenoptera) com ênfase nos gêneros que parasitam Lepidoptera. In: Parra, J.R.P. & R.A. Zucchi (eds.) ***Trichogramma e o Controle Biológico Aplicado***, p.13-39. 1997.
- PINTO, J.D. Systematics of the North American species of *Trichogramma* Westwood (Hymenoptera: Trichogrammatidae). **Memories of the Entomological Society of Washington**, v.22, 287p. 1998.
- PINTO, J.D.; OATMAN, E.R. Additions to Nearctic *Trichogramma* (Hymenoptera: Trichogrammatidae). **Proceedings of the Entomological Society of Washington**, v.87, p.176-186. 1985.

- PINTO, J.D.; OATMAN, E.R. Description of three new *Trichogramma* (Hymenoptera: Trichogrammatidae) from New Zealand and their relationship to New World species. **Proceedings of the Entomological Society of Washington**, v.98, p.396-406. 1996.
- PINTO, J.D.; OATMAN, E.R.; PLATNER, G.R. The identity of two closely related and frequently encountered species of New World *Trichogramma* (Hymenoptera: Trichogrammatidae). **Proceedings of the Entomological Society of Washington**, v.85, p.588-593. 1983.
- PINTO, J.D.; KAZMER, D.J.; PLATNER, G.R.; SASSAMAN, C.A. Taxonomy of the *Trichogramma minutum* complex (Hymenoptera: Trichogrammatidae): Allozymic variation and its relationship to reproductive and geographic data. **Annals of the Entomological Society of America**, v.85, p.413-422. 1992.
- PINTO, J.D.; PLATNER, G.R.; KAZMER, D.J. Reproductive and allozymic relationships in the *Trichogramma minutum* complex. **Les Colloques de L'INRA**, n.56, p.111-113. 1991.
- PINTO, J.D.; PLATNER, G.R.; SASSAMAN, C.A. Electrophoretic study of two closely related species of north american *Trichogramma*: *T. pretiosum* and *T. deion* (Hymenoptera: Trichogrammatidae). **Annals of the Entomological Society of America**, v.86, p.702-709, 1993.
- PINTO, J.D.; PLATNER, G.R.; OATMAN, E.R. Clarification of the identity of several common species of North American *Trichogramma* (Hym: Trichogrammatidae). **Annals of the Entomological Society of America**, v.71, p.169-180. 1978.

- PINTO, J.D.; STOUTHAMER, R. Systematics of the Trichogrammatidae with emphasis on *Trichogramma*, In: WAJNBERG, E.; HASSAN, S. A. Eds. **Biological Control with Egg Parasitoids**. Oxon, UK: CAB Internacional, 1994. p.1-36.
- PINTO, J.D.; STOUTHAMER, R.; PLATNER, G.R. A new cryptic species of *Trichogramma* (Hymenoptera: Trichogrammatidae) from the Mojave Desert of California as determined by morphological, reproductive and molecular data. **Proceedings of the Entomological Society of Washington**, v.99, p.238-247, 1997.
- PINTUREAU, B. Systématique évolutive du genre *Trichogramma* Westwood en Europe. Paris, 1987. 31 lp. Thesis (Docteur D'Etat Es-Sciences) - Université Paris VII.
- PINTUREAU, B.; BABAUULT, M. Caractérisation enzymatique de *Trichogramma evanescens* et de *T. maidis* (Hym.: Trichogrammatidae). **Entomophaga**, v.26, p.11-22, 1981.
- PINTUREAU, B.; BABAUULT, M. Comparaison des enzymes chez 10 souches de *Trichogramma* (Hym. Trichogrammatidae), p.31-34. 1982. (**Les Colloques de L'INRA 9**).
- PINTUREAU, B.; BABAUULT, M. Systématique des espèces africaines des genres *Trichogramma* Westwood et *Trichogrammatoidea* Girault (Hym. Trichogrammatidae). p. 97-120. 1988. (**Les Colloques de L'INRA 43**).
- PINTUREAU, B.; CHAPPELLE, L.; DELOBEL, B. Effects of repeated thermic and antibiotic treatments on a *Trichogramma* (Hym., Trichogrammatidae) symbiont. **Journal of Applied Entomology**, v.123, p.473-483. 1999.

PLANTARD, O.; RASPLUS, J.; MONDOR, G.; LE CLAINCHE, I.; SOLIGNAC, M.
Wolbachia-induced thelytoky in the rose gallwasp *Diplolepis spinosissimae*
 (Giraud) (Hymenoptera: Cynipidae), and its consequences on the genetic structure
 of its host. **Proceedings of the Royal Society of London B**, v.265, p.1075-1080.
 1998.

PROMEGA. **pGEM®-T and pGEM®-T easy vector systems**. Technical Manual,
 Madison, USA. 1998. 28p.

QUERINO, R.B.; ZUCCHI, R.A.; CIOCIOLA JR., A.I.; CANETE, C.L.; FOERSTER,
 L.A. Characterization of three species of the genus *Trichogramma*. **Proceedings of
 the XXI International Congress of Entomology**. Foz do Iguaçu-PR, Brazil. 20-26
 of August/2000. (No prelo).

ROUSSET, F.; BOUCHON, D.; PINTUREAU, D. JUCHAULT, P.; SOLIGNAC, M.
Wolbachia endosymbionts responsible for various alterations of sexuality in
 arthropods. **Proceedings of the Royal Society of London Ser. B**, v.250, p.91-98.
 1992.

SAPPAL, N.P.; JENG, R.S.; HUBBES, M.; LIU, F. Restriction fragment length
 polymorphisms in chain reaction amplified ribosomal DNAs of three
Trichogramma (Hymenoptera: Trichogrammatidae) species. **Genome**, v.38, p.419-
 425, 1995.

SCHILTHUIZEN, M.; STOUTHAMER, R. Horizontal transmission of parthenogenesis
 inducing microbes in *Trichogramma* wasps. **Proceedings of The Royal Society of
 London Series B**, v.264, p.361-366. 1997.

- SILVA, I.M.M.S.; VAN KAN, F.J.P.M.; VAN LENTEREN, J.C.; STOUTHAMER, R. Analysis of Portuguese *Trichogramma* spp. (Hym., Trichogrammatidae) using ITS-rDNA and RAPDs p.37-39. 1995. (**Les Colloques de L'INRA 73**).
- SILVA, I.M.M.S. Identification and evaluation of *Trichogramma* parasitoids for biological control. Wageningen, 1999. 151p. Thesis (PhD) - Wageningen Agricultural University.
- SILVA, I.M.M.S.; HONDA, J.; KAN, F. van; HU, J.; NETO, L.; PINTUREAU, B.; STOUTHAMER, R. Molecular differentiation of five *Trichogramma* species occurring in Portugal. **Biological Control**, v.16, p.177-184. 1999.
- SILVA, J.G. Estudos Moleculares. In: MALAVASI, A.; ZUCCHI, R.A. eds., **Moscas-das-Frutas de Importância Econômica no Brasil. Conhecimento Básico e Aplicado**. Ribeirão Preto: Holos, 2000. p.29-39.
- STOUTHAMER, R. The use of sexual versus asexual wasps in biological control. **Entomophaga**, v.38, p.3-6. 1993.
- STOUTHAMER, R.; WERREN, J.H. Microbes associated with parthenogenesis in wasps of the genus *Trichogramma*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.61, p.6-9. 1993.
- STOUTHAMER, R.; BREEUWER, J.A.J.; LUCK, R.F.; WERREN, J.H. Molecular identification of microorganisms associated with thelytoky. **Nature**, v.361, p.66-68. 1993.
- STOUTHAMER, R.; LUCK, R.F. Influence of microbe-associated parthenogenesis on the fecundity of *Trichogramma deion* and *T. pretiosum*. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v. 67, p.183-192. 1993.

STOUTHAMER, R., HU, J, VAN KAN, F.J.P.M.; PLATNER, G.; PINTO, J.D. The utility of internally transcribed spacer 2 DNA sequences of the nuclear ribosomal gene for distinguishing sibling species of *Trichogramma* **BioControl**, v.43, p.421-440, 1999.

STOUTHAMER, R.; BREEUWER, J.A.J.; HURST, D.D. *Wolbachia pipientis*: Microbioal Manipulator of Arthropod Reproduction. **Annual Review of Microbiology**, v.53, p.71-102. 1999a.

UNRUH, T.R.; WOOLLEY, J.B. Molecular methods in classical biological control. In: BELLOWS, T.S.; FISHER, T.W. (Eds.) **Handbook of Biological Control**. London e San Diego: Academic Press, 1999. Cap. 4, p.57-85.

VANLERBERGHE, F. Mitochondrial DNA polymorphism and relevance for *Trichogramma* population genetics. **Les colloques de L'INRA**, n.56, p.123-126. 1991.

VANLERBERGHE-MASUTTI, F. Molecular identification and phylogeny of parasitic wasp species by mitochondrial DNA RFLP and RAPD markers. **Insect Molecular Biology**, v.4, p.229-237. 1994.

VOEGELE, J.J. Reflections upon the last ten years of research concerning *Trichogramma* (Hym., Trichogrammatidae). **Les Colloques de L'INRA**, n.43, p.17-19. 1988.

VOEGELE, J.J.; POINTEL, J.G. Une nouvelle espèce de Trichogramme, *Trichogramma maxacalii* (Hym., Trichogrammatidae). **Annales de la Société Entomologique Francaise**, v.16, p.599-603. 1980.

- VOEGELE, J.J.; PINTUREAU, B. Caractérisation morphologique des groupes et espèces du genre *Trichogramma* Westwood. **Les Colloques de L'INRA**, n.9, p.45-75. 1982.
- VOGLER, A.P.; DESALLE, R. Evolution and phylogenetic information content of the ITS-1 region in the tiger beetle *Cicindela dorsalis*. **Molecular Biology and Evolution**, v.11, p.393-405. 1994.
- WERREN, J.H.; WINDSOR, D.W.; GUO, L.R. Distribution of *Wolbachia* among neotropical arthropods. **Proceedings of the Royal Society of London B**, v.262, p.197-204. 1995.
- WERREN, J.H. Biology of *Wolbachia* **Annual Review of Entomology**, v.42, p.587-609. 1997.
- WHITE, T.J.; BRUNS, T.; LEE, S.; TAYLOR, J. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: **PCR Protocols: a guide to methods and applications**. INNIS, M.A.; GELFAND, D.H.; SNINSKY, J.J. & WHITE, T.J. (Eds.) San Diego, Academic Press. 1990. p.315-322.
- WILLIAMS, J.G.K.; KUBELIK, A.R.; LIVAK, J. RAFALSKI, J.A.; TINGEY, S.V. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. **Nucleic Acids Research**. v.18, p. 6531-6535, 1990.
- YU-LING, O.; XU, P.T.; LI-YING, LI. Studies on the intraespecific variation of *Trichogramma dendrolimi* Matsumura(Hym.:Trichogrammatidae). **Les Colloques de l'INRA**, n.43, p.79-90. 1988.

ZUCCHI, R.A. Taxonomia de espécies de *Trichogramma* (Hym., Trichogrammatidae) associadas a algumas pragas (Lepidoptera) no Brasil. Piracicaba, 1985. 77p. Tese (Livre Docente) - ESALQ/USP.

ZUCCHI, R.A. New species of *Trichogramma* (Hym., Trichogrammatidae) associated with the sugar cane borer *Diatraea saccharalis* (F.) (Lep. Pyralidae) in Brazil. **Les Colloques de l'INRA**, n.43, p.133-140. 1988.

ZUCCHI, R.A.; MONTEIRO, R.C. O gênero *Trichogramma* na América do Sul. In: PARRA, J.R.P.; ZUCCHI, R.A. (Eds.) ***Trichogramma e o Controle Biológico Aplicado***. Piracicaba: FEALQ, 1997. p. 41-46.