

## SYSTEMATICS, MORPHOLOGY AND PHYSIOLOGY

### Dissimilaridade Genética de Linhagens de *Trichogramma* Westwood (Hymenoptera: Trichogrammatidae) Através de Marcadores Moleculares ISSR

REGINA DA S. BORBA<sup>1</sup>, MAURO S. GARCIA<sup>1</sup>, ADALÉCIO KOVALESKI<sup>2</sup>, ANTÔNIO C. OLIVEIRA<sup>3</sup>, PAULO D. ZIMMER<sup>3</sup>, JULIANA S. CASTELO BRANCO<sup>3</sup> E GASPAS MALONE<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Depto. Fitossanidade, <sup>3</sup>Depto. Fitotecnia. UFPel. C. postal 354, 96010-970, Pelotas, RS

<sup>2</sup>Embrapa Uva e Vinho, C. postal 1513, 95200-000, Vacaria, RS

*Neotropical Entomology* 34(4):565-569 (2005)

#### Genetic Dissimilarity of Lines of *Trichogramma* Westwood (Hymenoptera: Trichogrammatidae) through ISSR Markers

**ABSTRACT** - Demands for sustainable agricultural systems have forested the development of biological control techniques, such as the use of the egg parasitoid *Trichogramma* Westwood. However, the arduous identification of the parasitoid at the species level, due to the tiny size and the morphological similarities is an obstacle to increasing its use. Molecular markers are useful to reach the specimen genome and avoid environmental effects that could misguide identification. Several molecular markers techniques are available and the ISSR technique has been used to differentiate close individuals, due to its high polymorphism level, reproducibility and low cost. The objective of this study was to measure the level of genetic differentiation among five lines of *Trichogramma*, using ISSR markers: three belonging to the species *T. pretiosum* Riley, one to *T. atopovirilia* Oatman & Platner and one to *T. bruni* Nagaraja. Morphological identification of the parasitoids was conducted at ESALQ/USP - Piracicaba, SP. After DNA removal and standatization, PCR reactions were performed with 26 ISSR primers; 11 of them were selected because they presented greater polymorphism and consistency. Molecular data were converted into a binary matrix and analyzed (NTSYS v. 2.1). The 11 primers produced 172 polymorphic sections. Genetic similarity ranged from 19% to 96%, showing that the ISSR technique can efficiently identify DNA polymorphism in *Trichogramma*. Results also indicate important inter and intra-specific variations among the parasitoid lines.

**KEY WORDS:** Molecular biology, microhymenopteran, identification, biological control

**RESUMO** - A demanda por processos agrícolas racionais, em detrimento da utilização de estratégias convencionais, tem contribuído para o desenvolvimento de técnicas de controle biológico, como a utilização de parasitóides de ovos do gênero *Trichogramma* Westwood. Um entrave para sua utilização é a dificuldade na identificação das espécies, devido ao diminuto tamanho e à similaridade morfológica. Os marcadores moleculares acessam o genoma, evitando o efeito ambiental e conseqüentemente erros de identificação. Várias técnicas estão disponíveis e a técnica ISSR vem sendo empregada para a diferenciação rápida entre indivíduos próximos, devido ao elevado grau de polimorfismo, reprodutibilidade e baixo custo. Este trabalho objetivou mensurar o nível de diferenciação genética de linhagens de *Trichogramma*, mediante o emprego da técnica de ISSR. Cinco linhagens foram estudadas: três da espécie *T. pretiosum* Riley, uma da espécie *T. atopovirilia* Oatman & Platner e uma da espécie *T. bruni* Nagaraja. A identificação morfológica dos parasitóides foi realizada na ESALQ/USP, Piracicaba, SP. Após a extração do DNA e sua padronização, realizaram-se as reações de PCR utilizando-se 26 marcadores ISSR, dos quais 11 foram selecionados por apresentarem maior polimorfismo e consistência. Os dados moleculares foram transformados em matriz binária e analisados pelo programa estatístico NTSYS v. 2.1. Os 11 marcadores utilizados geraram 172 bandas polimórficas. A similaridade genética variou de 19% a 96%, permitindo concluir que a técnica ISSR é eficiente na identificação de polimorfismo de DNA em *Trichogramma*. Além disso, os resultados sugerem uma variação acentuada inter e intra-específica.

**PALAVRAS-CHAVE:** Biologia molecular, microhimenóptero, identificação, controle biológico

Para se ter sucesso em um programa de controle biológico com *Trichogramma* Westwood é necessário selecionar a espécie e linhagem do parasitóide que controle mais eficientemente a praga, e que melhor se adapte à cultura e às condições climáticas da região onde será utilizado (Hassan 1997). Portanto a correta identificação das espécies de *Trichogramma* é imprescindível.

Devido ao tamanho diminuto e à similaridade morfológica, a identificação das espécies de *Trichogramma* tem sido problemática. Anteriormente, a identificação era realizada pelo estudo da morfologia externa dos adultos com a utilização de caracteres como a coloração, o comprimento e a densidade das cerdas na asa e o comprimento das cerdas na antena para a separação das espécies. Entretanto, esses caracteres variam com o tamanho do corpo e fatores ambientais. Devido à pequena confiabilidade dos caracteres morfológicos, os esforços para a identificação foram concentrados nos aspectos biológicos e reprodutivos (Parra & Zucchi 1997). Em decorrência disso, Nagarkatti & Nagaraja (1971) mostraram a importância da genitália do macho como caráter na identificação específica e um grande avanço ocorreu na identificação das espécies de *Trichogramma*, sendo que no momento são conhecidas aproximadamente 180 espécies (Pinto 1998).

Atualmente, o parasitóide é identificado taxonomicamente em nível de espécie através da morfologia da genitália do macho (Pinto & Stouthamer 1994). No entanto, em alguns casos, a identificação é dificultada pelo tamanho reduzido do indivíduo (0,25 mm) e/ou a presença de espécies crípticas.

A biologia molecular vem sendo bastante utilizada na identificação taxonômica de diversos grupos de insetos. Métodos simples de preservação de espécies de *Dalbulus maidis* (DeLong & Wolcott) (Hemiptera: Cicadellidae) quanto à quantidade e qualidade do DNA, para análise com RAPD, foram testados após períodos sucessivos de armazenamento (Oliveira et al. 2002). O seqüenciamento da região ITS2 (espaço interno transcrito) do rDNA tem sido usado para identificar duas espécies próximas de *Trichogramma*: *T. rojasi* Nagaraja & Nagarkatti e *T. lasallei* Pinto (Ciociola Jr. et al. 2001). A análise da seqüência do rDNA das duas espécies difere em número e posição dos nucleotídeos, mostrando que são distintas. Os resultados mostram que análises moleculares são uma boa alternativa para identificação de espécies crípticas de *Trichogramma*. Desse modo, espécies particularmente de difícil identificação com o emprego das técnicas taxonômicas tradicionais podem ter suas identidades esclarecidas mediante o emprego de técnicas moleculares do seqüenciamento ou do polimorfismo do comprimento de seqüências gerado através das técnicas de marcadores moleculares.

Dentre as técnicas de marcadores moleculares com grande potencial para a identificação de espécies de insetos, a técnica de ISSR ("Inter simple sequence repeat amplification") (Zietkiewicz et al. 1994) se destaca devido ao elevado grau de polimorfismo, reprodutibilidade e baixo custo (Salimath et al. 1995).

Os dados moleculares representam valiosa fonte de caracteres alternativos para a taxonomia de *Trichogramma*.

Tal recurso é necessário para testar os conceitos de "parentesco", que atualmente fundamentam-se bastante nos limitados dados morfológicos. As características moleculares também são potencialmente valiosas para a distinção de fêmeas, pois até agora todas as identificações são baseadas nos machos, e formas telítocas. Outra vantagem da identificação molecular é a identificação de variantes intra-específicas, os quais são geralmente indistinguíveis morfológicamente, mas potencialmente importantes para o controle biológico (Pinto 1997, 1998).

O objetivo deste trabalho foi mensurar o nível de diferenciação genética de linhagens de *Trichogramma* através da análise do DNA, mediante o emprego da técnica de ISSR.

## Material e Métodos

O trabalho foi realizado no Centro de Genômica e Fitomelhoramento do Departamento de Fitotecnia e no Laboratório de Biologia de Insetos do Departamento de Fitossanidade da Faculdade de Agronomia "Eliseu Maciel" (FAEM) da Universidade Federal de Pelotas (UFPel), no ano de 2002.

**Coleção de *Trichogramma*.** Foram estudadas cinco linhagens: três da espécie *T. pretiosum* Riley, uma da espécie *T. atopovirilia* Oatman & Platner, e uma da espécie *T. bruni* Nagaraja. As linhagens de *T. pretiosum* foram coletadas em pomares de macieira nos municípios de Vacaria, RS e Bento Gonçalves, RS; a espécie *T. atopovirilia* foi fornecida pela Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa), Petrolina, PE; e a espécie *T. bruni* foi coletada em ovos de *Heliconius phyllis* (Fabricius) em Piracicaba, SP.

As linhagens estudadas foram identificadas através de caracteres morfológicos, na ESALQ, Piracicaba, SP, e passaram a fazer parte da criação do Laboratório de Biologia de Insetos, DFs, FAEM, UFPel, RS.

**Extração de DNA.** Para a extração do DNA genômico foi utilizado o protocolo descrito por Olerup & Zetterquist (1994), com algumas modificações. Para cada uma das cinco linhagens foram realizadas duas extrações independentes. Utilizou-se em torno de 100 indivíduos (machos e fêmeas) de cada linhagem por extração. Ao invés de as amostras serem maceradas em nitrogênio líquido, estas foram maceradas diretamente em 500 µl de tampão de extração (Tris HCl 10 mM pH 8,0; NaCl 100 mM; EDTA 10 mM pH 8,0; SDS 0,5%) adicionado de proteinase K (20 µg/ml). Posteriormente as amostras foram incubadas por 2h a 37°C e centrifugadas por seis min. a 14000 g, a temperatura ambiente. Em seguida adicionou-se 260 µl de TE, 240 µl de NaCl 5M; procedeu-se nova centrifugação por 15 min. a 14000 g e transferiu-se o sobrenadante para novo tubo, adicionando em torno de 1000 µl de etanol absoluto, o que equivale a duas vezes a quantidade de sobrenadante, seguido de nova centrifugação por 15 min. a 14000 g, lavagem com 200 µl de etanol 70% gelado e centrifugado por cinco min. a 14000 g. O DNA foi ressuscitado em 50 µl de TE pH 8,0.

A quantificação do DNA total foi realizada por

eletroforese com gel de agarose 0,8% corado com brometo de etídeo (Sambrook *et al.* 1989), através da comparação com bandas de concentração conhecida.

**Análise de ISSR.** Foram testados 26 marcadores de um set de 100 marcadores obtidos da University of British Columbia, dos quais, 11 apresentaram bandas consistentes (UBC 815, 825, 835, 840, 841, 842, 845, 850, 855, 860 e 880).

As reações foram realizadas conforme protocolo descrito a seguir: 625  $\mu$ M de cada dNTP; 2,5  $\mu$ M marcadores; 0,5 unidade de *Taq* polimerase; 1,5 mM  $MgCl_2$ ; 50 mM KCl; 10 mM Tris-HCl pH 9,0; 0,1  $\mu$ lml<sup>-1</sup> de gelatina e 0,1  $\mu$ lml<sup>-1</sup> de Triton X-100, no volume final de 20  $\mu$ l. As reações de amplificação foram realizadas em um aparelho de PCR PTC – 100, com uma fase inicial de desnaturação a 94°C por 90 segundos, seguida de 40 ciclos a 94°C por 30 segundos, 45°C por 45 segundos e 72°C por 90 segundos. O último passo constituiu uma fase de extensão final a 72°C por cinco min. Os fragmentos amplificados foram separados por eletroforese em poliácridamida 7%, em cuba de seqüenciamento manual Modelo Hoesche, por tempo aproximado de 2h, e à potência elétrica constante de 60W. O gel foi corado com nitrato de prata a 0,2%, conforme protocolo de revelação de Briard *et al.* (2000).

**Análise Estatística.** Através da avaliação do perfil de bandas, obteve-se a matriz binária atribuindo-se 1 para

presença e 0 para ausência da banda. A análise dos dados foi realizada através do Programa NTSYS pc 2.1 (Rohlf 2000), que utiliza o método UPGMA (Unweighted Pairwise Group Method using Arithmetic Average). Com isso obteve-se a matriz de similaridade e o coeficiente da distância genética média (Nei & Li 1979), possibilitando a construção do cladograma.

## Resultados e Discussão

Dos 11 marcadores utilizados no trabalho (815, 825, 835, 840, 841, 842, 845, 850, 855, 860 e 880), foi gerado o total de 172 bandas. Os números mínimo e máximo de bandas observadas foram 8 (marcador 815, 850 e 880) e 31 (marcador 835), respectivamente, com uma média de 16 bandas por marcador. Esse resultado caracteriza elevada capacidade na detecção de polimorfismo através dessa técnica. O mesmo ocorreu em outros trabalhos: com sorgo (Yang *et al.* 1996, Oliveira *et al.* 1996) e *Eleusine* (Salimath *et al.* 1995).

O grau de consistência da técnica foi medido através da análise de duas amostras independentes de cada linhagem. Todos os locos analisados estavam presentes nas duas extrações independentes (Fig. 1), caracterizando o elevado grau de consistência da técnica de ISSR no estudo do polimorfismo de DNA em gêneros *Trichogramma*. Resultados semelhantes foram obtidos por Yang *et al.* (1996) em sorgo.

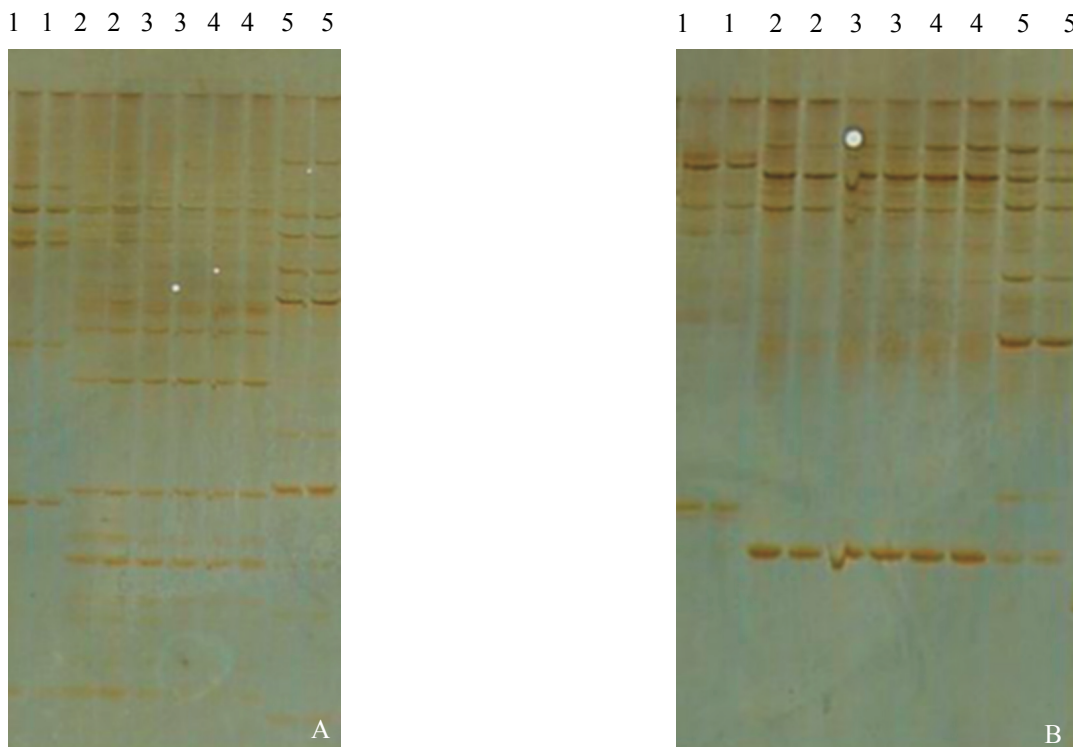


Figura 1. Eletroforese em gel de poliácridamida 7% do produto da amplificação do DNA extraído de maneira independente de diferentes espécies do gênero *Trichogramma*, utilizando-se os marcadores UBC 835 (A) e UBC 845 (B). Colunas 1 (*T. pretiosum* - Vacaria, RS); 2 (*T. pretiosum* - Vacaria, RS); 3 (*T. pretiosum* - Bento Gonçalves, RS); 4 (*T. atopovirilia* - ESALQ, Piracicaba, SP); 5 (*T. bruni* - ESALQ, Piracicaba, SP).

Dentre as cinco linhagens de *Trichogramma* analisadas, aproximadamente 96% das bandas foram polimórficas, caracterizando elevado grau de polimorfismo na população estudada e sugerindo que as dificuldades enfrentadas na identificação das espécies baseada em critérios morfológicos decorrem da alta diversidade genética das populações.

Através da Matriz de Similaridade Genética (Fig. 2), construiu-se o cladograma, mostrando que as linhagens 2 e 3 de *T. pretiosum* são as mais próximas geneticamente, com 96% de similaridade; a espécie *T. atopovirilia* (número 4) apresentou, aproximadamente, 93% de similaridade em relação às duas anteriores. A linhagem 1 de *T. pretiosum* demonstrou ter 50% de similaridade genética em relação às linhagens 2, 3 e 4. A espécie mais distante geneticamente, dentre todas analisadas, foi *T. bruni* (número 5), com apenas 19% de similaridade genética em relação às outras linhagens (Fig. 3).

LINHAGENS	1	2	3	4	5
1	1				
2	0,51	1			
3	0,50	0,96	1		
4	0,51	0,95	0,93	1	
5	0,23	0,19	0,17	0,17	1

Figura 2. Matriz de similaridade genética baseada em locos ISSR. Cada número representa uma linhagem do gênero *Trichogramma*. 1. *T. pretiosum* (Vacaria, RS); 2. *T. pretiosum* (Vacaria, RS); 3. *T. pretiosum* (Bento Gonçalves, RS); 4. *T. atopovirilia* (ESALQ, Piracicaba, SP); 5. *T. bruni* (ESALQ, Piracicaba, SP).

A distância genética média (67,57%) foi utilizada como ponto de corte para a formação dos grupos. Três grupos foram formados, um deles incluindo os genótipos 2, 3 e 4, e outros dois contendo os genótipos 1 e 5, respectivamente.

Os resultados encontrados conflitam com o esperado pois posicionam uma das linhagens de *T. pretiosum* mais distante das outras duas. Uma possível explicação é que a linhagem 1 é mais variável geneticamente, sendo detectada maior variação dentro da espécie *T. pretiosum* do que entre *T. pretiosum* e *T. atopovirilia*. Essa hipótese deve ser testada com maior número de amostras das linhagens estudadas. Entretanto, a ocorrência de erro na identificação das espécies e/ou contaminação em laboratório, não podem ser descartadas, por haver espécies e/ou linhagens muito agressivas, ou por estas se adaptarem mais facilmente ao hospedeiro *Anagasta kuehniella* (Zeller), podem vir a invadir os tubos de criação de outra espécie durante o manuseio, misturando-se a esta e “dominando” a população existente no laboratório (Botelho 1997, Zucchi & Monteiro 1997).

A espécie *T. bruni* foi a mais distante das demais estudadas sugerindo que a pressão de seleção ou hábito de parasitismo esteja diferindo nesta espécie. Estudos caracterizando o comportamento de parasitismo da espécie e comparando com as demais, sugerem que *T. bruni* não é tão eficiente em parasitar a lagarta enroladeira da maçã, *Bonagota cranaodes* (Meyrick), quando comparada com as outras quatro linhagens (dados não publicados). A diferença no comportamento de parasitismo desse hospedeiro específico é consistente com as diferenças encontradas em nível molecular.

Pode-se concluir que a técnica ISSR é eficiente na identificação de polimorfismo de DNA em indivíduos do gênero *Trichogramma*, permitindo minimizar o tempo gasto com sua identificação, bem como facilitar o processo, o que vai contribuir, em muito, na utilização desse importante parasitóide de ovos em programas de controle biológico de pragas.

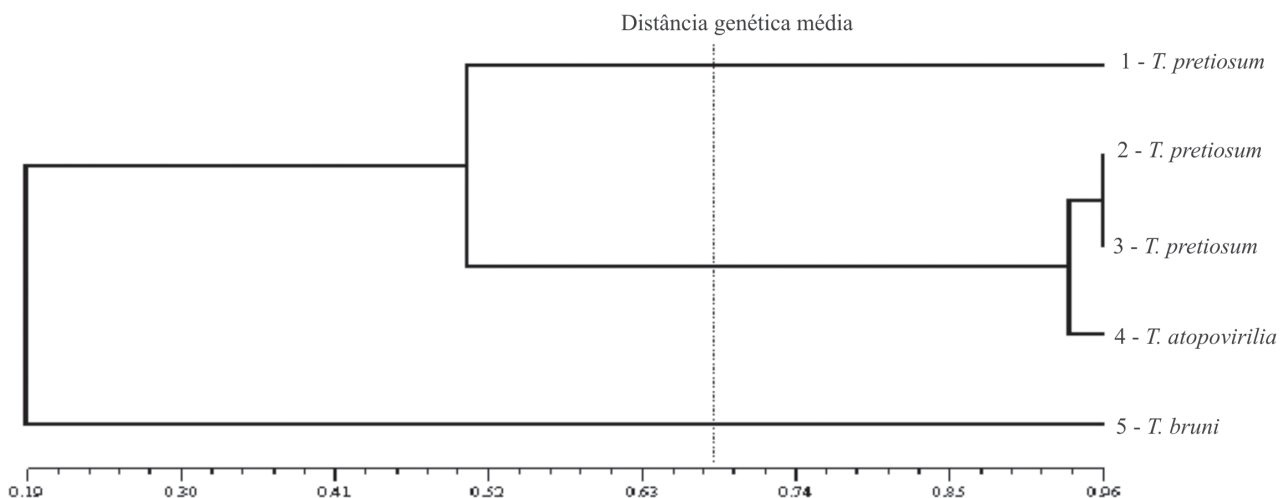


Figura 3. Cladograma de linhagens do gênero *Trichogramma* realizado pelo método UPGMA baseado em dados de ISSR. 1. *T. pretiosum* (Vacaria, RS); 2. *T. pretiosum* (Vacaria, RS); 3. *T. pretiosum* (Bento Gonçalves, RS); 4. *T. atopovirilia* (ESALQ, Piracicaba, SP); 5. *T. bruni* (ESALQ, Piracicaba, SP).

## Literatura Citada

- Botelho, P.S.M. 1997.** Eficiência de *Trichogramma* em campo, p303-318. In J.R.P. Parra & R.A. Zucchi (eds.), *Trichogramma e o controle biológico aplicado*. cap. 11, Piracicaba, FEALQ, 324p.
- Briard, M., V.L.E. Clera, D. Gnzebelus, D. Senalik & P.W. Simon. 2000.** Modified protocols for rapid carrot genomic DNA extraction and AFLP™ analysis using silver stain on radioisotopes. *Plant Mol. Bio.* 18: 235-241.
- Ciociola Jr., A.I., R.A. Zucchi & R. Stouthamer. 2001.** Molecular key to seven Brazilian species of *Trichogramma* (Hymenoptera: *Trichogrammatidae*) using sequences of the ITS2 region and restriction analysis. *Neotrop. Entomol.* 30: 259-262.
- Hassan, S.A. 1997.** Seleção de espécies de *Trichogramma* para o uso em programas de controle biológico, p183-206. In J.R.P. Parra & R.A. Zucchi (eds.), *Trichogramma e o controle biológico aplicado*. cap. 11, Piracicaba, FEALQ, 324p.
- Nagarkatti, S. & H. Nagaraja. 1971.** Redescriptions of some known species of *Trichogramma* (Hymenoptera: *Trichogrammatidae*) showing the importance of the male genitalia as a diagnostic character. *Bull. Entomol. Res.* 61: 13-31.
- Nei, M. & W.H. Li. 1979.** Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*. 76: 5269-5273.
- Olerup, O. & H. Zetterquist. 1994.** HLA-DR typing by PCR amplification with sequence specific primer (PCR-SSP) in 2 hours: An alternative to serological DR typing in clinical practice including donor-recipient matching in cadaveric transplantation. *Tissue Antigens.* 39: 225-235.
- Oliveira, A.C. de, T. Richter & J.L. Bennetzen. 1996.** Regional and racial specificities in sorghum germplasm assessed with DNA markers. *Genome* 39: 579-587.
- Oliveira, C.M., M.F.P. Fungaro, L.E.A. Camargo & J.R.S. Lopes. 2002.** Análise comparativa da estabilidade do DNA de *Dalbulus maidis* (DeLong & Wolcott) (Hemiptera: Cicadellidae) sob diferentes métodos de preservação para uso em RAPD-PCR. *Neotrop. Entomol.* 31: 225-231.
- Parra, J.R.P. & R.A. Zucchi. 1997.** *Trichogramma e o Controle biológico aplicado*. Piracicaba, FEALQ, 324p.
- Pinto, J.D. 1997.** Taxonomia de *Trichogrammatidae* (Hymenoptera) com ênfase nos gêneros que parasitam Lepidoptera. In J.R.P. Parra & R.A. Zucchi (eds.), *Trichogramma e o controle biológico aplicado*. cap. 11, Piracicaba, FEALQ, 324.
- Pinto, J.D. 1998.** Systematics of the north american species of *Trichogramma* Westwood (Hymenoptera: *Trichogrammatidae*). Washington, Entomological Society of Washington, 287p. (Memoirs, 22).
- Pinto, J.D. & R. Stouthamer. 1994.** Systematics of the *Trichogrammatidae* with emphasis on *Trichogramma*, p. 1-36. In E. Wajnberg & S.A. Hassan (eds.). *Biological control with egg parasitoids*. Wallingford, CAB International, IOBC. cap. 1, 286p.
- Rohlf, J.F. 2000.** NTSYS – pc: Numerical taxonomy and multivariate analysis system. Version 2.1 Exeter Software. Setauket. NY.
- Salimath, S.S., A.C. de Oliveira, I.D. Godwin & J.L. Bennetzen. 1995.** Assessment of genome origins and genetic diversity in the genus *Eleusine* with DNA markers. *Genome* 38: 757-763.
- Sambrook, J., E.F. Fritsch & T. Maniatis. 1989.** Molecular cloning: A laboratory manual. New York, Cold Spring Lab. 9: 16-23.
- Yang, W., A.C. de Oliveira, I. Godwin, K. Schertz & J.L. Bennetzen. 1996.** Comparison of DNA marker technologies in characterizing plant genome diversity: Variability in chinese sorghums. *Crop Sci.* 36: 1669-1676.
- Zietkiewicz, E., A. Rafalski & D. Labuda. 1994.** Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR) – anchored polymerase chain reaction amplification. *Genomics* 20: 176-183.
- Zucchi, R.A. & R.C. Monteiro. 1997.** O gênero *Trichogramma* na América do Sul, p 41-66. In J.R.P. Parra & R.A. Zucchi (eds.), *Trichogramma e o controle biológico aplicado*. cap. 2, Piracicaba, FEALQ, 324p.

Received 22/XI/04. Accepted 01/III/05.