

Procurando o inimigo da broca da cana-de-açúcar, como identificar a espécie *Trichogramma galloi* por meio de análise da região do espaçador ITS2 do rDNA e análises de restrição

Lorena Santos Magalhães¹, Adriano Gonçalves Martins, Sergio Vicente de Azevedo

¹ lorena.s.magalhaesx@gmail.com

Palavras Chave: ITS2, Análise de restrição, Chave de identificação

Introdução

A cana-de-açúcar é uma cultura de grande importância econômica no agronegócio brasileiro, especialmente na produção de álcool e açúcar (BENETT, 2011). Um dos desafios relacionados à sua produtividade é o combate à praga *Diatraea saccharalis* (broca da cana-de-açúcar), cujo pericínio não ocorre diante a ação do controle químico, causando o sintoma “coração morto” (CRUZ, 2005). As vespas do gênero *Trichogramma* atuam na eliminação de seus ovos, sendo a *T. galloi* a mais especializada. O projeto visa realizar a correta identificação, através da região do espaçador ITS2 do rDNA e análises de restrição, confeccionando uma chave de identificação para os espécimes.

Objetivos

Diferenciar as microvespas parasitoides da espécie de *T. galloi* utilizando a região do espaçador ITS2 do rDNA e análise de restrição.

Materiais e Métodos

O projeto está sendo desenvolvido nos laboratórios do Instituto Federal de São Paulo, Câmpus Barretos. Os espécimes utilizados nesse estudo são *Trichogramma galloi*, *Trichogramma pretiosum* e *Trichogramma atapovirilia* fornecidos pela empresa Biocontrol de Sertãozinho-SP. Inicialmente foi feita uma busca no banco de dados GenBank das sequências de nucleotídeos disponível para as três espécies. As sequências foram utilizadas para identificação das regiões para os primers ITS2 e busca de sítios de restrição com a ferramenta NEBcutter v2.0. Foram realizadas extrações do DNA das espécies *T. galloi*, *T. atapovirilia* e *T. pretiosum* a partir do protocolo “Blood-Animal-Plant Dna Preparation Kit”- Cellco[®]. O DNA obtido foi utilizado para

realização de PCR seguindo protocolo “Hot Start Taq Pol Master Mix (2x)” -Cellco[®]. Os produtos de PCR (Figura 1) foram digeridos com as enzimas de restrição previamente selecionadas e estes foram utilizados em eletroforese em gel de agarose 1,2% corado pelo “Safedye Nucleid Acid Stain” (Figuras 2, 3 e 4)

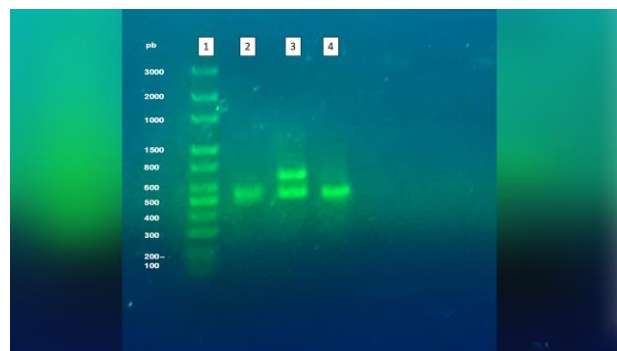


Figura 1 – Gel de agarose 1,2% mostrando os produtos da PCR, juntamente com as regiões flangeadoras do gênero *Trichogramma*. A coluna 1 representa o marcador molecular; coluna 2: espécie *T. galloi*; coluna 3: *T. atapovirilia*; coluna 4: espécie *T. pretiosum*

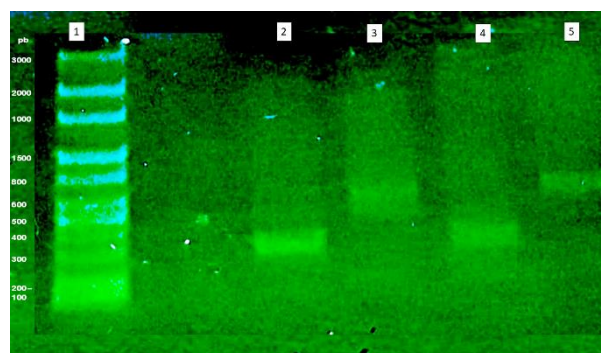


Figura 2 – Gel de agarose 1,2% apresentando a digestão enzimática da espécie *T. galloi* com as enzimas de restrição. Coluna 1: Marcador

molecular; coluna 2: Eco RI; coluna3: Nru; coluna 4: Mlu; coluna 5: Sst I.

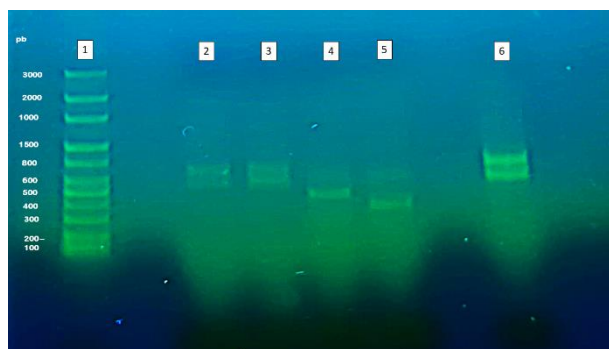


Figura 3 – Gel de agarose 1,2% apresentando a digestão enzimática da espécie *T. atopovirilia* com as enzimas de restrição. Coluna 1: Marcador molecular; coluna 2: Eco RI; coluna3: Nru; coluna 4: Mlu; coluna 5: Pvu I; coluna 6: Sst I.

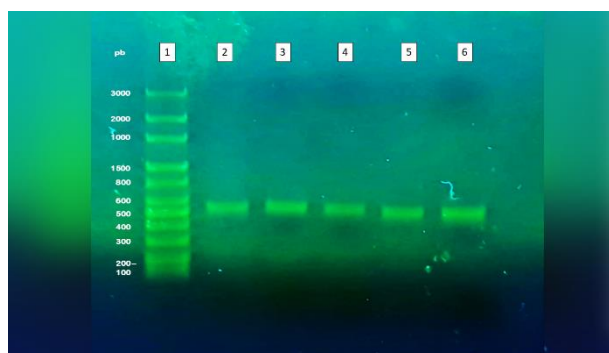


Figura 4 – Gel de agarose 1,2% apresentando a digestão enzimática da espécie *T. prestiosum* com as enzimas de restrição. Coluna 1: Marcador molecular; coluna 2: Eco RI; coluna3: Nru; coluna 4: Mlu; coluna 5: Pvu I; coluna 6: Sst I.

Resultados e Discussão

O resultado da Análise *in silico* com as enzimas de restrição demonstrou padrões de cortes diferentes, permitindo a identificação de um conjunto de enzimas de restrições passíveis de serem utilizadas na construção da chave de identificação. Tendo a sequência da região do *internal transcribed spacer (ITS-2)* do *T. galloi* cortada pelas enzimas de digestão: NruI (TCGCGA), EcoRI (AATTC, PvuI (CGATCG) e Mlu-I (ACGCGT). Já a espécie *T. prestiosum* obteve corte apenas com a enzima PvuI (CGATCG). E as enzimas eficazes para *T. atopovirilia* foram: Sac-I (GAGCTC) e Mlu-I (ACGCGT).

Utilizado a técnica de extração através do protocolo “Blood-Animal-Plant Dna Preparation Kit”, obteve-se DNA suficiente para a clonagem e leitura por meio do gel de agarose 1,2%, cujos comprimentos dos sequenciamentos variaram entre 515 a 610 pb.

A partir de uma reação com gradiente de temperatura, foi verificado que para os primers utilizados a melhor temperatura de anelamento é 55°C assim como melhor eficiência diante a solução obtida pelo primer R1. Nesta etapa, já foi possível diferenciar a espécie *T. atopovirilia*, pois houve a presença de duas bandas no gel de agarose 1,2%, enquanto os outros espécimes apresentaram apenas uma banda. A repetição deste padrão de corte foi observada em novas extrações de DNA.

Os resultados obtidos até o momento nos deixam otimistas em relação a viabilidade de confecção de uma chave molecular eficiente e precisa (CIOCIOLA JR. *et al.*, 2001). Assim como desempenhará a confirmação das espécies cedidas pela empresa Biocontrol, através do sequenciamento (Tabela 1).

Identificação das espécies do gênero <i>Trichogramma</i> através das enzimas de restrição	
Clivagem com enzimas	Espécie
EcoRI e MluI	<i>T. galloi</i>
Sst	<i>T. atopovirilia</i>
Nenhuma	<i>T. prestiosum</i>

Tabela 1 – Representa a chave de identificação esquematizada. Apresentando a identificação das espécies a partir da clivagem de enzimas de restrição específicas.

Conclusões

É possível diferenciar entre as três espécies do mesmo gênero por meio de ferramentas moleculares utilizando primers para a região ITS2 do rDNA.

É possível construir chave de identificação para as três espécies de *Trichogramma* estudadas.

Agradecimentos

- Ao Dr. Sérgio Vicente de Azevedo, professor do IFSP e Diretor Geral do Polo de Inovação em

Matão, unidade EMBRAPPII do IFSP, por toda a paciência, apoio, compreensão e ensinamentos transmitidos;

- Ao Adriano Gonçalves Martins, professor e técnico de laboratório no IFSP, por toda ajuda e incentivo na execução deste trabalho;

- À Karen Shimoizama, pelo auxílio e contribuição no desenvolvimento do projeto.

- Ao Dr. Henrique Silveira, pela cooperação e apoio durante o decorrer da pesquisa

- Ao IFSP de pela oportunidade de realizar o curso, pela disposição dos laboratórios e equipamentos necessários para a execução deste projeto;

- Ao PIBIFP, programa institucional de bolsas de iniciação científica e tecnológica do IFSP, pelo auxílio financeiro e pelo aceite na realização desta pesquisa;

- Ao Hospital do Amor, instituição de saúde filantrópica, pelo apoio e auxílio durante o desenvolvimento do projeto;

- À minha família, por todo apoio, amor, compreensão e incentivo.

CRUZ, I. **A Broca da Cana-de-Açúcar, *Diatraea saccharalis*, em milho, no Brasil.** Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 2007. 12 p.

Bibliografia

BENETT, C. G. S.; BUZETTI, S.; SILVA, K. S.; TEIXEIRA FILHO, M. C. M.; GARCIA, C. M. de P.; MAESTRELO, P. R. Produtividade e desenvolvimento da canaplanta e soca em função de doses e fontes de manganês . **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.35, p.1661-1668, 2011.

CIOCIOLA JR, AMÉRICO I.; ZUCCHI, R. A., STOUTHAMER, R. **Molecular key to seven Brazilian species of *Trichogramma* (Hymenoptera: Trichogrammatidae) using sequences of the ITS2 region and restriction analysis.** *Neotrop. Entomol.* [online], vol.30, n.2, 2001, pp.259-262.