

RELAÇÕES FILOGENÉTICAS ENTRE ESPÉCIES BRASILEIRAS DE *Trichogramma* sp. COM BASE NAS SEQUÊNCIAS DAS REGIÕES INTERGÊNICAS ITS-2

Luiz Henrique Martins Dorigo¹, Marcos de Lucca Júnior².

^{1,2}Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de São Paulo – Câmpus Barretos.

luiz_dorigo@outlook.com

Palavras-chave: *Trichogramma*, Evolução Molecular, ITS-2, Análise Filogenética

Introdução

O gênero *Trichogramma* (Hymenoptera) compreende um conjunto de espécies que têm sido amplamente utilizadas no controle biológico de diversos tipos de culturas (Querino; Zucchi, 2012). Apresentam tamanho reduzido e, por isso, são de difícil identificação morfológica, realizada por meio de análise da genitália do macho em microscopia (Ciociola, 2000). Desse modo, outras formas de identificação, com base em dados moleculares têm sido desenvolvidas nos últimos anos (Ciociola, 2000). Nesse contexto, com o presente trabalho pretende-se estudar as relações filogenéticas para esse conjunto de espécies com base em dados da sequência da região ITS-2 do DNA ribossômico.

Objetivos

Ampliar o conhecimento sobre as relações filogenéticas de *Trichogramma* sp. a partir de dados moleculares da sequência ITS-2 do DNA ribossômico.

Material e Métodos

O projeto foi desenvolvido no laboratório de biologia molecular da Unidade Agrícola do Instituto Federal de São Paulo, Câmpus Barretos, sendo que o material biológico foi fornecido pela empresa Biocontrol, acondicionados em álcool 100% e armazenados a 10°C para conservação.

Foram realizadas extrações do DNA das espécies *T. galloi*, *T. atopovirilia* 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[®].

Foi realizado uma busca no banco de dados GenBank das sequências de nucleotídeos da região ITS-2 do rDNA disponíveis para as espécies de *Trichogramma* sp. que são encontradas no Brasil (Quadro 1), para então realizar o alinhamento múltiplo das sequências e a determinação das relações filogenéticas.

O alinhamento múltiplo das sequências foi realizado pelo programa CLUSTAL W (Thompson *et al.*, 1994). A determinação das relações filogenéticas entre as sequências ITS2 das espécies de *Trichogramma* foi realizada utilizando-se o software MEGA versão 11 em plataforma Windows. Análises filogenéticas das sequências ITS2 foram obtidas pelo método neighbor-joining (Saitou; Nei, 1987) presente no programa MEGA 11. Para a determinação dos limites de confiança nos “nós”, os dados foram submetidos ao teste de bootstrap (Felsenstein, 1985) para 1000 repetições.

Espécies	Estados	Acesso Genbank
<i>T. acacioi</i>	ES, SP, PR	AF282235.1
<i>T. atopovirilia</i>	PE, MG, SP, PR	AY182759.1 AY182758.1
<i>T. bruni</i>	SP, PR, RS	AF282238.1
<i>T. exiguum</i>	ES	AF408670.1 AF408669.1 AY182769.1 AY182768.1
<i>T. galloi</i>	RJ, SP	AF282236.1 AY182764.1
<i>T. lasallei</i>	PR	AF282237.1 AY182762.1
<i>T. manicobai</i>	MG, SP, PR	MK226148.1
<i>T. marandobai</i>	MG	KP972055.1 KP972054.1
<i>T. pretiosum</i>	AM, PE, CE, PB, DF, ES, RJ, GO, MG,	FN568059.1 AF082822.1 AF082820.1 AF282234.1

	MS, MT, PR, RS, SC, SP	JF306651.1
<i>T. rojasi</i>	PR	AF282239.1

Quadro 1 – Distribuição geográfica de *Trichogramma* no Brasil e número de acesso no GenBank.

Resultados e Discussão

A técnica de extração de DNA das três espécies de *Trichogramma*, seguindo as suas etapas no laboratório até a realização de PCR foi bem-sucedida, sendo que, a partir de uma reação com gradiente de temperatura, foi possível observar que a melhor temperatura de anelamento para os primers utilizados é 55°C, onde o primer R2 mostrou melhor eficiência em relação ao primer R1.

Os resultados obtidos com as análises filogenéticas das sequências ITS-2 possibilitaram a criação de três árvores que mostram não somente as possíveis relações filogenéticas entre as espécies *T. galloi*, *T. atopovirilia* e *T. pretiosum* (Figura 1), mas também as relações destas 3 espécies com outras que habitam o país (Figuras 2 e 3).

Os resultados obtidos na Figura 1 são semelhantes aos resultados obtidos por outros pesquisadores (Almeida, 2004; Ciociola Junior *et al.*, 2001; Santos *et al.*, 2015), corroborando o resultado. Além disso, os dendrogramas obtidos nas Figuras 2 e 3, em relação a posição das espécies *T. pretiosum* e *T. manicobai* são semelhantes ao resultado obtido por Silva (2023), que obteve uma árvore filogenética baseada em um fragmento do gene mitocondrial *citocromo c oxidase subunidade I* (COI). Contudo, houve uma diferença posicional entre as análises filogenéticas em relação as espécies *T. atopovirilia*, *T. galloi* e *T. rojasi*.

Por fim, através dos resultados adquiridos pelas análises filogenéticas, foi possível constatar que os resultados das relações filogenéticas batem com a distribuição geográfica das espécies. Por exemplo, tanto na Figura 2 quanto na Figura 3, as espécies *T. acacioi*, *T. bruni*, *T. rojasi*, *T. atopovirilia* e *T. lasallei* estão próximas filogeneticamente, e todas são encontradas no estado do Paraná. Esta relação é mantida com as outras espécies.

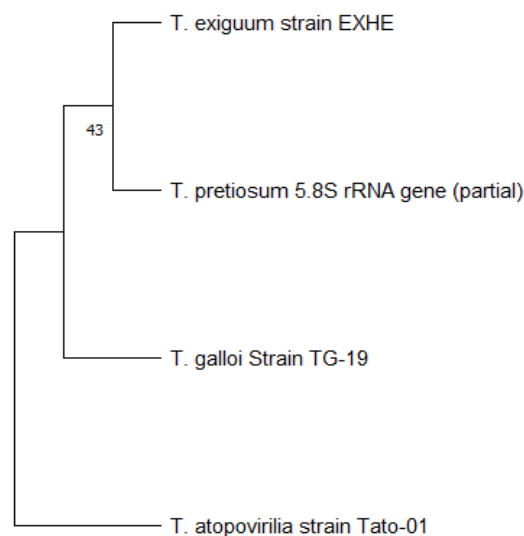


Figura 1 – Dendrograma baseado na análise de sequências ITS-2 de quatro espécies de *Trichogramma* usando o método neighbor-joining.

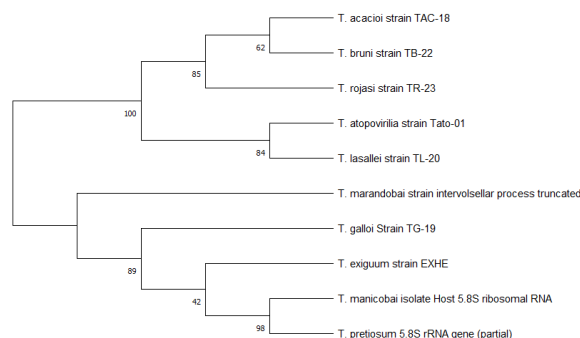


Figura 2 – Dendrograma baseado na análise de sequências ITS-2 de dez espécies de *Trichogramma* usando o método neighbor-joining.

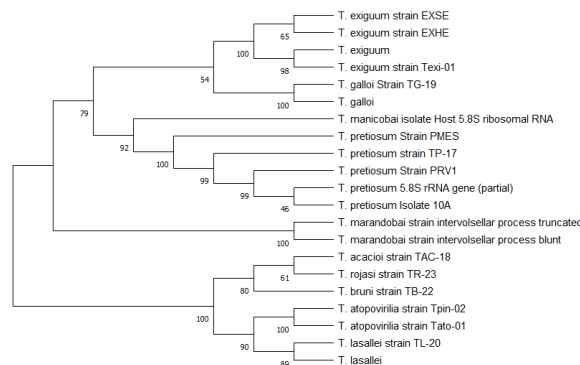


Figura 3 – Dendrograma baseado na análise de diferentes sequências ITS-2 de dez espécies de *Trichogramma* usando o método neighbor-joining.

Trichogramma usando o método neighbor-joining.

Conclusões

Através das sequências de nucleotídeos ITS-2 disponíveis no banco de dados GenBank e de suas análises filogenéticas pelo método neighbor-joining, é possível determinar as relações filogenéticas entre as espécies de *Trichogramma*, sendo que esses resultados estão de acordo com outros dados previamente obtidos na literatura. Além disso, as relações filogenéticas estabelecidas neste projeto estão de acordo com a distribuição geográfica das espécies.

Agradecimentos

- Agradecemos ao IFSP pela oportunidade da realização do presente estudo;
- Ao corpo técnico pelo auxílio constante na realização do trabalho;
- Ao Prof. Dr. Sérgio Vicente de Azevedo por conceder o material biológico utilizado neste estudo;
- À Coordenação de Pesquisa do Campus IFSP-Barretos;
- À Pró-Reitoria de Pesquisa, pela concessão da Bolsa de Iniciação Científica.

Referências Bibliográficas

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

CIOCIOLA Jr, A. I.; ZUCCHI, R. A., STOUTHAMER, R. Molecular key to seven brazilian species of *Trichogramma* (Hymenoptera: Trichogrammatidae) using sequences of the ITS2 region and restriction analysis. **Neotropical Entomology**, vol. 30, no. 2, p. 259-262, junho, 2001. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S1519-566X2001000200008>. Acesso em: 02 de out. de 2023.

CIOCIOLA Jr, A. I. **Identificação de espécies de *Trichogramma* (Hymenoptera: Trichogrammatidae) utilizando o sequenciamento da região ITS2 do rDNA.**

Piracicaba, 2000. 60p. Tese (Doutorado em Entomologia). Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz. Universidade Federal de São Paulo.

FELSENSTEIN, J. Phylogenies and the comparative method. **The American Naturalist**, vol. 125, no. 1, p. 1–15, janeiro, 1985. Disponível em: <http://www.jstor.org/stable/2461605>. Acesso em: 02 de out. de 2023.

SAITOU, N.; NEI, M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. **Molecular Biology and Evolution**, vol. 4, no. 4, p. 406–425, julho, 1987. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a040454>. Acesso em: 02 de out. de 2023.

QUERINO, R. B.; ZUCCHI, R. A. **Guia de identificação de *Trichogramma* para o Brasil**. 2. ed. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica; Teresina: Embrapa Meio-Norte, 2012. 103p.

SANTOS, NR. *et al.* Molecular identification of *Trichogramma* species from regions in Brazil using the sequencing of the ITS2 region of ribosomal DNA. **Brazilian Journal of Biology**, vol. 75, no. 2, p. 391-395, maio, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/1519-6984.14813>. Acesso em: 02 de out. de 2023.

SILVA, Maria Gabriela Castro da. **DNA Barcoding de espécies de *Trichogramma* (Hymenoptera: Trichogrammatidae) associados a lepidópteros-praga e filogeografia de *T. pretiosum* no Brasil**. 2023. Dissertação (Mestrado em Entomologia) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2023.

THOMPSON, J. D.; HIGGINS, D. G.; GIBSON, T. J. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. **Nucleic Acids Research**, vol. 22, no. 22, p. 4673–4680, novembro, 1994. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/nar/22.22.4673>. Acesso em: 02 de out. de 2023.