

**Universidade Federal do Piauí**

**Diversidade genética e identificação molecular de espécies de  
*Trichogramma* Westwood (Hymenoptera, Trichogrammatidae) por  
meio de marcadores ribossomais ITS2**

**Jéssica Barbara Vieira Viana**

Dissertação apresentada à Universidade Federal do Piauí como parte das exigências do Programa de Pós-graduação em Genética e Melhoramento para obtenção do título de “Mestre”.

**Teresina  
2017**

**Jéssica Barbara Vieira Viana**  
**Bacharel em Ciências Biológicas**

**Diversidade genética e identificação molecular de espécies de *Trichogramma*  
Westwood (Hymenoptera, *Trichogrammatidae*) por meio de marcadores  
ribossomais ITS2**

**Orientador:**

**Dr. Paulo Sarmanho da Costa Lima**

**Coorientadora:**

**Dra. Ranyse Barbosa Querino da Silva**

**Dissertação apresentada à Universidade  
Federal do Piauí como parte das  
exigências do Programa de Pós-  
graduação em Genética e Melhoramento  
para obtenção do título de “Mestre”.**

**Teresina**  
**2017**

**Diversidade genética e identificação molecular de espécies de *Trichogramma* Westwood (Hymenoptera, *Trichogrammatidae*) por meio de marcadores ribossomais ITS2**

**Jéssica Barbara Vieira Viana**

Aprovada em: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

**Comissão julgadora:**

---

**Dra. Carolina Rodrigues de Araujo – Embrapa Meio-Norte**

---

**Dr. Leonardo Castelo Branco Carvalho- UFPI**

---

**Dra. Ranyse Barbosa Querino da Silva – Embrapa Meio-Norte  
(Coorientadora)**

---

**Dr. Paulo Sarmanho da Costa Lima – Embrapa Meio-Norte  
(Orientador)**

*A minha mãe Regina e a minha  
irmã Rafaela por tanto amor e  
carinho.*

*Ofereço*

## **AGRADECIMENTOS**

À Deus, por sempre me dá forças nos momentos mais difíceis ao longo dessa jornada e por colocar em meu caminho pessoas especiais e essenciais ao meu crescimento pessoal e profissional;

À CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) pela concessão da bolsa de estudos;

Ao INCT (Instituto Nacional de Ciências e Tecnologia de Hymenoptera Parasitoides) e CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) pelo apoio financeiro do projeto executado;

À Embrapa Meio-Norte pela oportunidade de estágio desde a graduação, e pela disponibilidade para execução do trabalho;

Ao laboratorista da Embrapa, Leonardo Furtado, pela ajuda e ensinamentos técnicos e teóricos;

Aos colegas de laboratório, Jarbson, Rayane, Geice, Aline, Suzana, Gizele e Jailson, pelos momentos de distrações e por toda ajuda;

Aos meus pais, Francisco e Regina, pelo suporte moral. Em especial, a minha mãe, meu porto seguro, exemplo de garra e humildade. Obrigada por todo apoio e educação. A minha irmã Rafaela, exemplo de caráter, pelos conselhos e momentos de distrações;

À minha coorientadora Dra. Ranyse Barbosa Querino da Silva, pela oportunidade e pelos momentos de ensinamentos, embora tenham sido poucos, mas foram de grande aprendizado;

Ao meu orientador Dr. Paulo Sarmanho da Costa Lima, minha referência de profissionalismo. Obrigada pela excelente orientação, por todo o suporte, pelos ensinamentos práticos e teóricos, não só da biologia molecular, mas também da vida. Obrigada por ser um exemplo de pessoa correta e profissional exigente, sem perder o senso de humor;

As Profas. Dras. Ângela Celis de Almeida Lopes e Regina Lucia Ferreira Gomes, por acolher bem todos os alunos, por tornarem o ambiente da pós-graduação familiar, sempre nos incentivando a buscar o melhor pessoal e profissional;

Aos meus amigos da pós-graduação, por compartilhar momentos difíceis e alegres durante esses dois anos. À Eliene por sua maturidade e simplicidade, obrigada pelos conselhos. À Eugênia por sua sensibilidade, obrigada por ser tão delicada, gentil e por

me fazer lembrar que a essência de criança deve permanecer viva dentro de nós. À Raquel, obrigada pela amizade, discrição e toda sua ajuda. À Maria Fernanda pelo exemplo de determinação, força e coragem. À Marilha, pelo exemplo de simplicidade e risos diários. À Yeda, pelo exemplo de paciência e cautela. Ao Pedro pela amizade e os momentos de distrações. Aos agregados da turma, José Eduardo e Max, pela ajuda, amizade e alegria que tanto nos proporcionou ao longo desses anos.

À Artemisa, por ser um exemplo de delicadeza e gentileza, obrigada por ser tão doce e meiga.

As minhas amigas de longa data, Francinara e Karol, por sempre acreditarem em mim. Obrigada pelo apoio, incentivo, pelas conversas, por representarem algo grandioso na minha vida.

Finalmente, agradeço a todos que contribuíram direta ou indiretamente para execução deste trabalho e meu crescimento pessoal e profissional.

## SUMÁRIO

<b>RESUMO</b> .....	<b>VII</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>VIII</b>
<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	<b>IX</b>
<b>LISTA DE TABELAS</b> .....	<b>X</b>
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>11</b>
<b>2. REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	<b>13</b>
2.1 Gênero <i>Trichogramma</i> (Hymenoptera: Trichogrammatidae) .....	<b>13</b>
2.2 Controle biológico de pragas com espécies de <i>Trichogramma</i> .....	<b>14</b>
2.3 Estudos moleculares (uso das sequências ITS1 e ITS2) em populações de <i>Trichogramma</i> .....	<b>15</b>
2.4 Identificação de espécies de <i>Trichogramma</i> .....	<b>16</b>
2.5 Diversidade genética.....	<b>18</b>
<b>3 MATERIAL E MÉTODO</b> .....	<b>20</b>
3.1 Obtenção das amostras da espécie <i>Trichogramma</i> .....	<b>20</b>
3.2 Extração do DNA .....	<b>20</b>
3.3 Quantificação do DNA.....	<b>20</b>
3.4 Reação em Cadeia da Polimerase – PCR.....	<b>21</b>
3.5 Resoluções e visualizações dos fragmentos amplificados .....	<b>21</b>
3.6 Purificação dos produtos de PCR .....	<b>22</b>
3.7 Sequenciamento .....	<b>22</b>
3.7.1 PCR para o sequenciamento da região ITS2 do DNA ribossomal .....	<b>22</b>
3.7.2 Precipitação da PCR para o sequenciamento da região ITS2 do DNA ribossomal .....	<b>22</b>
3.8 Busca por similaridade no banco de dados GenBank .....	<b>23</b>
3.9 Alinhamento múltiplo das sequências .....	<b>23</b>
3.10 Análise de agrupamento .....	<b>23</b>
<b>4 RESULTADOS</b> .....	<b>24</b>
4.1 Extração do DNA .....	<b>24</b>
4.2 Reação em Cadeia da Polimerase – PCR.....	<b>24</b>
4.3 Purificação dos produtos de PCR .....	<b>25</b>
4.4 Busca por similaridade no banco de dados GenBank .....	<b>26</b>
4.5 Alinhamento múltiplo das sequências .....	<b>27</b>
4.6 Matriz de distância genética .....	<b>28</b>

4.7 Análise de agrupamento .....	30
<b>5 DISCUSSÃO.....</b>	<b>32</b>
<b>6 CONCLUSÕES.....</b>	<b>36</b>
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>37</b>
<b>ANEXO .....</b>	<b>42</b>



## RESUMO

VIANA, J. B. V. **Diversidade genética e identificação molecular de espécies de *Trichogramma* Westwood (Hymenoptera, Trichogrammatidae) por meio de marcadores ribossomais ITS2.** Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento), UFPI, Teresina, 2017.

As espécies do gênero *Trichogramma* são parasitoides de ovos de pragas associados a ordem Lepidoptera, utilizados em programas de controle biológico. O sucesso no mesmo depende de algumas etapas como a correta identificação das espécies e caracterização da diversidade genética das populações destes parasitoides. Desta forma, este estudo objetivou identificar espécies e avaliar a diversidade genética entre diversos acessos de espécime do gênero *Trichogramma* obtidos a partir de diferentes regiões e hospedeiros distintos, por meio de marcadores moleculares da região ITS2 do DNA ribossomal. Foram obtidas 21 amostras de *Trichogramma* de diferentes regiões do Brasil, e previamente identificadas com base nos caracteres da genitália, antenas e asas dos machos. Foi realizado sequenciamento da região ITS2 destas amostras. As sequências obtidas foram submetidas à busca por similaridade no GenBank, por meio do programa BLAST, as espécies foram identificadas a partir da porcentagem de semelhanças entre as sequências de ITS2 do DNA ribossomal depositadas no banco de dados. As identificações moleculares de todos os acessos corresponderam as identificações previamente realizadas a partir dos caracteres morfológicos. A análise de agrupamento foi realizada por meio do método de máxima verossimilhança, o dendrograma foi montado por meio do método aglomerativo Neighbor Joining. A análise do dendrograma permitiu a identificação de quatro grupos, em que as espécies *T. marandobai* e *T. manicobai* encontraram-se bem próximas estando em um único grupo, acessos de uma mesma espécie foram agrupados em grupos distintos, bem como acessos de uma mesma espécie de hospedeiros distintos e diferentes localidades foram agrupados no mesmo grupo. Este estudo demonstra a necessidade de estudos com a espécie *T. manicobai*, uma vez que até então não há registros de sequências da mesma no banco de dados. Além disso, demonstra a semelhança genética existente entre as espécies *T. manicobai* e *T. marandobai*, bem como variações genéticas existentes na região ITS2 da espécie *T. pretiosum*, tendo em vista que estas variações não estão relacionadas aos respectivos hospedeiros.

**Palavras-chave:** Parasitoides, controle biológico, similaridade genética, ITS2

## ABSTRACT

VIANA, J. B. V. **Genetic diversity and molecular identification of species of *Trichogramma* Westwood (Hymenoptera, Trichogrammatidae) through ribosomal markers ITS2. Dissertation (Masters in Genetics and Improvement), UFPI, Teresina, 2017.**

The species of the genus *Trichogramma* are parasitoids of pest eggs associated with the order Lepidoptera, used in biological control programs. The success depends on some steps such as the correct identification of the species and the characterization of the genetic diversity of the populations of these parasitoids. In this way, this study aimed to identify species and to evaluate the genetic diversity between several accessions of the *Trichogramma* specimen obtained from different regions and distinct hosts, through molecular markers of the ITS2 region of the ribosomal DNA. Twenty - one *Trichogramma* samples from different regions of Brazil were obtained and previously identified based on genitalia, antennae and male wings. Sequencing of the ITS2 region of these samples was performed. The obtained sequences were submitted to the search for similarity in GenBank, through the BLAST program, the species were identified from the percentage of similarities between the ITS2 sequences of the ribosomal DNA deposited in the database. The molecular identifications of all accesses corresponded to the identifications previously made from the morphological characters. The cluster analysis was performed using the maximum likelihood method, the dendrogram was assembled using the Neighbor Joining agglomerative method. The analysis of the dendrogram allowed the identification of four groups, in which the species *T. marandobai* and *T. manicobai* were very close to being in a single group, accessions of the same species were grouped in distinct groups, as well as accesses of the same Species and different locations were grouped in the same group. This study demonstrates the need for studies with the *T. manicobai* species, since until then there are no records of the same sequences in the database. In addition, it demonstrates the genetic similarity between the species *T. manicobai* and *T. marandobai*, as well as genetic variations existing in the ITS2 region of the *T. pretiosum* species, considering that these variations are not related to the respective hosts.

**Key words:** Parasitoids, biological control, genetic similarity, ITS2

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Em A e B, geis de agarose a 1,5% com produtos de PCR da região ITS2 do DNA ribossomal de acessos de espécies de *Trichogramma*. Os números representam os acessos de espécies de *Trichogramma*; M: marcador de peso molecular 100 pb; CN: controle negativo.....25

Figura 2 – Dendrograma de acessos representantes das espécies *T. pretiosum*, *T. galloi*, *T. marandobai* e *T. manicobai* obtido a partir das análises das sequências de nucleotídeos da região ITS2 do DNA ribossomal de acessos referentes as espécies a partir do método Neighbor Joining. ....31

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Espécies de <i>Trichogramma</i> com seus respectivos códigos de identificação, plantas, insetos hospedeiros e suas origens. ....	20
Tabela 2. Primers utilizados na PCR e suas respectivas sequências.....	21
Tabela 3. Componentes e volumes utilizados na PCR.....	21
Tabela 4. Quantificação e pureza das amostras de espécies de <i>Trichogramma</i> .....	24
Tabela 5. Quantificação e pureza dos produtos de PCR purificados de espécies de <i>Trichogramma</i> .....	26
Tabela 6. Identificação de espécies de <i>Trichogramma</i> a partir de alinhamento com sequências depositadas no banco de dados GenBank – NCBI.....	27
Tabela 7. Matriz de distância genética da região ITS2 do DNA ribossomal para as espécies <i>Trichogramma pretiosum</i> , <i>T. galloi</i> , <i>T. marandobai</i> e <i>T. manicobai</i> utilizando o método de máxima verossimilhança composta. ....	29
Tabela 8. Matriz de distância genética da região ITS2 do DNA ribossomal para acessos das espécies <i>Trichogramma pretiosum</i> , <i>T. galloi</i> , <i>T. marandobai</i> e <i>T. manicobai</i> utilizando o método de máxima verossimilhança composta. ....	30

## 1. INTRODUÇÃO

Entre os diversos gêneros da família Trichogrammatidae (Hymenoptera) *Trichogramma* Westwood, 1833 é considerado o maior deles (PINTO, 1999). O mesmo apresenta cerca de 210 espécies registradas no mundo, na América do Sul há ocorrência de 41 espécies nativas, das quais 26 espécies são encontradas no Brasil, sendo considerado o país com maior número de registros (PINTO, 2006). As espécies desse gênero são microhimenópteros parasitoides de ovos associados à ordem Lepidoptera, frequentemente utilizados no controle biológico de pragas.

No entanto, o sucesso nos programas de controle biológico que utilizam espécies de *Trichogramma* depende da correta identificação das mesmas. Inicialmente, estas identificações de espécie de *Trichogramma* eram baseadas na morfologia externa dos adultos, com a descoberta da genitália do macho houve um grande avanço na taxonomia de *Trichogramma*, uma vez que muitos esclarecimentos em relação a identificação das espécies foram feitos a partir da mesma.

Apesar da considerável aplicação prática de *Trichogramma*, estudos com organismo deste gênero apresentam alguns problemas decorrentes da sua complexa taxonomia. O tamanho diminuto, ocorrência de variação intra-específica e a presença de espécies crípticas dificultam a identificação das espécies.

Somado à correta identificação das espécies, é válido ressaltar a importância da caracterização da diversidade genética das populações de parasitoides e os fatores que mantêm esta diversidade, como aspectos que levam ao sucesso nos programas de controle biológico de pragas.

Tendo em vista que é crucial obter o conhecimento da diversidade local para conservar um reservatório de parasitoides nativos, já que não se pode prever quais espécies se tornarão pragas no futuro. Ainda que, os parasitoides possuem a capacidade de mudar de hospedeiro, passando de um nativo para um introduzido com resultados notáveis (LA SALLE; GAULD, 1993).

Além disso, variações intraespecíficas podem surgir com as modificações ambientais, conseqüentemente alterar o papel dos parasitoides na regulação das populações de outros insetos, por meio natural ou pelo controle biológico de pragas.

Isso implica que há necessidade do avanço no conhecimento da taxonomia de grupos de interesse econômico, bem como o estudo da diversidade genética dos mesmos.

A biologia molecular dispõe de diferentes métodos envolvendo análises de proteínas, RNA ou DNA em diversos estudos genéticos. Os marcadores moleculares constituem uma grande ferramenta para estudos de genética de populações, taxonomia e biologia da conservação, além de permitir análises de diversidade e variação genética das populações naturais.

Estudos sobre variações intraespecíficas e diferenciação de espécies entre diversos grupos de organismos e em insetos tem sido realizados por meio do sequenciamento das regiões do DNA ribossomal do espaço transcrito interno (ITS1 e ITS2), além disso, essa ferramenta da biologia molecular também proporciona a reconstrução filogenética das relações entre espécies estritamente relacionadas e diferenciação de populações (ALMEIDA, 2004; SAMARA et al., 2008).

Diante do exposto, este estudo teve como objetivo a identificação molecular e análise de diversidade genética entre diversos acessos de espécimes do gênero *Trichogramma* Westwood, 1833 obtidos a partir de diferentes regiões, plantas e hospedeiros distintos, por meio de marcadores moleculares da região do DNA ribossomal do espaço transcrito interno ITS2.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1. Gênero *Trichogramma* (Hymenoptera: Trichogrammatidae)

*Trichogramma* Westwood, 1833 é o maior gênero de *Trichogrammatidae* (Hymenoptera), uma vez que apresenta cerca de 210 espécies registradas em todo o mundo (PINTO, 2006). As espécies de *Trichogramma* ocorrem nas seis regiões biogeográfica do mundo: Paleártica, Oriental, Neártica, Neotropical, Anfrotropical e Australásia, sendo algumas espécies relativamente comuns em diferentes regiões (PINTO; STOUTHAMER, 1994).

As espécies de *Trichogramma* estão amplamente distribuídas na América do Sul, com ocorrência de aproximadamente 1/5 das espécies registradas no mundo. Destas espécies 26 são registradas no Brasil (QUERINO et al., 2010).

Estes organismos são microhimenópteros parasitoides de ovos habitualmente associados à ordem Lepidoptera, com comprimento variando de 0,2 a 1,5mm (QUERINO; ZUCCHI, 2003; PINTO; STOUTHAMER, 1994). Algumas espécies de *Trichogramma* apresentam um grupo restrito de hospedeiros, oligófagos, outros são polífagos, os quais possuem uma ampla faixa de hospedeiros relacionados à diversas ordens como Hemiptera, Lepidoptera, Coleoptera, Hymenoptera e Neuroptera (PINTO, 1997; QUERINO et al., 2010).

A reprodução em espécies de *Trichogramma* pode ser por arrenotoquia ou telítóquia. O modo arrenotoquia é o mais comum em *Trichogramma*, como nos Hymenoptera em geral, o mesmo consiste em ovos fertilizados que produzem fêmeas diploides e ovos não-fertilizados produzem machos haploides. O segundo modo, menos comum, é chamado partenogênese completa, no qual ovos fertilizados e não-fertilizados produzem fêmeas diploides. O modo de reprodução telítóquia em *Trichogramma* pode ser reversível (associada à infecção microbiana) e não reversível (STOUTHAMER et al., 1990). Em algumas espécies desse gênero, a telítóquia pode ser causada por proteobactérias do gênero *Wolbachia*, a mesma induz partenogênese em mais de 10 espécies de *Trichogramma* (STOUTHAMER, 1993; PINTO; STOUTHAMER, 1994).

Embora o modo de reprodução arrenotoquia seja o mais comum em espécies de *Trichogramma*, Stouthamer (1993) afirma que em programas de controle biológico as populações telítocas apresentam várias vantagens em relação às populações

arrenótocas: crescimento mais rápido da população, redução dos custos de produção (pois não há produção de machos) maior eficiência reprodutiva, baixa densidade do hospedeiro e entre outras.

O ciclo biológico das espécies de *Trichogramma* compreende as fases de ovo, larva, pré-pupa e pupa. Na fase de pupa, com o desenvolvimento do parasitoide, o ovo parasitado torna-se escuro em virtude da esclerotização da cutícula, sendo uma característica marcante de parasitismo por espécies de *Trichogramma* (CONSOLI et al., 1999).

A duração do ciclo biológico em espécies de *Trichogramma* é muito variável, depende principalmente da temperatura. O desenvolvimento de ovo até adulto pode ter uma duração aproximada de 10 a 12 dias, independente do hospedeiro (CONSOLI; PARRA, 1996; PRATISSOLI; PARRA, 2000).

O número de ovos colocados pelo parasitoide é proporcional ao volume do ovo do hospedeiro, uma vez que o mesmo é associado à quantidade de nutrientes, fornecendo assim ao parasitoide uma medida aproximada da quantidade de nutrientes contida no seu interior, os quais decrescem com a idade, sendo o tamanho do ovo um fator importante na seleção do hospedeiro (VINSON, 1997; GOMES, 1997).

## **2.2. Controle biológico de pragas com espécies de *Trichogramma***

Os himenópteros parasitoides possuem grande importância biológica, ecológica e econômica apresentando uma alta biodiversidade (LASALLE; GAULD, 1993). A importância econômica de Trichogrammatidae está quase inteiramente relacionada ao gênero *Trichogramma*, o qual constitui espécies de grande importância no controle biológico, uma vez que são consideradas parasitoides de ovo de lepidópteros-pragas em diversos sistemas agrícolas impedindo que a praga atinja a fase de lagarta, estágio em que causa danos às culturas (BOTELHO, 1997; QUERINO, 2010).

Liberações de *Trichogramma* têm sido realizadas para controle de pragas em uma grande diversidade de culturas, incluindo culturas economicamente importantes como, soja, milho, tomateiro, cana-de-açúcar, entre outras (PARRA; ZUCCHI, 2004; WANG et al., 2014).



No Brasil, a utilização de espécies de *Trichogramma* para o controle de pragas em sistemas agrícolas tem apresentado um crescimento constante devido ao incremento na disponibilização destes parasitoides por parte de laboratórios especializados, assim como por sua maior aceitação. Em 2012, as espécies *T. galloi* e *T. pretiosum* foram liberadas em cerca de 548 mil hectares, sendo cerca de 515 mil hectares correspondentes ao uso na cultura da cana-de-açúcar, utilizando-se *T. galloi* para o controle de *Diatrea saccharalis* (FIGUEROSA, 2015).

*Trichogramma pretiosum* foi liberado em cerca de 20 mil hectares correspondentes à cultura do milho, para o controle de *Spodoptera frugiperda* e *Diatrea saccharalis*. Além disso, *T. pretiosum* também foi empregado em cerca de três mil hectares de cultivo de tomate para o controle de *Tuta absoluta* e *Neoleucinodes elegantalis* Guenée e em aproximadamente 10 mil hectares de lavouras de soja para o controle de ovos de noctúdeos desfoliadores (PARRA, 2010; VASCONCELOS, 2012).

### **2.3. Estudos moleculares (uso das sequências ITS1 e ITS2) em populações de *Trichogramma***

O sequenciamento das regiões do DNA ribossomal do espaço transcrito interno (ITS1 e ITS2) tem sido empregado em estudos intraespecíficos assim como na diferenciação de espécies de diversos grupos de organismos, inclusive insetos. Além disso, o sequenciamento dessas regiões também tem sido utilizado na reconstrução filogenética das relações entre espécies estritamente relacionadas e na diferenciação de populações (ALMEIDA, 2004; SAMARA et al., 2008).

Essas regiões do DNA ribossomal apresentam-se como uma ferramenta importante para o trabalho taxonômico, uma vez que tais regiões têm sido amplamente conservadas ao longo da evolução (ORREGO; AGUDELO-SILVA 1993, HOY 2003, PINTO et al. 1997).

Estes marcadores moleculares são considerados adequados para distinguir espécies de *Trichogramma* que apresentam uma variação intraespecífica, além disso, é possível realizar análises filogenéticas a partir destes, tornando-se um forte candidato para estabelecer a sistemática do gênero em estudo (STOUTHAMER et al., 1999).

A primeira aplicação da região ribossomal ITS2 para identificação de espécies de *Trichogramma* determinou uma sequência de várias coleções de dois complexos de espécies norte americanas intimamente relacionadas, determinados por complexo *Trichogramma deion* e *Trichogramma pretiosum* composto por suas respectivas espécies (STOUTHAMER et al., 1999).

Ciociola Jr. et al. (2001) utilizaram a região ITS2 como ferramenta molecular para identificação de espécies estritamente relacionadas de *Trichogramma* afirmando ser possível identificar espécies de *Trichogramma* do Brasil, apresentando suas vantagens quando comparada à técnica de RAPD, pois a mesma apresenta seus iniciadores já conhecidos para o gênero.

Nasir et al. (2013) afirmam que o marcador ITS2 é um excelente método para identificar espécies de *Trichogramma*, em que as espécies (*T. evanescens*, *T. euproctidis* e *T. chilotraeae*), que eram difíceis de distinguir morfológicamente, foram facilmente identificadas a partir de suas diferenças nas sequências da região ITS2.

Santos et al. (2015) ao identificar espécies de *Trichogramma* de diferentes regiões do Brasil utilizando sequenciamento da região ITS2 do DNA ribossomal concluiu que esta técnica é relativamente simples para correta identificação de espécies do gênero, além de apresentar alta eficiência ao alinhar as sequências obtidas a partir do sequenciamento com aquelas armazenadas em um banco de dados, traçando assim um perfil de similaridade genética entre as espécies em estudo.

#### **2.4. Identificação de espécies de *Trichogramma***

A complexidade taxonômica desse gênero é um problema enfrentado nos estudos destes organismos (QUERINO; ZUCCHI, 2003). Inicialmente realizava-se a identificação das espécies de *Trichogramma* por meio da morfologia externa dos adultos, pela observação da coloração do inseto, pelo comprimento do corpo, pela densidade das cerdas nas asas e pelo comprimento das cerdas nas antenas. Entretanto, os esforços para identificação das espécies eram concentrados nos aspectos biológicos e reprodutivos, uma vez que estes caracteres morfológicos apresentam uma baixa confiabilidade, pois variam com o tamanho do corpo e com os fatores ambientais (BORBA et al., 2005).

O avanço na taxonomia de *Trichogramma* surgiu no momento em que Nagarkatti e Nagaraja (1977) mostraram a importância da genitália do macho como

caráter na identificação específica destas espécies. Contudo, em alguns casos a identificação torna-se dificultada devido à ausência de machos em espécies telítocas infectadas por bactérias do gênero *Wolbachia*, pela presença de espécies crípticas e pelo tamanho diminuto do indivíduo (ALMEIDA; STOUTHAMER, 2003; BORBA et al., 2005).

Além disso, tem sido relatado a existência de variações intraespecíficas em diversas espécies de *Trichogramma*, mostrando que os caracteres podem ser variáveis. Foi observada significativa plasticidade em cinco espécies de *Trichogramma* (*Trichogramma browningi* Pinto e Oatman, 1985; *Trichogramma deion* Pinto e Oatman, 1986; *Trichogramma fuentesi*, *Trichogramma platneri* Nagarkatti, 1975 e *Trichogramma pretiosum*), no entanto, os caracteres da genitália do macho, pareciam ser resistentes à plasticidade ecofenotípica (PINTO et al., 1989).

Querino (2002) ao analisar a espécie *T. pretiosum* provenientes de 10 hospedeiros, observaram mudanças na forma da cápsula genital. Nesse caso, fatores genéticos associados aos fatores do hospedeiro como valor nutricional ou tamanho do ovo, podem estar intimamente relacionados com as alterações encontradas nessa estrutura. Em estudos com a espécie *Trichogramma bruni* foi possível observar a ocorrência desse fato na variação da cápsula genital, em que a influência do habitat do hospedeiro, além da variação individual geraram deformação na cápsula genital (QUERINO; ZUCCHI, 2002).

Os marcadores moleculares constituem uma boa alternativa para identificação de espécies de *Trichogramma* (OLIVEIRA et al., 2002). As primeiras técnicas moleculares utilizadas para identificação de espécies de *Trichogramma* foram por meio de isoenzimas (PINTUREAU; BABAULT, 1988). Posteriormente, foi demonstrada a utilidade de outras técnicas moleculares na identificação de espécies de *Trichogramma*, sendo elas RAPD, FRLP, microssatélites e inclusive sequenciamento das regiões ribossomais ITS1 e ITS2 (ORREGO; AGDELO SILVA, 1993; SILVA et al., 1995; PINTO et al., 1997; STOUTHAMER et al., 1999).

Almeida (2004) ao analisar a sequência de regiões ribossomais de espécies de *Trichogramma* do Brasil, relatou que as análises moleculares são alternativas para identificação de espécies crípticas de *Trichogramma*.

As ferramentas moleculares apresentam importante alternativa para a taxonomia de *Trichogramma*. Uma vez que, são potencialmente valiosas para identificação das fêmeas de *Trichogramma*, pois todas as identificações são baseadas nos machos. Além disso, o uso de dados moleculares permite a identificação de variações intraespecíficas, que são geralmente indistinguíveis morfologicamente, mas potencialmente úteis para o controle biológico (PINTO 1999).

## 2.5. Diversidade Genética

A diversidade genética dos organismos é caracterizada pela variedade de genótipos que determinadas populações ou espécies podem apresentar, o que possibilita adaptações das mesmas às constantes mudanças ambientais. Essa variação pode ocorrer entre indivíduos da mesma espécie, intraespecífica, ou entre espécies, sendo fixada dentro de cada táxon (FRANKHAM et al., 2004).

Indivíduos de uma mesma espécie, podem apresentar sequências variantes de DNA, denominadas haplótipos. Além disso, os processos de mutação e/ou recombinação podem resultar em polimorfismos genéticos. Mutações são caracterizadas por alterações no material genético, as quais podem afetar apenas a sequência ou também a organização, regulação ou função de um gene (HOY, 2003).

A recombinação pode ocorrer na reprodução sexuada e na formação de gametas, resultando em variações no material genético de uma espécie. Na reprodução sexuada é possível unir gametas com conteúdo genético distintos, o que resulta na formação de uma prole geneticamente diferente dos parentais. Já na formação dos gametas essa recombinação pode se dar de duas maneiras, a primeira por meio da segregação independente dos cromossomos não homólogos e a outra ocorre pela recombinação dos cromossomos homólogos (JANSSEENS, 1909).

Existem ainda vários segmentos de DNA que podem se mover de uma região à outra no cromossomo, denominados elementos transponíveis (TE), muitas vezes estes elementos carregam consigo genes próximos. No geral estão presentes em múltiplas cópias e correspondem à grande parte do DNA repetitivo dos insetos, podendo alterar as sequências do DNA de diferentes formas (FUTUYMA, 2005; PALOMEQUE; LORITE, 2008).

Os himenópteros correspondem a um dos maiores e mais diversos grupos de insetos. Contudo, ao comparar as espécies dessa ordem com outros insetos tem se

observado baixa variabilidade genética nos mesmos (BERKELHAMER, 1983; GRAUR, 1985; PACKER; OWEN, 2001).

O controle genético está intimamente associado à algumas mudanças observadas em populações de insetos criados em laboratório, uma vez que o mesmo resulta em efeitos de seleção em genótipos existentes e perda ao acaso de genótipos devido à deriva genética. No entanto, quando se criam em laboratórios espécies silvestres de inimigos naturais, pode-se esperar mudanças genéticas devido ao processo de domesticação das mesmas (BARTLETT, 1985).

A baixa variabilidade genética pode ser consequência da colonização de inimigos naturais em laboratório, em que há um favorecimento na produção de indivíduos homozigóticos em relação às populações do campo, e em muitos casos esses indivíduos possuem caracteres indesejáveis. Entretanto, uma alternativa que pode minimizar esse problema de endogamia e consequentemente manter uma variação genética considerável é a obtenção de grandes populações desses indivíduos (BARTLETT, 1984).

Atualmente o polimorfismo pode ser detectado por várias técnicas disponíveis que empregam uma estratégia particular, como DNA mitocondrial (DNA mt), Polimorfismo do DNA Amplificado Randomicamente (RAPD), Isoenzimas, Polimorfismo do Comprimento de Fragmentos de Restrição (RFLP), genes de RNA ribossomal (RNAr), Polimorfismo do comprimento de Fragmento Amplificado (AFLP) e Sequenciamento, possibilitando um rápido acúmulo de informações sobre a estrutura de genomas eucariotos e a técnica de Microsatélite (MARTINS, 2006; FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998).

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Obtenção das amostras de espécies de *Trichogramma*

Foram obtidas 21 amostras de *Trichogramma* de três regiões do Brasil (Tabela 1), e previamente identificadas com base nos caracteres da genitália, antenas e asas dos machos, sendo utilizada a chave ilustrada de *Trichogramma* do Brasil (QUERINO; ZUCCHI, 2005; QUERINO; ZUCCHI, 2011).

Tabela 1. Espécies de *Trichogramma* com seus respectivos códigos de identificação, plantas, insetos hospedeiros e suas origens.

Espécie de <i>Trichogramma</i>	Amostras	Inseto hospedeiro	Plantas	Origem
<i>T. pretiosum</i>	T.pret01	<i>Heraclides thoas</i>	Pimenta	Teresina - PI
<i>T. pretiosum</i>	T.pret02	<i>Heraclides thoas</i>	Pimenta	Teresina - PI
<i>T. pretiosum</i>	T.pret03	<i>Heraclides thoas</i>	Pimenta	Teresina - PI
<i>T. pretiosum</i>	T.pret04	<i>Agraulis vanillae</i>	Maracujá	Teresina - PI
<i>T. pretiosum</i>	T.pret05	<i>Agraulis vanillae</i>	Maracujá	Teresina - PI
<i>T. pretiosum</i>	T.pret06	<i>Agraulis vanillae</i>	Maracujá	Teresina - PI
<i>T. pretiosum</i>	T.pret07	<i>Agraulis vanillae</i>	Maracujá	Teresina - PI
<i>Trichogramma</i> sp.	T.sp01	<i>Chrysodeixis includens</i>	Feijão-caupi	São João - PI
<i>T. pretiosum</i>	T.pret08	Sphingidae	Tomate	Teresina - PI
<i>T. pretiosum</i>	T.pret09	<i>Alabama argillacea</i>	Algodão	Teresina - PI
<i>Trichogramma</i> sp.	T.sp02	<i>Alabama argillacea</i>	Algodão	Teresina - PI
<i>T. pretiosum</i>	T.pret10	<i>Alabama argillacea</i>	Algodão	Teresina - PI
<i>T. pretiosum</i>	T.pret11	<i>Spodoptera frugiperda</i>	Algodão	Teresina - PI
<i>T. marandobai</i>	T.mar01	<i>Erinnyis ello</i>	Mandioca	Rio Largo - AL
<i>T. marandobai</i>	T.mar02	<i>Erinnyis ello</i>	Mandioca	Rio Largo - AL
<i>T. marandobai</i>	T.mar03	<i>Erinnyis ello</i>	Mandioca	Belém - PA
<i>T. manicobai</i>	T.man01	<i>Erinnyis ello</i>	Mandioca	Rio Largo - AL
<i>T. galloi</i>	T.gal01	<i>Diatraea saccharalis</i>	Arroz	Teresina - PI
<i>T. galloi</i>	T.gal02	<i>Diatraea saccharalis</i>	Arroz	Teresina - PI
<i>T. galloi</i>	T.gal03	<i>Diatraea saccharalis</i>	Arroz	Teresina - PI

#### 3.2 Extração do DNA

O DNA foi extraído a partir de um indivíduo inteiro em um tubo do tipo eppendorf de 0,2mL contendo 80µL de Chelex 100 (5%) e 8µL de proteinase K (20mg/ml), incubados em um termociclador à 95°C por 20 minutos. Decorridos 20 minutos o tubo foi levemente agitado e centrifugado durante 45s, em seguida transferido para um novo eppendorf e armazenadas a -20°C.

#### 3.3 Quantificação do DNA

A quantificação foi realizada por meio da mensuração pelo espectrofotômetro NanoDrop™ o qual permitiu verificar a concentração e pureza das amostras a partir da razão 260/280nm.

### 3.4 Reação em Cadeia da Polimerase – PCR

As amostras extraídas de espécimes de *Trichogramma* foram submetidas à PCR para amplificação da região espaçadora ITS2 do rDNA, utilizando primers específicos (Tabela 2).

Tabela 2. Primers utilizados na PCR e suas respectivas sequências

Primers	Sequência
Forward	5' TGTGAACTGCAGGACACATG 3'
Reverse	5' GTCTTGCCTGCTCTGAG 3'

As reações foram realizadas em um eppendorf com os componentes nos volumes especificados (Tabela 3), para um volume final de 25µL.

Tabela 3. Componentes e volumes utilizados na PCR

Componentes da Reação	Volume utilizado
Buffer (10x) (Tris·Cl, KCl, (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> , 15 mM MgCl <sub>2</sub> )	2,5µL
MgCl <sub>2</sub> (25mM)	3,75µL
dNTP (10mM)	2µL
solução Q (5x)	0,25µL
Primer Forward	0,5µL
Primer Reverse	0,5µL
Taq DNA polimerase (5U/µL)	0,13µL
DNA genômico (concentração variável)	6µL
Água ultrapura	9,37µL
Volume final	25µL

As amplificações foram realizadas em termociclador Veriti™ 96 Well Thermal Cycler (Applied Biosystems). O programa de amplificação para as reações consistiu de uma desnaturação inicial do DNA a 94°C por 3 minutos, seguido de 33 ciclos que incluiu 40 segundos a 94°C (desnaturação), 45 segundos a 55°C (temperatura de anelamento) e 45 segundos a 72°C (polimerização). Decorridos os 33 ciclos ocorreu uma extensão final de 5 minutos a 72°C.

### **3.5 Resoluções e visualizações dos fragmentos amplificados**

Para a análise dos produtos amplificados foi usada uma alíquota de 5µL da reação de amplificação para corrida em eletroforese com gel de agarose (1,5%), realizada a uma voltagem de 90V a 90 minutos, corados com GelRed™ na concentração de 1:1000 e fotodocumentados sob luz ultravioleta. Para determinação dos produtos de PCR foi utilizado um marcador de peso molecular de 1KB.

### **3.6 Purificação dos produtos de PCR**

Os produtos de PCR foram purificados com o kit de purificação Invisorb Fragment CleanUp, de acordo com o protocolo proposto pelo fabricante, para que fosse possível obter uma qualidade de DNA adequada para o sequenciamento.

### **3.7 Sequenciamento**

#### **3.7.1 PCR para o sequenciamento da região ITS2 do DNA ribossomal**

O sequenciamento das amostras foi realizado na empresa ACTGene Análises Moleculares Ltda. (Centro de Biotecnologia, UFRGS, Porto Alegre, RS) utilizando o sequenciador automático AB 3500 Genetic Analyzer armado com capilares de 50 cm e polímero POP7 (Applied Biosystems).

Os DNA-moldes (30-40ng) foram marcados utilizando-se 2,5 pmol de cada primer e 0,5 mL do reagente BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Standart (Applied Biosystems) em um volume final de 10 mL.

As reações de marcação foram realizadas em termociclador LGC XP Cycler com uma etapa de desnaturação inicial a 96 °C por 3 minutos seguida de 25 ciclos de 96 °C por 10 segundos, 55 °C por 5 segundos e 60 °C por 4 minutos.

#### **3.7.2 Precipitação da PCR para o sequenciamento da região ITS2 do DNA ribossomal**

Uma vez marcadas, as amostras foram purificadas pela precipitação com isopropanol a 75% e lavagem com etanol a 60%. Os produtos precipitados foram diluídos em 10 mL de formamida Hi-Fi (Applied Biosystems), desnaturados a 95 °C por 5 minutos, resfriados em gelo por 5 minutos e eletroinjetados no sequenciador automático. Os dados de sequenciamento foram coletados utilizando-se o programa Data Collection 2 (Applied Biosystems) com os parâmetros Dye Set "Z"; Mobility File "KB\_3500\_POP7\_BDTv3.mob"; BioLIMS Project "3500\_Project1"; Run Module



1“FastSeq50\_POP7\_50cm\_cfv\_100”; e Analysis Module 1 “BC-3500SR\_Seq\_FASTA.saz.

### **3.8 Busca por similaridade no banco de dados GenBank**

As sequências obtidas foram submetidas à busca por similaridade no GenBank (NCBI – National Center for Biotechnology Information), por meio da ferramenta BLAST, visando-se determinar a similaridade com as sequências depositadas no referido banco de dados, as espécies foram identificadas a partir da porcentagem de semelhanças entre as sequências de ITS2 do DNA ribossomal.

### **3.9 Alinhamento múltiplo das sequências**

Foram montados contigs a partir das sequências forward e reverse sequenciadas. Para o alinhamento múltiplo foi utilizado os softwares Clustal Ômega e ClustalW, com penalidade de -9 para abertura de gaps e -3 para sua extensão. A detecção de sítios variáveis foi realizada por meio do programa MEGA (Molecular Evolutionary Genetic Analysis) versão 6.2, sendo informados considerando um patamar de até 80% de conservação.

### **3.10 Análise de agrupamento**

A análise de agrupamento foi realizada por meio do método de Máxima verossimilhança composta com o auxílio do programa MEGA (Molecular Evolutionary Genetic Analysis) versão 6.2.

O dendrograma foi montado por meio do método aglomerativo Neighbor Joining. As análises de bootstrap, para testarem a confiança nas topologias obtidas, foram realizadas com 1000 simulações do conjunto de dados.

## 4. RESULTADOS

### 4.1 Extração do DNA

As concentrações do DNA extraído variaram entre 4,3ng/μL e 100,4ng/μL (Tabela 4). Os insetos do gênero *Trichogramma* apresentam tamanho diminuto, dessa forma a obtenção de grandes quantidades de DNA genômico torna-se dificultada. Portanto as concentrações obtidas foram adequadas para realização dos ensaios subsequentes.

O grau de pureza das amostras (razão 260/280 nm) variou entre 0,64 e 1,21, embora não se encontrem dentro do intervalo de 1,8 e 2,0, considerado o mais viável para estudos moleculares envolvendo ácidos nucleicos, foi possível obter perfis eletroforéticos com boa resolução e conseqüentemente realizar as análises posteriores.

Tabela 4. Quantificação e pureza das amostras de espécies de *Trichogramma*

Amostras	Concentração de DNA (ng/μL)	Razão 260/280 nm
T.pret01	62,9	0,96
T.pret02	64	0,99
T.pret03	73,8	1,06
T.pret04	52,1	0,64
T.pret05	79,4	1,12
T.pret06	78,6	1,1
T.pret07	66,8	0,64
T.mar01	86,4	1,11
T.man01	73,2	1,12
T.man02	84,1	1,04
T.mar02	96	1,21
T.sp01	53,4	0,67
T.pret08	49,9	0,66
T.pret09	100,4	0,65
T.sp02	60,8	0,65
T.pret10	28,4	0,63
T.pret11	45,9	0,65
T.gal01	71,3	0,95
T.gal02	78,9	1,03
T.gal03	80,1	0,67
T.mar03	44,5	0,64

### 4.2 Reação em Cadeia da Polimerase – PCR

Foram verificadas as amplificações dos fragmentos do produto de PCR da região ITS2 do DNA ribossomal das amostras de espécies *T. pretiosum*, *T. galloi*, *T.*

*marandobai* e *T. manicobai* com fragmentos variando de 500 pb a 600 pb aproximadamente (Figura 1).

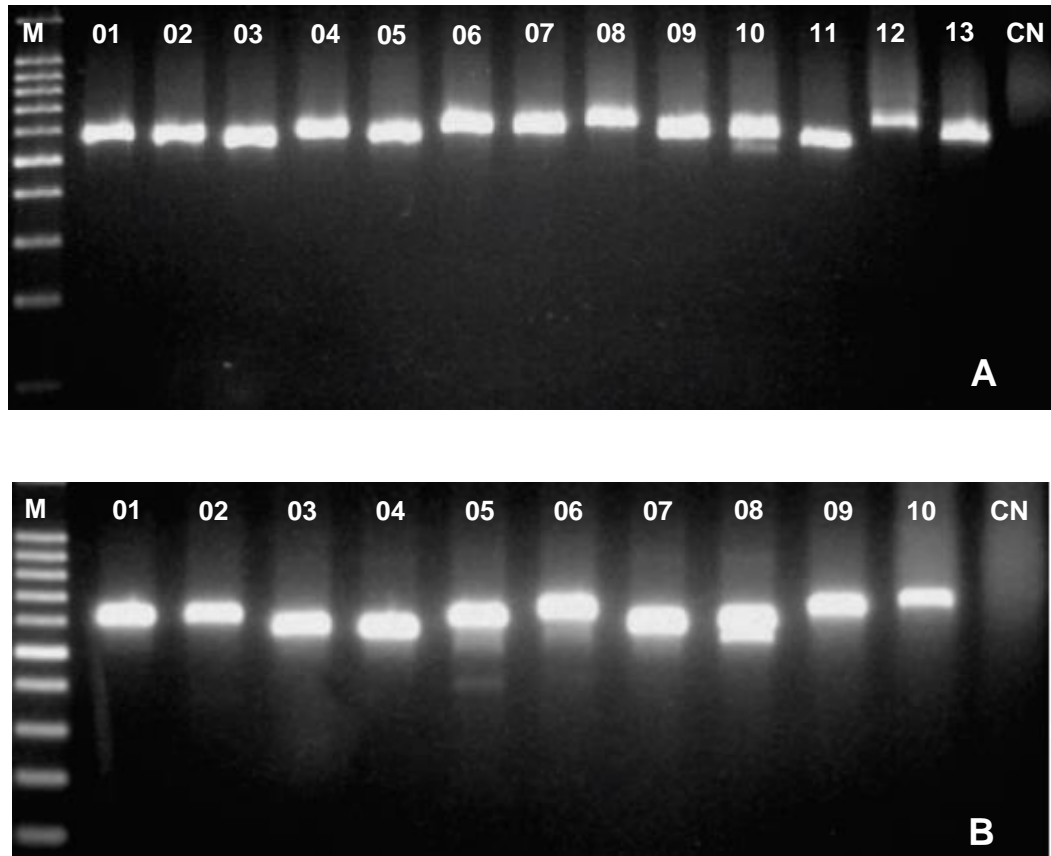


Figura 1: Em A e B, geis de agarose a 1,5% com produtos de PCR da região ITS2 do DNA ribossomal de acessos de espécies de *Trichogramma*. Os números representam os acessos de espécies de *Trichogramma*; M: marcador de peso molecular 100 pb; CN: controle negativo.

#### 4.3 Purificação dos produtos de PCR

Os produtos de PCR dos acessos de espécies de *Trichogramma* foram purificados, sendo possível obter quantidades suficientes e qualidades apropriadas para o sequenciamento, em que a razão 260/280 (nm) variou entre 1,85 e 1,94, indicando boa qualidade, exceto as amostras T.pret02 e T.pret11 que apresentaram a razão 260/280 com valor de 1,52 e 1,78 respectivamente, indicando possíveis contaminações (Tabela 5).

Tabela 5. Quantificação e pureza dos produtos de PCR purificados de espécies de *Trichogramma*

Amostras	Concentração de DNA (ng/ $\mu$ L)	Razão 260/280 nm
T.mar03	32,8	1,92
T.gal03	81,3	1,9
T.gal02	150,2	1,87
T.gal01	57,5	1,86
T.pret10	39,3	1,95
T.pret11	100,2	1,78
T.sp02	72,5	1,86
T.pret08	108,8	1,86
T.pret09	114,1	1,86
T.mar02	75,1	1,91
T.sp01	100,5	1,87
T.mar01	139	1,88
T.man01	61,4	1,87
T.pret07	111,9	1,85
T.pret06	61,9	1,88
T.pret05	94,5	1,88
T.pret02	88,7	1,52
T.pret01	75,6	1,94

#### 4.4 Busca por similaridade no banco de dados GenBank

As sequências obtidas variaram entre 409 pb e 600 pb. A partir da busca por similaridades, por meio da ferramenta BLAST, no banco de dados GenBank (NCBI – National Center of Biotechnology Information), foi possível verificar que todas elas correspondem às regiões ITS2 do DNA ribossomal, compatíveis com as sequências de espécies de *Trichogramma*.

Os valores da máxima identidade variaram entre 79% e 100%. Todos os acessos tiveram suas identificações correspondentes às previamente realizadas a partir dos caracteres morfológicos, o que confirma a correta identificação morfológica (Tabela 6).

Até o momento não há registros de sequências referentes à espécie *T. manicobai* no banco de dados GenBank, sendo o primeiro acesso desta espécie registrado no referido banco de dados.

Os valores de E *value* apresentaram-se iguais a zero para a maioria das sequências ou próximos a zero, o que representa alinhamentos confiáveis, uma vez que este parâmetro do BLAST, indica a probabilidade do alinhamento das sequências de entrada com as sequências do banco de dados ter sido obtido por um mero acaso, portanto quanto menor o E *value*, menores as chances do resultado ser consequência do acaso.

Tabela 6. Identificação de espécies de *Trichogramma* a partir de alinhamento com sequências depositadas no banco de dados GenBank – NCBI

Amostras	Espécies de <i>Trichogramma</i>	Número de Acesso	Máxima Identidade	Evalue	Identificação Molecular
T.pret01	<i>T. pretiosum</i>	JN315677.1	98%	0.0	<i>T. pretiosum</i>
T.pret02	<i>T. pretiosum</i>	DQ525178.1	98%	0.0	<i>T. pretiosum</i>
T.pret03	<i>T. pretiosum</i>	KM387312.1	93%	0.0	<i>T. pretiosum</i>
T.pret04	<i>T. pretiosum</i>	DQ525178.1	88%	0.0	<i>T. pretiosum</i>
T.pret05	<i>T. pretiosum</i>	DQ525178.1	92%	0.0	<i>T. pretiosum</i>
T.pret06	<i>T. pretiosum</i>	FN568059.1	92%	0.0	<i>T.pretiosum</i>
T.pret07	<i>T.pretiosum</i>	DQ525178.1	100%	0.0	<i>T. pretiosum</i>
T.mar01	<i>T. marandobai</i>	KP972055.1	98%	6,00E-177	<i>T.marandobai</i>
T.man01	<i>T. manicobai*</i>	-	-	-	-
T.mar02	<i>T. marandobai</i>	KP972055.1	95%	4,00E-149	<i>T. marandobai</i>
T.sp01	<i>Trichogramma sp.</i>	DQ525178.1	98%	0.0	<i>T. pretiosum</i>
T.pret08	<i>T.pretiosum</i>	DQ525178.1	79%	1,00E-85	<i>T.pretiosum</i>
T.pret09	<i>T.pretiosum</i>	DQ525178.1	94%	0.0	<i>T. pretiosum</i>
T.sp02	<i>Trichogramma sp.</i>	JX185988.1	92%	0.0	<i>T. pretiosum</i>
T.pret10	<i>T. pretiosum</i>	FN568059.1	86%	1,00E-145	<i>T. pretiosum</i>
T.pret11	<i>T. pretiosum</i>	DQ525178.1	98%	0.0	<i>T. pretiosum</i>
T.gal01	<i>T. galloi</i>	AY182764.1	99%	0.0	<i>T. galloi</i>
T.gal02	<i>T. galloi</i>	AY182764.1	99%	0.0	<i>T. galloi</i>
T.gal03	<i>T.galloi</i>	AY182764.1	94%	0.0	<i>T. galloi</i>
T.mar03	<i>T. marandobai</i>	KP972055.1	94%	3,00E-160	<i>T. marandobai</i>

\*Não há registros de sequências correspondentes à espécie *T. manicobai* no banco de dados GenBank

#### 4.5 Alinhamento múltiplo das sequências

As sequências obtidas variaram entre 409 pb e 600 pb. De acordo com o alinhamento múltiplo de todas as sequências das espécies estudadas (Anexo A) foi possível verificar as diferenças e similaridades entre as mesmas, no que se refere à presença ou ausência de bases nitrogenadas e sua distribuição na sequência. Para alinhar e uniformizar as sequências de todas as amostras foi necessário adicionar gaps.

Foi possível observar que há grandes regiões conservadas entre as espécies, embora apresente alguns sítios variantes entre as mesmas, nos quais foi possível detectar variações de uma única base.

Foram encontrados 477 sítios conservados, que refletem cerca de 79% do total de 599 sítios encontrados, confirmando a conservação da região ITS2 do DNA ribossomal ao longo da evolução das espécies. O número de sítios variáveis foi de 122, dos quais 21 representam os sítios de mudança única, em que apenas uma única base variou dentro do sítio analisado.

Dentro dos sítios variáveis foi possível observar aqueles que variam entre todas as espécies (cor rosa), e aqueles que variam apenas para uma das espécies estudadas (cor verde).

Assim como esperado, foi possível observar que existe pouca variação nucleotídica dentro das espécies do gênero em estudo, existindo uma variação maior entre as espécies. Os sítios conservados foram representados na maioria das espécies, confirmando a semelhança entre as amostras. Dentro da espécie *T. pretiosum* é notável a variação de uma única base nitrogenada em alguns sítios variáveis (destacados com \*) dos acessos T.pret01 e T.pret03. Das espécies estudadas *T. galloi* foi a que apresentou um menor número de sítios variáveis.

#### 4.6 Matriz de distância genética

A partir da matriz de distância genética para a região ITS2 do DNA ribossomal, obteve-se uma média de 0,0523 (Tabela 7). Foi possível verificar a semelhança existente entre os acessos da mesma espécie, sendo que a menor distância genética encontrada foi entre os acessos da espécie *T. pretiosum* com valores de 0,005. As maiores diferenças genéticas foram observadas entre os acessos referentes a espécie *T. galloi* e dois acessos da espécie *T. pretiosum* (T.pret01 e T.pret03) apresentando uma diferença genética de 0,253. A segunda maior distância foi observada entre os acessos de *T. marandobai* e o acesso T. pret01 da espécie *T. pretiosum*, com uma distância de 0,210.

As menores distâncias encontradas, exceto aquelas observadas entre os acessos da espécie *T. pretiosum*, foram entre os acessos da espécie *T. marandobai* (T. mar01, T. mar02 e T. mar03), e o acesso T. man01 da espécie *T. manicobai*, as que apresentaram um valor de 0,047.

Foi possível observar que dentro das espécies *T. pretiosum* e *T. marandobai* existem acessos sem diferença genética (0,000), por exemplo o acesso T.pret10 de *T. pretiosum* apresentou distância genética igual a 0,000 com os acessos T.pret09, T.pret06, T.pret05, T.pret11 e T.pret02, bem como o T.mar03 da espécie *T. marandobai* não apresentou diferença genética quando comparado aos acessos T.mar01 e T.mar02 da mesma espécie.

Tabela 7. Matriz de distância genética da região ITS2 do DNA ribossomal para acessos das espécies *Trichogramma pretiosum*, *T. galloi*, *T. marandobai* e *T. manicobai* utilizando o método de máxima verossimilhança composta.

<b>Amostras</b>	T.pret03	T.pret01	T.pret10	T.pret04	T.pret09	T.pret06	T.pret05	T.pret11	T.sp01	T.pret02	T.gal03	T.gal02	T.gal01	T.man01	T.mar03	T.mar01	T.mar02
T.pret03	0.000																
T.pret01	0.152	0.000															
T.pret10	0.075	0.075	0.000														
T.pret04	0.069	0.075	0.005	0.000													
T.pret09	0.069	0.075	0.005	0.000	0.000												
T.pret06	0.069	0.075	0.005	0.000	0.000	0.000											
T.pret05	0.069	0.075	0.005	0.000	0.000	0.000	0.000										
T.pret11	0.069	0.075	0.005	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000									
T.sp01	0.069	0.075	0.005	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000								
T.pret02	0.069	0.075	0.005	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000							
T.gal03	0.253	0.253	0.191	0.185	0.185	0.185	0.185	0.185	0.185	0.185	0.000						
T.gal02	0.253	0.253	0.191	0.185	0.185	0.185	0.185	0.185	0.185	0.185	0.185	0.000					
T.gal01	0.253	0.253	0.191	0.185	0.185	0.185	0.185	0.185	0.185	0.185	0.185	0.185	0.000				
T.man01	0.224	0.238	0.178	0.171	0.171	0.171	0.171	0.171	0.171	0.171	0.153	0.153	0.153	0.000			
T.mar03	0.197	0.210	0.146	0.140	0.140	0.140	0.140	0.140	0.140	0.140	0.146	0.146	0.146	0.047	0.000		
T.mar01	0.197	0.210	0.146	0.140	0.140	0.140	0.140	0.140	0.140	0.140	0.146	0.146	0.146	0.047	0.000	0.000	
T.mar02	0.197	0.210	0.146	0.140	0.140	0.140	0.140	0.140	0.140	0.140	0.146	0.146	0.146	0.047	0.000	0.000	0.000

Foi gerada uma outra matriz de distância genética para as espécies estudadas a fim de analisar a distância genética entre as mesmas (Tabela 8). Foi possível observar que as espécies mais próximas geneticamente são *T. manicobai* e *T. marandobai*, apresentando uma pequena diferença genética de 0,015. Enquanto que as espécies mais distantes foram *T. galloi* e *T. pretiosum* as quais apresentaram diferença genética de 0,086.

Tabela 8. Matriz de distância genética da região ITS2 do DNA ribossomal entre as espécies *Trichogramma pretiosum*, *T. galloi*, *T. marandobai* e *T. manicobai* utilizando o método de máxima verossimilhança composta.

Espécies	<i>T. marandobai</i>	<i>T. pretiosum</i>	<i>T. galloi</i>	<i>T. manicobai</i>
<i>T. marandobai</i>	0.000			
<i>T. pretiosum</i>	0.064	0.000		
<i>T. galloi</i>	0.077	0.086	0.000	
<i>T. manicobai</i>	0.015	0.064	0.083	0.000

#### 4.7 Análise de agrupamento

De acordo com o dendrograma obtido a partir da matriz de distância genética pelo método aglomerativo Neighbor Joining, pode-se verificar a presença de três grupos, sendo o primeiro formado por acessos das espécies *T. manicobai* e *T. marandobai*, o segundo foi formado pelos acessos referentes a espécie *T. galloi* e o terceiro com os acessos da espécie *T. pretiosum* (Figura 2).

Foi possível observar que os acessos T.pret01 e T.pret03 da espécie *T. pretiosum* que apresentaram variações de uma única base formaram grupos separados dos demais acessos da referida espécie. Acessos da mesma, coletados em diferentes hospedeiros foram agrupados em um mesmo grupo, diferente do acesso T. pret03 coletado no hospedeiro *Heraclides. thoas* foi agrupado em grupo diferente dos demais acessos, T.pret02 e T.pret01, coletados no mesmo hospedeiro.

A partir do dendrograma é possível confirmar a similaridade genética existente entre as espécies *T. manicobai* e *T. marandobai*, onde as mesmas encontram-se próximas.



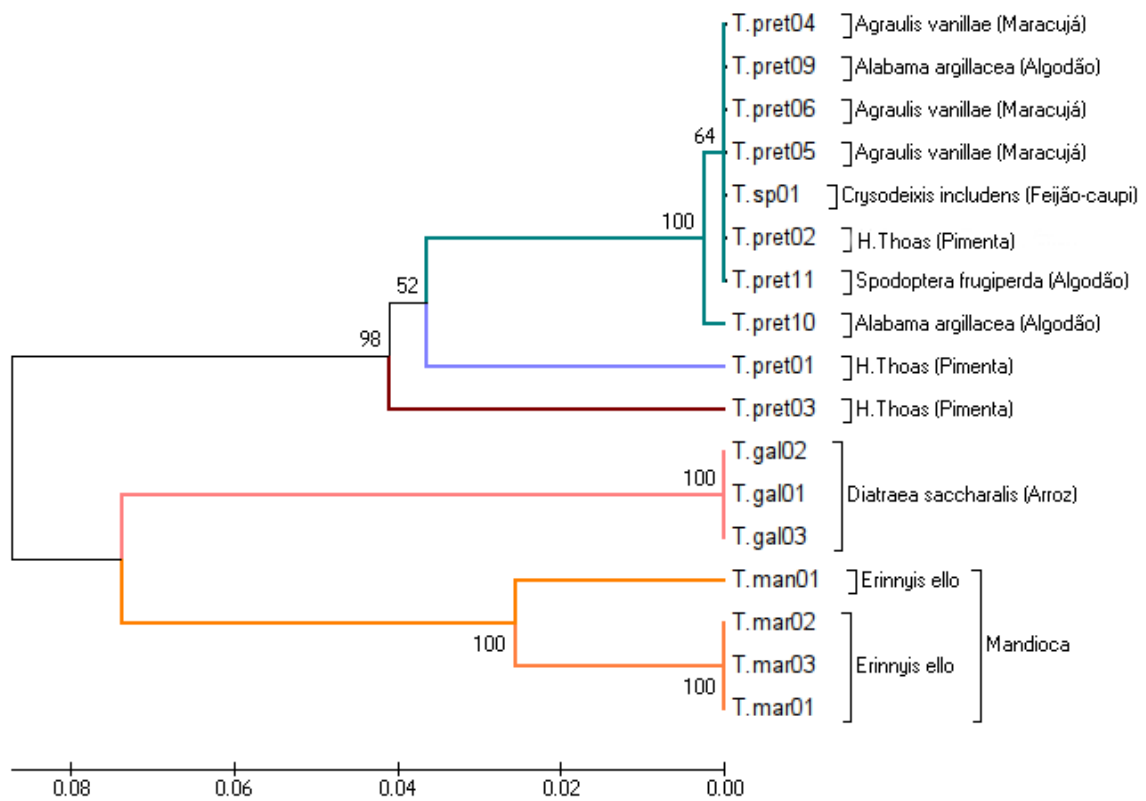


Figura 2 – Dendrograma de acessos representantes das espécies *T. pretiosum*, *T. galloi*, *T. marandobai* e *T. manicobai* obtido a partir das análises das sequências de nucleotídeos da região ITS2 do DNA ribossomal de acessos referentes as espécies a partir do método Neighbor Joining.

## 5. DISCUSSÃO

O sucesso nos programas de controle biológico com *Trichogramma* depende da correta identificação das espécies. O tamanho diminuto destes organismos, a ocorrência de variação intra-específica e a presença de espécies crípticas dificultam o seu reconhecimento e conseqüentemente sua aplicação nos programas de controle biológico. Deste modo, as ferramentas moleculares tornam-se um método de comprovação das identificações das espécies de *Trichogramma* realizadas a partir de dados morfológicos.

Os resultados obtidos por este trabalho demonstraram um alto índice na correspondência das identificações morfológicas e moleculares. Ressalta-se que o sequenciamento da região ITS2 têm se destacado como uma ferramenta importante na identificação de espécies de *Trichogramma*, uma vez que espécies de difícil identificação podem ter suas identidades esclarecidas. Além disso, espécies estritamente relacionadas podem ter suas identificações comprovadas a partir de análises moleculares conforme observado por Ciociola Jr. et al. (2001b) quando da realização de estudos com espécies de *Trichogramma* identificaram molecularmente espécies de *Trichogramma* do Brasil a partir da região ITS2 do DNA ribossomal, apontando suas vantagens.

Este é o primeiro registro no banco de dados GenBank correspondente a sequências da espécie *T. manicobai*, deste modo a busca por similaridade com sequências desta espécie torna-se impossível. No entanto, segundo Vieira et al. (2014) essa espécie é facilmente reconhecida pela cápsula genital ampla, principalmente por apresentar a lâmina dorsal com projeções laterais e pelo processo intervolselar curto e largo, podendo ser bífido ou truncado no ápice. Descartando possíveis erros na identificação previamente realizada a partir de caracteres morfológicos.

Foi possível verificar que as sequências de entrada correspondem às regiões desejadas, compatíveis com as sequências de espécies de *Trichogramma*, obtendo similaridade variando entre 79% e 100%. Esse critério foi também utilizado por Santos, et al (2015), os quais utilizaram as porcentagens de semelhança entre as sequências de ITS2 do DNA ribossomal para identificação de espécies de *Trichogramma*, onde identificaram *T. pretiosum* com similaridade de 95%, *T. galloi* com 91% e *T. exiguum* com 92%.

Segundo Almeida e Stouthamer (2015), as sequências de ITS2 são úteis em estudos sistemáticos de *Trichogramma*, pois fornece uma identificação confiável de espécies de *Trichogramma*, o que permitiu distinguir espécies de *Trichogramma* introduzidas na América do Sul.

As regiões do DNA ribossomal do espaço transcrito interno (ITS1 e ITS2) têm sido amplamente conservadas ao longo da evolução, desse modo tem se tornado uma ferramenta importante para o trabalho taxonômico (ORREGO; AGUDELO-SILVA, 1993; HOY 2003, PINTO et al. 1997). Em estudos com espécies do gênero *Trichogramma*, estes marcadores moleculares são considerados adequados para distinguir espécies que apresentam uma variação intraespecífica, além disso, é possível realizar análises filogenéticas a partir destes, tornando-se um forte candidato para estabelecer a sistemática do gênero em estudo.

Do total de 599 sítios encontrados no alinhamento múltiplo entre os acessos das espécies *T. pretiosum*, *T. galloi*, *T. marandobai* e *T. manicobai*, 477 sítios foram considerados conservados, representando cerca de 79% de similaridade entre as espécies estudadas, o que reflete uma alta taxa de conservação da região ITS2 do DNA ribossomal ao longo da evolução das referidas espécies do gênero *Trichogramma*. Sendo possível observar os sítios variantes entre as espécies e assim distingui-las.

Ao analisar o alinhamento múltiplo em cada espécie estudada, foi possível observar algumas variações de uma única base dentro da espécie *T. pretiosum*, essa variação pode ser explicada por processos de mutações o que levam à substituições de uma base dentro da sequência, essas variações quando ocorrem em pelo menos 1% da população pode ser considerada como polimorfismo de nucleotídeo único (SNP do inglês Single Nucleotide Polymorphism) o qual é responsável por grande parte das variações genéticas observadas em indivíduos de uma população.

O grande número de sítios conservados dentro de cada espécie confirma a semelhança entre as amostras, bem como a confiabilidade nas sequências obtidas e conseqüentemente a correta identificação das espécies previamente realizadas a partir de caracteres morfológicos.

Os resultados obtidos a partir da análise de agrupamento conflitam com o esperado, tendo em vista que acessos pertencentes as mesmas espécies

possivelmente se encontrariam em um mesmo grupo. Na análise de agrupamento um acesso referente a espécie *T. pretiosum* foi agrupado separadamente distante dos outros da mesma espécie. Uma possível explicação é que a amostra T.pret03, agrupada em grupo separado dos demais da mesma espécie, é mais variável geneticamente, uma vez que o mesmo apresentou variações de uma única base em sítios variantes.

Resultados semelhantes foram obtidos por Borba et al, (2005) ao realizar um estudo de similaridade genética de linhagens de *Trichogramma*. De três linhagens da espécie *T. pretiosum*, uma delas se encontrou mais distante das outras, e ao comparar com a espécie *T. atopovirilia* afirmam que pode existir uma variação genética maior dentro da espécie *T. pretiosum* do que entre *T. pretiosum* e *T. atopovirilia*.

Os acessos referentes a espécie *T. manicobai* e *T. marandobai*, encontram-se em grupos próximos no dendrograma, o que reflete similaridade genética entre as duas espécies. As mesmas são ditas espécies especialistas de *Trichogramma*, uma vez que se encontram associadas somente a espécie *Erennyis ello*, sendo encontrada em cultivares de mandioca, o que possivelmente confirmaria a relação genética existente entre as duas espécies estudadas de *Trichogramma*. Essa similaridade genética também é perceptível dentro das espécies, pois não foi possível observar diferenças genéticas entre os acessos da espécie *T. marandobai* coletados em regiões distintas do Brasil, o que confirma que esta espécie é pouco variável geneticamente.

A região ITS2 do DNA ribossomal é representada por um espaço entre genes, o que não está relacionada a uma região codificante, conseqüentemente não é expressa em fenótipo. Desse modo, variações genéticas existentes nessa região não estão relacionadas às modificações na morfologia do inseto estudado. O que possivelmente explicaria o fato das variações genéticas observadas em acessos da espécie *T. pretiosum* não estarem relacionadas aos seus respectivos hospedeiros. Uma vez que, possivelmente acessos coletados no mesmo hospedeiro agrupariam no mesmo grupo. No entanto, foi possível observar a partir do dendrograma que acessos de *T. pretiosum* coletados no mesmo hospedeiro, *H. thoas*, foram agrupados em grupos distintos, bem como acessos da mesma espécie coletados em diversos hospedeiros foram agrupados no mesmo grupo, como os acessos T. pret10, T.pret11 e T.pret05

coletados em *Alabama argillacea*, *Spodoptera frugiperda* e *Agraulis vanillae* respectivamente, hospedeiros distintos pertencentes a diferentes famílias de Lepidoptera. Segundo Pinto, (1997) dentre as espécies de *Trichogramma*, *T. pretiosum* é a mais amplamente distribuída e polífaga, a qual apresentam ampla faixa de hospedeiros.

Diferentes genótipos podem ter maior influência sobre a performance do parasitoide no campo. Várias características comportamentais são influenciadas pela variação genética intraespecífica, e com o conhecimento dessas variabilidades genéticas é possível: i) uma melhor estimativa da capacidade do agente de controle biológico responder às condições ambientais; ii) uma estimativa adequada do potencial de sobrevivência de parasitoides em campo; iii) iniciarem-se programas de melhoramento e seleção das linhagens, a fim de melhorar a eficácia dos agentes liberados (WANJNBERG, 2010).

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

## 6. CONCLUSÕES

Os acessos analisados foram corretamente identificados a partir dos caracteres morfológicos, tendo suas identidades confirmadas com o sequenciamento da região ITS2 do DNA ribossomal.

As amostras das espécies estudadas apresentaram um grau elevado de conservação da região ITS2 do DNA ribossomal, existindo uma variação maior entre as espécies e menor dentro das espécies.

Os acessos de *T. pretiosum* apresentam variações genéticas na região ITS2 do DNA ribossomal, no entanto estas variações não refletem a relação entre a espécie de *Trichogramma* e seus respectivos hospedeiros.

O baixo valor de distância genética entre as espécies *T. marandobai* e *T. manicobai* sugere similaridade genética entre as mesmas, as quais encontram-se próximas na escala evolutiva.

O sequenciamento da região ITS2 do DNA ribossomal é uma importante ferramenta para verificar a similaridade genética entre as espécies de *Trichogramma*.

## REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, R.P. de. *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, 2004.
- ALMEIDA, R.P. e STOUTHAMER, R. ITS-2 sequences-based identification of *Trichogramma* species in South America. **Braz. J. Biol**, v.75, n.4, p.974-982, 2015.
- ALMEIDA, R.P. de. E STOUTHAMER, R. Molecular identification of *Trichogramma cacorcaiae* Marchal (Hymenoptera: *Trichogrammatidae*): A new record for Peru. **Neotropical Entomology**, v.32, p.269-272, 2003.
- BARTLETT, A.C. Genetic changes during insect domestication. **New Orleans: USDA/ARS**, cap.1, p.2-8, 1984.
- BARTLETT, A.C. Guidelines for genetic diversity in laboratory colony establishment and maintenance. In: SINGH, P., MOORE, R.F. (eds). **Handbook of insect rearing**. Amsterdam: Elsevier, v.1, cap.2, p.7-17, 1985.
- BEGON, M. et al. Ecologia de Individuos a Ecosystemas. 4ed, Artmed, Porto Alegre, 2007.
- BERKELHAMER, R.C. Intraspecific genetic variation and haplodiploidy, eusociality and polygyny. in the Heminoptera. **Evolution** v.37, p.540-545, 1983.
- BORBA, R.S. et al. Dissimilaridade genética de linhagens de *Trichogramma* Westwood (Hymenoptera: *Trichogrammatidae*) através de marcadores moleculares ISSR. **Neotropical Entomology**, Londrina, v.34, n.4, p.565-569, 2005.
- BOTELHO, P. S. M. Eficiência de *Trichogramma* em campo. In: PARRA, J. R. P. e ZUCCHI, R. A. *Trichogramma* e o controle biológico aplicado. Piracicaba: FEALQ, p. 303-318, 1997.
- CIOCIOLA JÚNIOR, A.L. et al. Molecular Key to seven brazilian species of *Trichogramma* (Hymenoptera: *Trichogrammatidae*) using sequences of the ITS2 region and restriction analysis. **Neotropical Entomology**, v.30, p.259-262, 2001a.
- CIOCIOLA JÚNIOR, A.L. et al. Molecular tool for identification of closely related species of *Trichogramma* (Hymenoptera: *Trichogrammatidae*): *T. rojasi* Nagaraja & Nagarkati and *T. lasallei* Pinto. **Neotropical Entomology**, v.30, p.575-578, 2001b.
- CONSOLI, FL. e PARRA, JRP. Biology of *Trichogramma galloi* and *T. pretiosum* (Hymenoptera: *Trichogrammatidae*) reared in vitro and in vivo. **Annals of the Entomology Society of America**, v.89, p.828-834, 1996.
- CONSOLI, FL. et al. Developmental time and characteristics of the immature stages of *Trichogramma galloi* and *T. pretiosum* (Hymenoptera:

*Trichogrammatidae*). **Revista Brasileira de Entomologia**, v.43, p.271-275, 1999.

FERREIRA, M.E. e GATTAPAGLIA, D. Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética. 2 edição. Brasileira: Embrapa-Cenargen, p. 220, 1998.

FIGUEROSA, C. A. S. Alternância de hospedeiros de criação e efeito de bioinseticidas no parasitismo de *Trichogramma pretiosum* em ovos de *Plutella xylostella*. Tese (Doutorado). Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinária – UNESP. p.68, 2015.

FRANKHAM, R. et al. A primer of conversation genetics. Cambridge, UK. **Cambridge University Press**, p.234, 2004.

FUTUYMA, D. J. The origin of genetic variation. In:\_\_\_\_\_. Evolution. Sunderland: Sinauer Associates, 2005. cap. 8, p. 161-188, 2005.

GOMES, S.M. Comparação de três hospedeiros alternativos para criação e produção massal de *Trichogramma pretiosum* Riley, 1879 e *T. galloi* Zucchi, 1988. Piracicaba. Dissertação (Mestrado) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, 106p, 1997.

GRAUR, D. Gene diversity in Hymenoptera **Evolution**, v.39, p.190-199, 1985.

HOY, M. A. DNA, gene structure, and DNA replication. In: \_\_\_\_\_. Insect molecular genetics: an introduction to principles and applications. **San Diego: Academic Press**, cap.1, p.3-27, 2003.

JANSSENS, F. A. La théorie de la chiasmotypie: nouvelle interprétation des cinisès de maturation Cellule, **Louvain**, v.22, p. 387-411, 1909.

LA SALLE, J.; GAULD, I.D.Hymenoptera and biodiversity. **London: C.A.B International**, p.348, 1993.

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

NAGARKATTI, S.; H. NAGARAJA. Biosystematics of *Trichogramma* and *Trichogrammatoidea* species. **Entomol**, v.22, p.157-176, 1977.

NASIR, M.F. et al. Molecular identification of *Trichogramma* species from Pakistan, using ITS-2 region of rDNA. **Bio Control**, v.58, p.483-491, 2013.

OLIVEIRA, C.M., et al. Análise comparativa da estabilidade do DNA de *Dalbulus maidis* (DeLong & Wolcott) (Hemiptera: Cicadellidae) sob diferentes métodos de preservação para uso em RAPD-PCR. **Neotropical Entomology**, v.31, p.225-231, 2002.

ORREGO, C.; F. AGUDELO-SILVA. Genetic variation in the parasitoid wasp *Trichogramma* (Hymenoptera *Trichogrammatidae*) revealed by DNA



amplification of a section of the nuclear ribosomal repeat. Fla. **Entomol**, v.76, p.519-524, 1993.

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

PALOMEQUE, T.; LORITE, P. Satellite DNA in insects: a review. **Heredity, London**, v.100, n.6, p.564–573, 2008.

PARRA, J. R. P. Mass rearing of egg parasitoids for biological control programs. In: CÔNSOLI, F. L.; PARRA, J. R. P., ZUCCHI, R. A. (Eds.). *Egg parasitoids in agrosystems with emphasis on Trichogramma*. **New York: Springer**. p. 267-292, 2010.

PARRA, J.R.P.; ZUCCHI, R.A. *Trichogramma* in Brazil: feasibility of use after twenty years of research. **Neotropical Entomology**, v.33, n.3, p.271-281, 2004.

PINTO, J. D. Taxonomia de *Trichogrammatidae* (Hymenoptera) com ênfase nos gêneros que parasitam Lepidoptera. In: PARRA, J. R. P.; ZUCCHI, R. A. (Eds.). *Trichogramma e o controle biológico aplicado*. Piracicaba: FEALQ, p.13-40, 1997.

PINTO, J.D. A review of the New World genera of *Trichogrammatidae* (Hymenoptera). **Journal Hymenoptera Research**, Madison, v.15, p. 38-163, 2006.

PINTO, J.D. et al. A new cryptic species of *Trichogramma* (Hymenoptera *Trichogrammatidae*) from the Mojave desert of California as determined by morphological, reproductive and molecular data. **Proc. Entomol. Soc. Wash.** v.99, p.238-247, 1997.

PINTO, J.D. et al. Phenotypic plasticity and taxonomic character in *Trichogramma* (Hymenoptera: Trichogrammatidae). **Annals of the Entomological Society of America, Lanham**, v.82, p.414-425, 1989.

PINTO, J.D. Systematics of the north American species of *Trichogramma* Westwood (Hymenoptera: Trichogrammatidae). Washigton, **Entomological Society of Washigton**, p.287, 1999.

PINTO, J.D.; STOUTHAMER, R. Systematics of the Trichogrammatidae with emphasis on *Trichogramma*. In: WAJNBERG, E; HASSAN, S.A (Ed). *Biological control with egg parasitoid*. **Wallingford: CAB International**, cap.1, p.1-36, 1994.

PRATISSOLI, D. e PARRA, J.R.P. Desenvolvimento e exigências térmicas de *Trichogramma pretiosum* Riley, criados em duas traças do tomateiro. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.35, p.1281-1288, 2000.

QUERINO, R.B. et al. Systematics of the Trichogrammatidae (Hymenoptera: Chalcidoidea) with a focus on the genera arracking Lepidoptera. In: CONSOLI, F.L.; PARRA, J.R.P.; RODRIGUES, S.M.M. e SAMPAIO, M.V. *Armazenamento*

de *Trichogramma pretiosum* Riley (Hymenoptera; *Trichogrammatidae*) em baixas temperaturas. **Arquivos do Instituto Biológico**, v.78, n.1, p.45-51, 2010.

QUERINO, R.B. Taxonomia do Gênero *Trichogramma* Westwood, 1833 (Hymenoptera: *Trichogrammatidae*) na América do Sul. Piracicaba. Tese (Doutorado) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, p.214, 2002.

QUERINO, R.B. ZUCCHI, R.A. Caracterização Morfológica de Dez Espécies de *Trichogramma* (Hymenoptera: *Trichogrammatidae*) Registradas na América do Sul. **Netropical Entomology**, v.32, n.4, p.597-613, 2003.

QUERINO, R.B.; ZUCCHI, R.A. An illustrated key to the species of *Trichogramma* (Hymenoptera: *Trichogrammatidae*) recorded in Brazil. **Zootaxa**, v.1073, p.37-70, 2005.

QUERINO, R.B.; ZUCCHI, R.A. Guia de identificação de *Trichogramma* para o Brasil. 1a ed. Brasília: **Embrapa Informação Tecnológica**, 103p, 2011.

QUERINO, R.B.; ZUCCHI, R.A. Intraspecific variation in *Trichogramma bruni* Nagarja, 1833 (Hymenoptera, *Trichogrammatidae*) associated with different hosts. **Brazilian Journal Biology**, Londrina, v.62, p.665-679, 2002.

SAMARA, R. et al. Genetic divergence of *Trichogramma aurosum* Sugonjaev and Sorokina (Hymenoptera: *Trichogrammatidae*) individuals based on ITS2 and AFLP analysis. **Journal of Applied Entomology**, v.132, p.230-238, 2008.

SANTOS, N.R. et al. Molecular identification of *Trichogramma* species from regions in Brazil using the sequencing of the ITS2 region of ribosomal DNA. **Braz. J. Biol**, v.75, n.2, p.391-395, 2015.

SILVA, I.M.M.S. et al. Analysis of Portuguese *Trichogramma* spp. (Hym, *Trichogrammatidae*) using ITS-rDNA and RAPDs. **Les Colloques de l'Intra, Paris**, v.73, p.37-39, 1995.

STOUTHAMER, R. et al. Taxonomic status of thelytokous forms of *Trichogramma* (Hymenoptera: *Trichogrammatidae*). **Annual Entomology Society of America**, v.83, p.475-581, 1990.

STOUTHAMER, R. et al. The utility of internally transcribed spacer 2 DNA sequences of the nuclear ribosomal gene for distinguishing sibling of *Trichogramma*. **BioControl**, v.43, p.421-440, 1999.

STOUTHAMER, R. The use of sexual versus asexual wasps in biological control. **Entomology**, v.38, n.1, p.3-6, 1993.

VASCONCELOS, Y. Inseto contra inseto. **Pesquisa FAPESP**, São Paulo, n. 194, p.68-73, 2012.

VIANNA, U.R. et al. Espécies e/ou linhagens de *Trichogramma* spp. (Hymenoptera: *Trichogrammatidae*) para o controle de *Anticarsia gemmatilis*

(Lepdopera: Noctuidae) **Arquivos do instituto Biológico**, v.78, n.1, p.81-87, 2011.

VIEIRA, J.M. et al. On the identity of *Trichogramma demoraesi* Nagaraja (Hymenoptera: *Trichogrammatidae*), with a checklist and a key to *Trichogramma* species associated with *Erinnyis ello* (L.) (Lepidoptera, Sphingidae) in Brazil. **Zootaxa**, v.3869, n.1, p.83-89, 2014.

VINSON, S.B. Comportamento de seleção hospedeira de parasitoides de ovos, com ênfase na família *Trichogrammatidae*. In: PARRA, J.R.P.; ZUCCHI, R.A. (Ed.). *Trichogramma e o controle biológico aplicado*. Piracicaba: FEALQ, cap.3, p.67-119, 1997.

WANG, Z. et al. Mass rearing and release of *Trichogramma* for biological control of insect pests of corn in China. *Biological Control*, Maryland Heights, v.68, p.136-144, 2014.

WANJBERG, E. Genetics of the behavioral ecology of egg parasitoids. In: CÔNSOLI, F. et al. *Egg parasitoids in agroecosystems with emphasis on *Trichogramma**. **New York: Springer**, p.149-166, 2010.

**Anexo**



Continuação

T.gal01	C	T	C	C	T	C	T	C	-	A	A	T	C	G	T	G	C	A	C	T	C	T	C	T	C	T	A	G	C	A	C	T	A	C	T
T.gal03	C	T	C	C	T	C	T	C	-	A	A	T	C	G	T	G	C	A	C	T	C	T	C	T	C	T	A	G	C	A	C	T	A	C	T
T.gal02	C	T	C	C	T	C	T	C	-	A	A	T	C	G	T	G	C	A	C	T	C	T	C	T	C	T	A	G	C	A	C	T	A	C	T
T.man01	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	C	-	-	-	-	-	-	C	A	C	T	C	T	C	T	C	G	-	-	-	C	-	-	-
T.mar02	C	T	C	C	T	C	T	C	-	A	C	T	C	-	-	-	-	-	-	T	C	T	C	T	C	T	-	-	-	C	T	-	T	T	
T.mar03	C	T	C	C	T	C	T	C	-	A	C	T	C	-	-	-	-	-	-	T	C	T	C	T	C	T	-	-	-	C	T	-	T	T	
T.mar01	C	T	C	C	T	C	T	C	-	A	C	T	C	-	-	-	-	-	-	T	C	T	C	T	C	T	-	-	-	C	T	-	T	T	
T.pret03	C	G	C	C	A	C	A	C	-	-	A	C	-	-	-	-	-	-	C	T	T	T	C	T	C	T	T	-	-	-	C	-	-	-	
T.pret02	C	G	C	C	A	C	A	C	-	A	C	A	C	-	-	-	-	-	T	T	C	T	C	T	C	T	T	-	-	-	C	-	-	-	
T.pret10	C	G	C	C	A	C	A	C	-	A	C	A	C	-	-	-	-	-	T	T	C	T	C	T	C	T	T	-	-	-	C	T	-	-	C
T.pret01	T	G	C	C	C	-	C	-	-	C	A	C	-	-	-	-	-	-	C	T	C	T	C	T	C	T	T	-	-	-	C	-	-	-	-
T.pret09	C	G	C	C	A	C	A	C	-	A	C	A	C	-	-	-	-	-	T	T	C	T	C	T	C	T	T	-	-	-	C	-	-	-	-
T.pret04	C	G	C	C	A	C	A	C	-	A	C	A	C	-	-	-	-	-	T	T	C	T	C	T	C	T	T	-	-	-	C	-	-	-	-
T.pret05	C	G	C	C	A	C	A	C	-	A	C	A	C	-	-	-	-	-	T	T	C	T	C	T	C	T	T	-	-	-	C	-	-	-	-
T.pre06	C	G	C	C	A	C	A	C	-	A	C	A	C	-	-	-	-	-	T	T	C	T	C	T	C	T	T	-	-	-	C	-	-	-	-
T.pret09	C	G	C	C	A	C	A	C	-	A	C	A	C	-	-	-	-	-	T	T	C	T	C	T	C	T	T	-	-	-	C	T	-	-	C
T.sp01	C	G	C	C	A	C	A	C	-	A	C	A	C	-	-	-	-	-	T	T	C	T	C	T	C	T	T	-	-	-	C	-	-	-	-

T.gal01	A	C	T	C	A	C	G	T	A	-	G	T	A	G	C	G	A	T	A	A	G	A	G	A	G	C	A	G	C	G	T	G	G	G	C	G	C
T.gal03	A	C	T	C	A	C	G	T	A	-	G	T	A	G	C	G	A	T	A	A	G	A	G	A	G	C	A	G	C	G	T	G	G	G	C	G	C
T.gal02	A	C	T	C	A	C	G	T	A	-	G	T	A	G	C	G	A	T	A	A	G	A	G	A	G	C	A	G	C	G	T	G	G	G	C	G	C
T.man01	A	-	-	-	-	-	G	A	G	-	-	A	G	C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	C	G	G	-	-	-	
T.mar02	A	-	-	-	-	-	G	A	G	-	A	T	A	G	A	G	A	-	-	A	G	A	G	A	G	C	G	A	-	G	A	G	G	G	-	-	-
T.mar03	A	-	-	-	-	-	G	A	G	-	A	T	A	G	A	G	A	-	-	A	G	A	G	A	G	C	G	A	-	G	A	G	G	G	-	-	-
T.mar01	A	-	-	-	-	-	G	A	G	-	A	T	A	G	A	G	A	-	-	A	G	A	G	A	G	C	G	A	-	G	A	G	G	G	-	-	-
T.pret03	A	-	-	-	-	-	G	A	G	T	A	T	A	G	C	A	G	-	-	G	T	G	T	G	C	G	T	G	G	G	T	G	G	-	-	-	
T.pret02	A	-	-	-	-	-	G	A	G	T	A	T	A	G	C	A	G	-	-	A	G	T	G	T	G	C	G	T	G	T	G	C	G	G	-	-	-
T.pret10	A	-	-	-	-	-	G	A	G	T	A	T	A	G	C	A	G	-	-	A	G	T	G	T	G	C	G	T	G	T	G	C	G	G	-	-	-
T.pret01	A	-	-	-	-	-	G	A	G	T	A	T	A	G	C	A	G	-	-	G	T	G	T	G	C	G	T	G	T	G	C	G	G	-	-	-	
T.pret09	A	-	-	-	-	-	G	A	G	T	A	T	A	G	C	A	G	-	-	A	G	T	G	T	G	C	G	T	G	T	G	C	G	G	-	-	-
T.pret04	A	-	-	-	-	-	G	A	G	T	A	T	A	G	C	A	G	-	-	A	G	T	G	T	G	C	G	T	G	T	G	C	G	G	-	-	-
T.pret05	A	-	-	-	-	-	G	A	G	T	A	T	A	G	C	A	G	-	-	A	G	T	G	T	G	C	G	T	G	T	G	C	G	G	-	-	-
T.pre06	A	-	-	-	-	-	G	A	G	T	A	T	A	G	C	A	G	-	-	A	G	T	G	T	G	C	G	T	G	T	G	C	G	G	-	-	-
T.pret09	A	-	-	-	-	-	G	A	G	T	A	T	A	G	C	A	G	-	-	A	G	T	G	T	G	C	G	T	G	T	G	C	G	G	-	-	-
T.sp01	A	-	-	-	-	-	G	A	G	T	A	T	A	G	C	A	G	-	-	A	G	T	G	T	G	C	G	T	G	T	G	C	G	G	-	-	-

T.gal01	G	G	G	T	T	T	T	T	T	G	A	G	A	T	A	C	G	T	C	C	C	A	A	A	A	A	G	C	A	A	G	A	A	A	A	A
T.gal03	G	G	G	T	T	T	T	T	T	G	A	G	A	T	A	C	G	T	C	C	C	A	A	A	A	A	G	C	A	A	G	A	A	A	A	A
T.gal02	G	G	G	T	T	T	T	T	T	G	A	G	A	T	A	C	G	T	C	C	C	A	A	A	A	A	G	C	A	A	G	A	A	A	A	A
T.man01	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	A	-	-	-	T	A	T	C	C	C	A	A	A	A	A	G	C	A	A	G	A	A	A	A	A	A
T.mar02	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	T	A	T	A	T	C	C	C	A	A	A	A	A	G	C	A	A	G	A	A	A	A	A
T.mar03	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	T	A	T	A	T	C	C	C	A	A	A	A	A	G	C	A	A	G	A	A	A	A	A
T.mar01	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	T	A	T	A	T	C	C	C	A	A	A	A	A	G	C	A	A	G	A	A	A	A	A
T.pret03	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	C	-	-	-	-	-	-	-	C	A	T	C	C	C	A	A	A	A	C	C	A	A	G	A	A	A
T.pret02	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	A	-	-	-	-	-	-	-	C	A	T	C	C	C	A	A	A	A	G	C	A	A	G	A	A	A
T.pret10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	A	-	-	-	-	-	-	-	C	A	T	C	C	C	A	A	A	A	G	C	A	A	G	A	A	A
T.pret01	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	A	-	-	-	-	-	-	-	C	A	T	C	C	C	A	A	A	A	G	C	A	A	G	A	A	A
T.pret09	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	A	-	-	-	-	-	-	-	C	A	T	C	C	C	A	A	A	A	G	C	A	A	G	A	A	A
T.pret04	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	A	-	-	-	-	-	-	-	C	A	T	C	C	C	A	A	A	A	G	C	A	A	G	A	A	A
T.pret05	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	A	-	-	-	-	-	-	-	C	A	T	C	C	C	A	A	A	A	G	C	A	A	G	A	A	A
T.pre06	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	A	-	-	-	-	-	-	-	C	A	T	C	C	C	A	A	A	A	G	C	A	A	G	A	A	A
T.pret09	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	A	-	-	-	-	-	-	-	C	A	T	C	C	C	A	A	A	A	G	C	A	A	G	A	A	A
T.sp01	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	A	-	-	-	-	-	-	-	C	A	T	C	C	C	A	A	A	A	G	C	A	A	G	A	A	A



Continuação

T.gal01	G	C	A	G	C	G	G	A	C	C	G	A	G	C	T	A	G	A	A	C	A	C	G	A	T	C	G	C	T	T	C	C	G	A	T	T	C
T.gal03	G	C	A	G	C	G	G	A	C	C	G	A	G	C	T	A	G	A	A	C	A	C	G	A	T	C	G	C	T	T	C	C	G	A	T	T	C
T.gal02	G	C	A	G	C	G	G	A	C	C	G	A	G	C	T	A	G	A	A	C	A	C	G	A	T	C	G	C	T	T	C	C	G	A	T	T	C
T.man01	G	C	A	G	C	G	G	A	C	C	G	A	T	C	T	A	G	C	A	C	A	C	G	A	T	C	G	C	T	T	C	C	G	A	T	T	C
T.mar02	G	C	A	G	C	G	G	A	C	C	G	A	T	C	T	A	G	C	A	C	A	C	G	A	T	C	G	C	T	-	-	-	-	-	-	-	
T.mar03	G	C	A	G	C	G	G	A	C	C	G	A	T	C	T	A	G	C	A	C	A	C	G	A	T	C	G	C	T	T	C	C	G	T	T	A	C
T.mar01	G	C	A	G	C	G	G	A	C	C	G	A	T	C	T	A	G	C	A	C	A	C	G	A	T	C	G	C	T	T	C	C	G	T	T	A	C
T.pret03	G	C	A	G	C	G	G	C	C	C	G	A	G	C	C	A	G	T	C	C	A	C	G	A	T	C	G	T	T	T	C	C	G	A	T	T	C
T.pret02	G	C	A	G	C	G	G	A	C	C	G	A	G	T	C	A	G	T	A	C	A	C	G	A	T	C	G	C	T	T	C	C	G	A	T	T	C
T.pret10	G	C	A	G	C	G	G	A	C	C	G	A	G	T	C	A	G	T	A	C	A	C	G	A	T	C	G	C	T	T	C	C	G	A	T	T	C
T.pret01	G	C	A	G	C	G	G	A	C	C	G	A	G	T	C	A	G	T	A	C	A	C	G	A	T	C	G	C	T	T	C	C	G	A	T	T	C
T.pret09	G	C	A	G	C	G	G	A	C	C	G	A	G	T	C	A	G	T	A	C	A	C	G	A	T	C	G	C	T	T	C	C	G	A	T	T	C
T.pret04	G	C	A	G	C	G	G	A	C	C	G	A	G	T	C	A	G	T	A	C	A	C	G	A	T	C	G	C	T	T	C	C	G	A	T	T	C
T.pret05	G	C	A	G	C	G	G	A	C	C	G	A	G	T	C	A	G	T	A	C	A	C	G	A	T	C	G	C	T	T	C	C	G	A	T	T	C
T.pre06	G	C	A	G	C	G	G	A	C	C	G	A	G	T	C	A	G	T	A	C	A	C	G	A	T	C	G	C	T	T	C	C	G	A	T	T	C
T.pret09	G	C	A	G	C	G	G	A	C	C	G	A	G	T	C	A	G	T	A	C	A	C	G	A	T	C	G	C	T	T	C	C	G	A	T	T	C
T.sp01	G	C	A	G	C	G	G	A	C	C	G	A	G	T	C	A	G	T	A	C	A	C	G	A	T	C	G	C	T	T	C	C	G	A	T	T	C

\* \* \*

T.gal01	T	-	T	T	C	G	A	-	A	C	G	C	G	C	G	C	-	G	C	C	C	G	T	T	G	C	T	A	-	T	T	G	-	A	A	A	A
T.gal03	T	-	T	T	C	G	A	-	A	C	G	C	G	C	G	C	C	C	C	C	C	C	T	G	G	G	T	A	-	T	T	G	-	A	A	A	A
T.gal02	T	-	T	T	C	G	A	-	A	C	G	C	G	C	G	C	-	G	C	C	C	G	T	T	G	C	T	A	-	T	T	G	-	A	A	A	A
T.man01	T	-	T	T	C	G	-	A	A	C	G	C	G	C	G	C	-	G	C	C	C	G	G	T	-	-	T	A	-	T	T	A	T	A	A	A	T
T.mar02	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
T.mar03	T	-	T	T	C	G	A	C	G	C	G	C	G	C	G	C	-	G	C	C	C	G	G	T	T	G	T	G	T	T	G	G	T	G	G	A	A
T.mar01	T	-	T	T	C	G	A	C	G	C	G	C	G	C	G	C	-	G	C	C	C	G	G	T	T	G	T	G	T	T	G	G	T	G	G	A	A
T.pret03	T	C	C	C	T	G	A	A	A	C	G	C	G	C	G	C	-	G	C	C	C	-	-	C	-	-	T	A	T	T	T	A	T	A	-	C	T
T.pret02	T	A	C	C	T	A	A	A	A	C	G	C	G	C	G	C	-	G	C	C	C	-	-	C	-	-	T	A	T	T	T	A	T	A	G	C	T
T.pret10	T	A	C	C	T	A	A	A	A	C	G	C	G	C	G	C	-	G	C	C	C	-	-	C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
T.pret01	T	A	C	C	T	A	A	A	A	C	G	C	G	C	G	C	-	G	C	C	C	-	-	C	-	-	T	A	T	T	T	A	T	A	-	C	T
T.pret09	T	A	C	C	T	A	A	A	A	C	G	C	G	C	G	C	-	G	C	C	C	-	-	C	-	-	T	A	T	T	T	A	T	A	G	C	T
T.pret04	T	A	C	C	T	A	A	A	A	C	G	C	G	C	G	C	-	G	C	C	C	-	-	C	-	-	T	A	T	T	T	A	T	A	G	C	T
T.pret05	T	A	C	C	T	A	A	A	A	C	G	C	G	C	G	C	-	G	C	C	C	-	-	C	-	-	T	A	T	T	T	A	T	A	G	C	T
T.pre06	T	A	C	C	T	A	A	A	A	C	G	C	G	C	G	C	-	G	C	C	C	-	-	C	-	-	T	A	T	T	T	A	T	A	G	C	T
T.pret09	T	A	C	C	T	A	A	A	A	C	G	C	G	C	G	C	-	G	C	C	C	-	-	C	-	-	T	A	T	T	T	A	T	A	G	C	T
T.sp01	T	A	C	C	T	A	A	A	A	C	G	C	G	C	G	C	-	G	C	C	C	-	-	C	-	-	T	A	T	T	T	A	T	A	G	C	T

T.gal01	-	-	A	A	A	T	T	T	C	C	A	T	T	T	G	T	G	A	T	-	-	T	T	C	T	T	T	T	T	C	G	A	C	A	C	C	T
T.gal03	-	-	A	A	A	T	T	T	C	A	A	T	T	T	G	T	G	A	T	-	-	T	T	T	C	T	T	T	-	-	-	-	-	-	-	-	-
T.gal02	-	-	A	A	A	T	T	T	C	C	A	T	T	T	G	T	G	A	T	-	-	T	T	C	T	T	T	T	T	C	G	A	C	A	C	C	T
T.man01	T	G	G	G	G	C	A	T	C	A	A	T	-	T	G	C	G	A	T	-	-	T	T	T	T	T	-	T	T	C	G	A	C	A	C	C	T
T.mar02	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
T.mar03	C	G	A	C	A	A	C	A	C	A	C	A	C	A	A	A	C	A	T	A	G	C	T	C	G	G	A	T	C	G	A	A	T	A	G	A	G
T.mar01	C	G	A	C	A	A	C	A	C	A	C	A	C	A	A	A	C	A	T	A	G	C	T	C	G	G	A	T	C	G	A	A	T	A	G	A	G
T.pret03	-	-	-	G	G	T	A	T	C	-	A	A	-	A	A	A	C	A	C	-	-	T	T	T	T	T	-	T	T	C	G	A	C	A	C	C	T
T.pret02	-	-	-	G	G	T	A	T	C	-	A	A	-	A	A	A	C	A	C	-	-	T	T	T	T	T	-	T	T	C	G	A	C	A	C	C	T
T.pret10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
T.pret01	-	-	-	G	G	T	A	T	C	-	A	A	-	A	A	A	C	A	C	-	-	T	T	T	T	T	-	T	T	C	G	A	C	A	C	C	T
T.pret09	-	-	-	G	G	T	A	T	C	-	A	A	-	A	A	A	C	A	C	-	-	T	T	T	T	T	-	T	T	C	G	A	C	A	C	C	T
T.pret04	-	-	-	G	G	T	A	T	C	-	A	A	-	A	A	A	C	A	C	-	-	T	T	T	T	T	-	T	T	C	G	A	C	A	C	C	T
T.pret05	-	-	-	G	G	T	A	T	C	-	A	A	-	A	A	A	C	A	C	-	-	T	T	T	T	T	-	T	T	C	G	A	-	-	-	-	-
T.pre06	-	-	-	G	G	T	A	T	C	-	A	A	-	A	A	A	C	A	C	-	-	T	T	T	T	T	-	T	T	C	G	A	-	-	-	-	-
T.pret09	-	-	-	G	G	T	A	T	C	-	A	A	-	A	A	A	C	A	C	-	-	T	T	T	T	T	-	T	T	C	G	A	C	A	C	C	T
T.sp01	-	-	-	G	G	T	A	T	C	-	A	A	-	A	A	A	C	A	C	-	-	T	T	T	T	T	-	T	T	C	G	A	C	A	C	C	T



## Continuação

T.gal01	C	A	G	C	G	G	A	A	G	C	-	-	-	-	-	-
T.gal03	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
T.gal02	C	A	G	C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
T.man01	C	A	G	C	G	G	C	A	A	-	-	-	-	-	-	-
T.mar02	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
T.mar03	T	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
T.mar01	T	A	C	C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
T.pret03	C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
T.pret02	C	A	G	C	G	G	C	A	A	A	C	A	A	A	-	-
T.pret10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
T.pret01	C	A	G	C	G	G	C	A	A	-	-	-	-	-	-	-
T.pret09	C	A	G	A	G	G	C	A	A	-	-	-	-	-	-	-
T.pret04	C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
T.pret05	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
T.pret06	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
T.pret09	C	A	G	C	G	G	C	A	A	A	C	A	A	A	A	A
T.sp01	C	A	G	C	G	G	C	A	A	A	-	-	-	-	-	-

\* representa os sítios com variações em uma única base; Cor rosa: sítios variando em todas as espécies; Cor verde: sítios em que variam apenas para uma das espécies.