

SCIENTIFIC NOTE

Detecção de *Wolbachia* em uma População Telítoca de *Trichogramma atopovirilia* Oatman & Platner (Hymenoptera: Trichogrammatidae) via PCR com o *Primer* Específico *wsp*

AMÉRICO I. CIOCIOLA JR.¹, RAUL P. DE ALMEIDA², ROBERTO A. ZUCCHI¹ E RICHARD STOUTHAMER³

¹Depto. de Entomologia, Fitopatologia e Zoologia Agrícola, ESALQ/USP
Caixa Postal 9, 13418-900, Piracicaba, SP

²Embrapa Algodão, Caixa Postal 174, 58107-720, Campina Grande, PB

³Dept. of Entomology, Wageningen University, P.O. Box 8031, 6700EH, Wageningen, The Netherlands

Neotropical Entomology 30(3): 489-491 (2001)

Detection of *Wolbachia* in a Thelytokous Population of *Trichogramma atopovirilia* Oatman & Platner (Hymenoptera: Trichogrammatidae) Using PCR with the *wsp* Specific Primer

ABSTRACT - For the first time in Brazil, *Wolbachia* was detected in *Trichogramma* using PCR with the *wsp* specific primer. A *Trichogramma atopovirilia* Oatman & Platner population was collected in *Helicoverpa zea* Boddie (Lepidoptera: Noctuidae) eggs at Embrapa/Sete Lagoas. The results showed that the amplification of DNA bands, confirms the presence of *Wolbachia* on the analysed population. The presence of this α -proteobacteria will contribute for the correct choice on which population will be used for applied biological control programs against lepidopterous pests.

KEY WORDS: Insecta, sex ratio, biological control, bacteria, parasitoid.

RESUMO - Identificou-se pela primeira vez no Brasil a presença de *Wolbachia* em *Trichogramma* através de um PCR com o *primer* específico *wsp*. A população de *Trichogramma atopovirilia* Oatman & Platner foi coletada na Embrapa Milho e Sorgo, em ovos de *Helicoverpa zea* Boddie (Lepidoptera: Noctuidae). Os resultados mostraram através da amplificação de bandas de DNA, a confirmação da presença de *Wolbachia* na população em estudo. A presença dessa α -proteobactéria irá contribuir para a escolha da população correta a ser utilizada em programas de controle biológico aplicado contra lepidópteros pragas.

PALAVRAS-CHAVE: Insecta, razão sexual, controle biológico, bactéria, parasitóide.

Parasitóides do gênero *Trichogramma* Westwood (Hymenoptera: Trichogrammatidae) são os mais utilizados no mundo no controle de insetos pragas (Parra 1997). Para a correta utilização deste parasitóide, além da identificação taxonômica, que é o alicerce do controle biológico de pragas, é importante saber o seu modo de reprodução. Estes parasitóides podem se reproduzir sexualmente, originando machos e fêmeas ou via partenogênese telítoca, onde são produzidos apenas fêmeas. De acordo com Stouthamer *et al.* (1990), bactérias do gênero *Wolbachia* são capazes de reverter o sexo, fazendo com que os descendentes reproduzam-se por partenogênese telítoca. Esta descoberta foi de grande valia, visto que as fêmeas de parasitóides são de fundamental importância no controle biológico. Esse microorganismo, além de alterar a razão sexual, pode causar incompatibilidade citoplasmática unidirecional e/ou bidirecional em ácaros (Breeuwer 1997, Opijnen & Breeuwer 1999) e efeminação em crustáceos (Meer 1999).

Em programas de controle biológico, utilizando-se uma

população telítoca, várias vantagens são apresentadas em relação à população arrenótoca (Stouthamer 1993): 1) crescimento mais rápido da população telítoca; 2) redução dos custos de produção pois não há produção de machos; 3) fácil estabelecimento no campo pois não há necessidade de cópula, e além disto a população pode reproduzir-se eficientemente em densidade baixa do hospedeiro.

Para constatar a presença de *Wolbachia*, pode-se dissecar ovos do hospedeiro recém-parasitados e usar corantes para facilitar a visualização (Stouthamer & Werren 1993) ou utilizar a técnica de biologia molecular denominada reação de polimerase em cadeia (PCR), onde utilizam-se *primers* específicos para a amplificação do DNA dessa α -proteobactéria (Meer *et al.* 1999, Braig *et al.* 1998).

O presente trabalho teve como objetivo detectar via PCR a presença de *Wolbachia* em uma população telítoca de *Trichogramma atopovirilia* Oatman & Platner utilizando-se *primers* específicos para esta α -proteobactéria.

Para a detecção de *Wolbachia*, utilizou-se uma população

de *T. atopovirilia* coletada em ovos de *Helicoverpa zea* Boddie (Lepidoptera: Noctuidae), na Embrapa Milho e Sorgo. No controle negativo (Branco) utilizou-se água no lugar do DNA. Previamente a este trabalho, para se ter certeza de que a população de *T. atopovirilia* era telítoca, 10 fêmeas foram individualizadas em tubos de ensaio e acondicionadas em ambiente controlado. Ofertaram-se ovos de *Anagasta kuehniella* Zeller para o parasitismo. Verificou-se que todos os descendentes das 10 fêmeas eram fêmeas, confirmando assim a telitoquia. Os procedimentos de extração de DNA, PCR e eletroforese de fragmentos de DNA foram conduzidos no Laboratório de Biologia Molecular do Departamento de Entomologia da Universidade de Wageningen, na Holanda. Utilizou-se uma população de *T. pretiosum* originária do México (coleção do Departamento de Entomologia de Wageningen, Holanda), contendo *Wolbachia* e uma população de *T. galloi* originária do Departamento de Entomologia da ESALQ/USP, como controle negativo.

Extraíu-se o DNA, macerando-se cinco indivíduos em tubos *ependorf* (0,5 µl), juntamente com 100 µl de Chelex 5% e 4 µl de proteinase K, sendo a seguir incubados a 56°C por 6h em banho-maria, e após, 10' a 95°C. O "mix" para PCR foi preparado com 5 µl da amostra.

As região *wsp* do DNA de *Wolbachia* foi amplificada respectivamente com os *primers wsp*-81F e 691R (Braig et al. 1998). Utilizou-se o seguinte programa de PCR para o *primer wsp*-81: 94°C por 3' (1 ciclo), 94°C por 1', 50°C por 1' e 72°C por 1' (40 ciclos) e 72°C por 5' (1 ciclo). Foi constatada, utilizando-se os *primers wsp* (Braig et al. 1998), a presença de *Wolbachia* em *T. atopovirilia* via amplificação de bandas de DNA em gel de agarose (Fig. 1). Este é o primeiro registro de *Wolbachia* no Brasil e também da utilização da técnica de PCR com o objetivo de detectar essa α -proteobactéria em uma espécie brasileira de *Trichogramma*.

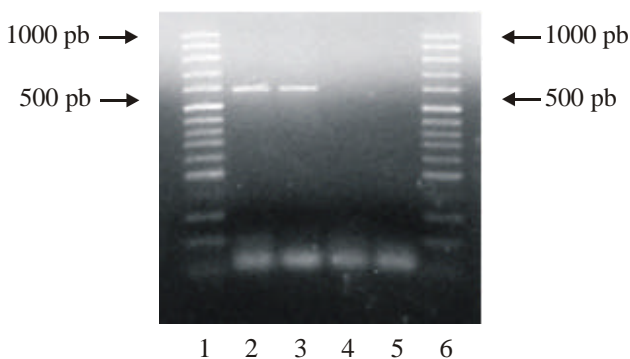


Figura 1. Amplificação de DNA de *Trichogramma* em gel de agarose. Linhas 1 e 6: marcadores moleculares; linha 2: *T. pretiosum* - controle positivo, originário do México; linha 3: *T. atopovirilia*, Embrapa Milho e Sorgo; linha 4: *T. galloi* - controle negativo, ESALQ/USP; linha 5: Branco (água no lugar do DNA).
pb = pares de bases.

Segundo Prezotti (com. pes.), essa mesma população de *T. atopovirilia* originou machos na primeira geração, utilizando-se Tetrex 500 (tetraciclina) na base de 100mg/ml de mel. Isso demonstra, que existe um microorganismo envolvido na mudança do modo de reprodução, identificado neste trabalho, como *Wolbachia*.

Meer (1999) mostrou que, comparando populações telítocas com sexuadas em casa-de-vegetação, a população com a presença de *Wolbachia* foi mais eficiente em relação ao número de ovos parasitados. Em contrapartida, a população sexuada apresentou maior dispersão. É importante ressaltar que para as condições climáticas de um país tropical, a presença de *Wolbachia* em *Trichogramma*, em temperaturas elevadas, faz com que populações inicialmente telítocas passem a ser sexuadas, pois essas α -proteobactérias não suportam calor. Um outro fator a ser considerado é que Meer (1999) trabalhou apenas em condições de laboratório e não em campo. Porém, como relatado anteriormente, foi constatada uma população brasileira com *Wolbachia*, mostrando a sua adaptação a regiões de temperaturas mais elevadas. Pintureau et al. (1999) estudaram o efeito de altas temperaturas e o tratamento com antibióticos em populações telítocas de *Trichogramma cordubensis* Vargas & Cabello. Esses autores, concluíram que existem potencialidades de adaptação dessas populações a altas temperaturas, o que explicaria em parte a distribuição desses simbiossitos entre diversas populações hospedeiras. Essa mesma adaptação pode estar ocorrendo com *Wolbachia* da população de *T. atopovirilia* coletada em Sete Lagoas, MG.

Pesquisas futuras devem ser realizadas com o objetivo de avaliar a biologia comparada de populações sexuadas de *Trichogramma* com populações telítocas (com e sem *Wolbachia*). De posse dos resultados, pode-se tomar a decisão correta da população a ser utilizada para liberações inundativas, visando o controle de lepidópteros pragas em agroecossistemas agrícolas.

Agradecimentos

A Geraldo Magela da Fonseca, Izaías T.B. Duarte e Dr. Ivan Cruz (Embrapa Milho e Sorgo), e Lusinério Prezotti (UNIVALE, MG) pelo envio da população telítoca de *T. atopovirilia*.

Literatura Citada

- Braig, H.R., W. Zhou, S. Dobson & S.L. O' Neill. 1998. Cloning and characterization of a gene encoding the major surface protein of the bacterial endosymbiont *Wolbachia*. *J. Bacteriol.* 180: 2373-2378.
- Breeuwer, J.A.J. 1997. *Wolbachia* and cytoplasmic incompatibility in the spider mites *Tetranychus urticae* and *T. turkestanii*. *Heredity* 79: 41-47.
- Meer, M.M.M. van. 1999. Phylogeny and host interactions of thelytoky inducing *Wolbachia* in Hymenoptera-Wageningen Agricultural University. Wageningen. 118p. Thesis (PhD).
- Meer, M.M.M van, J. Witteveldt & R. Stouthamer. 1999. Phylogeny of the arthropod endosymbiont *Wolbachia*

- based on the *wsp* gene. *Insect Molec. Biol.* 8: 399-408.
- Opijnen, T. van & J.A.J. Breeuwer. 1999.** High temperatures eliminate *Wolbachia*, a cytoplasmic incompatibility inducing endosymbiont, from the two-spotted spider mite. *Exp. and Appl. Acarology* 23: 871-881.
- Parra, J.R.P. 1997.** Técnicas de criação de *Anagasta kuehniella*, hospedeiro alternativo para produção de *Trichogramma*, p.121-150. In: Parra, J.R.P. & R.A. Zucchi (eds.) *Trichogramma e o Controle Biológico Aplicado*. Piracicaba, FEALQ. 324p.
- Pinto, J.D. & R. Stouthamer. 1994.** Systematics of the Trichogrammatidae with emphasis on *Trichogramma*, p.1-36. In: Wajnberg, E. & S.A. Hassan (eds.) *Biological Control with Egg Parasitoids*. Oxon, UK: CAB Internacional. 285p.
- Pintureau, B., L. Chapelle & B. Delobel. 1999.** Effects of repeated thermic and antibiotic treatments on a *Trichogramma* (Hym., Trichogrammatidae) symbiont. *J. Appl. Entomol.* 123: 473-483.
- Stouthamer, R. 1993.** The use of sexual versus asexual wasps in biological control. *Entomophaga* 38: 3-6.
- Stouthamer, R. & J.H. Werren. 1993.** Microbes associated with parthenogenesis in wasps of the genus *Trichogramma*. *J. Invert. Pathol.* 61: 6-9.
- Stouthamer, R., R.F. Luck & W.D. Hamilton. 1990.** Antibiotics cause parthenogenetic *Trichogramma* to revert to sex. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 87: 2424-2427.

Received 25/VIII/00. Accepted 25/VII/01.
