

Determinação da Variabilidade Intra-Específica e Diferenciação de Espécies de Parasitóides e Fungos Entomopatogênicos

MARGONAR, D.^{1,2,3}; SOSA-GÓMEZ, D.R.³; SILVA, J.J.³; CORRÊA-FERREIRA, B.S.³; ¹Bolsista do CNPq; ²Centro Universitário Filadélfia – UNIFIL, CEP 86020-000, Londrina-PR, danimargonar@gmail.com; ³Embrapa Soja.

Introdução

Nas diversas regiões produtoras de soja do país, os percevejos, juntamente com as lagartas-desfolhadoras, constituem os dois principais grupos de pragas que normalmente causam prejuízos econômicos às lavouras (Gazzoni et al, 1994). Entre os inimigos naturais dessas espécies, os parasitóides de ovos têm sido considerados os mais importantes agentes de mortalidade natural dessas pragas (Peres & Corrêa-Ferreira, 2004). Considerando as populações de lagartas desfolhadoras (*Anticarsia gemmatalis* Hub. e *Pseudoplusia includens* (Walker)) e os escarabeídeos (*Phyllophaga* sp.), os grupos mais importantes de controle natural são os fungos entomopatogênicos (*Nomuraea rileyi* e *Metarhizium anisopliae*). A variabilidade intraespecífica desses agentes de controle natural é conhecida, mas as técnicas utilizadas para aferi-las apresentam reduzida confiabilidade e repetibilidade, portanto, a finalidade deste trabalho foi determinar a variabilidade intraespecífica de parasitóides de percevejos e dos fungos entomopatogênicos para diferenciar suas espécies, assim como seus genótipos, utilizando regiões da subunidade I do gene da citocromoxidase dos parasitóides, *Trissolcus basalís* (Woll.) e *Hexacladia smithi* Ashmead e as regiões espaçadoras intergênicas (Intergenic Spacer, IGS) próximas da subunidade 28S do RNA ribossômico de *N. rileyi* e *M. anisopliae*.

Material e Métodos

Para se determinar a variabilidade de fungos foram utilizadas as espécies *N. rileyi*, *M. anisopliae*, *M. cylindrospora* e *M. viridulus* cultivadas em meios de cultura líquidos (caldo de 200 g de batata e dextrose 15 g para 1000 ml de água para as espécies de *Metarhizium* e 10 g de neopeptona, 40 g de maltose e 10 g de extrato de levedura em 1000 ml de água para *N. rileyi*). O micélio foi filtrado, secado e seu DNA extraído, segundo o protocolo de ROGER & BENDICH (1988). As espécies de parasitóides utilizadas foram *T. basalis* e *H. smithi*, armazenadas em recipientes lacrados com sílica gel. As amostras das populações de *T. basalis* foram obtidas da sala de criação de parasitóides da Embrapa Soja. Os fungos foram obtidos da micoteca da Embrapa Soja (Sosa-Gomez & Silva, 2002). Após as extrações de DNA dos insetos, em que foi utilizado o protocolo da Biorad (2007), foram realizadas amplificações com os primers J-1514 (5´-GGT CAACAAATCATAAAGATATTGG-3´) e N-2175 (5´-TAAACTTCAGGGTGACCAA AAAATCA-3´). As amplificações dos fungos foram realizadas utilizando combinações dos primers desenvolvidos por PANTOU et al. (2003), no intuito de se obter quantidade suficiente de DNA para sequenciamento. Para purificar o DNA amplificado foi utilizado o kit de purificação da PureLink Quick Gel Extraction Kit (Invitrogen, 2005). Em seguida, foi realizada a clonagem por meio do kit pGEM-T da Promega (Promega, 2007). As amostras clonadas foram amplificadas para sequenciamento utilizando-se o Kit Dye Terminator V3.1 Applied Biosystems e sequenciadas em sequenciador ABI 3100 Applied Biosystems.

Resultados

Os primers J-1514 e N-2175 apresentaram amplificação adequada do fragmento da subunidade I do gene da citocromoxidase de *T. basalis* e *H. smithii*, porém nas amostras desta última espécie foram observadas bandas duplas indicando amplificação não específica (Fig.1). Foram obtidas sequências de 20 amostras de *T. basalis*, provenientes da

Argentina, Louisiana e Flórida, Estados Unidos e de Londrina, PR, com tamanhos variando entre 663 e 697 pares de base (pb). A seqüência de maior comprimento de *T. basalis* proveniente da Louisiana está representada na Fig. 2. A comparação das sequências indica pouca variabilidade intraespecífica, a única diferença foi observada na posição 673 da seqüência de maior comprimento, onde houve a substituição de T por G. Essa reduzida variabilidade pode ser devido à falta de variabilidade intrínseca da espécie ou a contaminação das colônias de *T. basalis* por indivíduos de populações locais. A falta de variabilidade dessa região mitocondrial tem sido observada para outras populações de *T. basalis* provenientes da Califórnia, Geórgia (Estados Unidos) e Itália (Walker Jones, USDA, comunicação pessoal). Portanto, a possibilidade de reduzida variabilidade intrínseca desta espécie é mais plausível.

As sequências correspondentes à parte da região IGS e da subunidade 28S de *N. rileyi* e *Metarhizum* spp. não apresentaram boa qualidade. Os maiores fragmentos obtidos para a espécie *N. rileyi* tiveram 255 pb (Fig. 3).

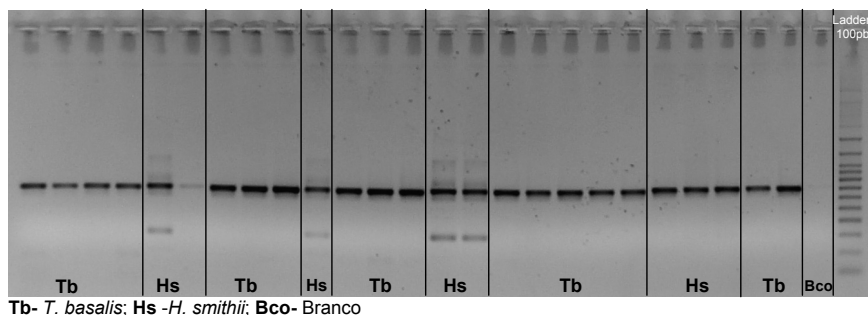


Fig. 1. Amplificação do DNA de Tb e Hs com os *primers* J-1514 e N-2175.

> *Trissolcus basal*s-1 Louisiana_
 USATTAACCTTCAGGGGGGACCAAAAATCAAAAAGATGTTGGTAGAGAACTGGGTC
 TCCTCCTCCTCCAGGATTAATAAATGATGTATTTAAATTTCCGATCTGATAAAATTATTG
 TAATAGCTCCAGCTAAAACCTGGTAATGATAATAATAAAAGAATTGTAGTAATTAATAC
 TGATCAGGTAATAACGTTCAATTTTATTGAACAATTTCTATATTTAAGATTGTGC
 AAAAAAATTAATTGAACCTAAGATTGATGAAATTCCTGCAATATGAAGGAAAAAAT
 GTTAGATCAATAGAAGGATTTAATTGAGTAGAAAGAGGAGGATAAATTGTTTCATCCT
 GTTCCTGTTCTGAACCAAAAATATTTCTGTAAATTAATAAGATTAAGAAGGAATTA
 ATAATCAAAATCTTATATTTAATCGGGGAAATGCTATATCAGGGGCATTAATTATT
 AATGGAACATAATCAATTTCCAATCCTCCAATTATGATTGGTATAACTATAAAAAAAT
 TATAATAAAAGCATGTGAAGTAACAATTGAATTATAAATTTGATCATTTCCAATTAGTA
 TTCTGGGATTCTTAATTTCTATTCGAATTAATACTTATTGCGGATCCTAATATTCCT
 GCTCAGATTCCAAAGTAAAAATATAATGTTCCAATATCTTTAGGAATTTGTTGACCA

Fig. 2. Sequência parcial do gene mitocondrial da subunidade I da citocromoxidase de *Trissolcus basal*s proveniente de Louisiana, Estados Unidos.

> *Nomuraea rileyi*
 456_28S4GGGCGGGCAGCACGAATGGGTCAGCATCCGAAACTTGATCATAACTTGT
 AGCGCACATTGCCAGAGAAAACCGCATTTGATACGGTGACTTCTTTCTAGCCTTGTT
 CGAATTAGCAAGTTATGGGGTAGCTCGGCATGGATTAATTACTCTCCGGCTCAGAA
 GCTGAATCACAATAAGCGCCCAATGTTTCCAATTAGGCACCAGCTCCCCAGTAAC
 TGCAACCTTCTGGCCAATGACAATCAATGATTGGTG

Fig. 3. Sequência parcial do gene da subunidade ribossômica 28S de *N. rileyi* isolada da lagarta-da-soja, *Anticarsia gemmatilis*, na região de Londrina, PR em 28/Jan/2003.

Conclusão

Foram observados seis sítios variáveis na comparação de sete sequências de tamanho aproximado de 160 pb. No caso de *Metarhizium* foram menores de 123 pb. O número de sequências e o tamanho dos fragmentos obtidos foram inadequados para análise. O protocolo de extração de DNA Instagene Matrix foi eficiente para as extrações de DNA de insetos pequenos como *T. basal*s e *H. smithii*. O gene da citocromoxidase não foi apropriado para estudos de variabilidade intraespecífica de *T. basal*s. Considerando a variabilidade observada os estudos das regiões IGS apresentam potencial para diagnóstico de genótipos de isolados das *M. anisopliae* e *N. rileyi*.

Referências

BIORAD. Nucleic Acid Purification. Instagene™ Matrix and Kits. Chelex 100® (BioRad), InstaGene® Bulletin 2074. Disponível em:

<http://www.bio-rad.com/LifeScience/pdf/Bulletin_2074.pdf>. Acesso em 03 abr. 2007.

GAZZONI, D.L.; SOSA-GOMEZ, D.R.; MOSCARDI, F.; HOFFMANN-CAMPO, C.B.; CORRÊA-FERREIRA, B.S.; OLIVEIRA, L.J.; CORSO, I.C. Insects. In: EMBRAPA. Centro Nacional de Pesquisa de Soja. Tropical soybean: improvement and production. Rome: FAO, 1994. p. 81-108. (FAO Plant Production and Protection Series, 27).

INVITROGEN PureLink™ Quick Gel Extraction Kit. Catalog no.. K2100-12. Version B. 14 p. March, 2005.

PANTOU, M.; MAVRIDOU, A.; TYPAS, M. IGS sequence variation, group-I introns and the complete nuclear ribosomal DNA of the entomopathogenic fungus *Metarhizium*: excellent tools for isolate detection and phylogenetic analysis. Fungal Genetics and Biology. v.38, p159–174, 2003.

PERES, W.A.A.; CORRÊA-FERREIRA, B.S. Methodology of mass multiplication of *Telenomus podisi* Ash. and *Trissolcus basalís* (Woll.)(Hymenoptera: Scelionidae) on eggs of *Euschistus heros* (Fab.) (Hemiptera: Pentatomidae). Neotropical Entomology, Londrina. v. 33, n. 4, p. 457-62, 2004.

PROMEGA. pGEM®-T and pGEM®-T Easy Vector Systems. Technical manual. 29p. Disponível em: < <http://www.promega.com/tbs/tm042/tm042.html>>. Acesso em 21 ago. 2007.

ROGERS, S.O.; BENDICH, A.J. Extraction of DNA from plant tissues. In: GELVIN, S.B.; SCHILPEROORT, R.A. (Ed.). Plant molecular biology manual. Dordrecht: Kluwer Academic Publisher, 1988. p.1-10.

SOSA-GÓMEZ, D.R.; SILVA, J.J. (Org.). Fungos entomopatogênicos: catálogos de isolados. Londrina: Embrapa Soja, 2002. 32 p. Embrapa Soja. Documentos, 188.