

Campina Grande, PB / Novembro, 2024

Utilização da biologia molecular  
na identificação de espécies de  
*Trichogramma* (Hymenoptera:  
Trichogrammatidae)

OBJETIVOS DE  
DESENVOLVIMENTO  
SUSTENTÁVEL



***Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária  
Embrapa Algodão  
Ministério da Agricultura e Pecuária***

ISSN 0103-0205 / e-ISSN 2966-0343

# ***Documentos 299***

Novembro, 2024

Utilização da biologia molecular na  
identificação de espécies de *Trichogramma*  
(Hymenoptera: Trichogrammatidae)

*Raul Porfirio de Almeida*

***Embrapa Algodão  
Campina Grande, PB  
2024***

### **Embrapa Algodão**

Rua Osvaldo Cruz, 1.143, Centenário  
58428-095, Campina Grande, PB  
www.embrapa.br/algodao  
www.embrapa.br/fale-conosco/sac

#### **Comitê Local de Publicações**

##### **Presidente**

*Daniel da Silva Ferreira*

##### **Secretária-executiva**

*Magna Maria Macedo Nunes Costa*

##### **Membros**

*Joao Henrique Zonta*

*Lucia Vieira Hoffmann*

*Roseane Cavalcanti dos Santos*

*Ziany Neiva Brandão*

#### **Edição executiva**

*Geraldo Fernandes de Sousa Filho*

#### **Revisão de texto**

*Marcela Bravo Esteves*

#### **Normalização bibliográfica**

*Enyomara Lourenço Silva*

#### **Projeto gráfico**

*Leandro Sousa Fazio*

#### **Diagramação**

*Geraldo Fernandes de Sousa Filho*

#### **Foto da capa**

*José Geraldo di Stefano*

#### **Publicação digital: PDF**

### **Todos os direitos reservados**

A reprodução não autorizada desta publicação, no todo ou em parte,  
constitui violação dos direitos autorais (Lei nº 9.610).

### **Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)**

Embrapa Algodão

---

Almeida, Raul Porfírio de.

Utilização da biologia molecular na identificação de espécies de *Trichogramma*  
(Hymenoptera: Trichogrammatidae) / Raul Porfírio de Almeida. – Campina Grande :  
Embrapa Algodão, 2024.

PDF (39 p.) : il. – (Documentos / Embrapa Algodão, e-ISSN 2966-0343 ; 299)

1. Inimigo natural. 2. Inseto. 3. Praga. 4. Controle biológico. I. Título. II. Série.

CDD (21. ed.) 632.96

---

*Enyomara Lourenço Silva* (CRB-4/1569)

© 2024 Embrapa

# Autor

---

## **Raul Porfirio de Almeida**

Engenheiro-agrônomo, Ph.D. em Production Ecology and Resource Conservation, pesquisador da Embrapa Algodão, Campina Grande, PB



# Apresentação

---

A identificação das espécies é de fundamental importância seja qual for o ramo da ciência que envolva estudos biológicos. Com a correta classificação taxonômica dos organismos, as múltiplas questões são direcionadas adequadamente para solucionar problemas no contexto da agropecuária, com ênfase para as pragas e para os inimigos naturais. Neste caso, destacam-se as espécies do gênero *Trichogramma*, um dos parasitoides de ovos de lepidópteros mais estudados e utilizados em todo mundo.

Entretanto, até a determinação de ferramentas eficientes para dirimir os problemas taxonômicos, um percurso muito longo se passou, sendo os primeiros avanços alcançados cerca de 150 anos após a descoberta da espécie *T. evanescens* — Westwood, 1833 —, com base no estudo da genitália dos machos para identificação das espécies de *Trichogramma*.

Apesar do grande avanço, nem todas as espécies foram identificadas, principalmente devido a fator genético nuclear desconhecido ou a infecção por organismo simbiote do gênero *Wolbachia*, impossibilitando a descendência de indivíduos machos, isto é, únicos indivíduos possíveis de serem identificados pela sistemática morfométrica.

Aproximadamente duas décadas depois, a biologia molecular despontou nos estudos com *Trichogramma*, reconhecendo as espécies via sequenciamento molecular, independentemente da extração do DNA ser com a utilização de indivíduos machos ou fêmeas.

Este documento traz informações orientadoras e esclarecedoras para todos que desejam se utilizar da biologia molecular como ferramenta para identificação das espécies do gênero *Trichogramma*. Esta publicação está relacionada aos objetivos de desenvolvimento sustentável 12 (Consumo e produção responsáveis).

*Nair Helena Castro Arriel*  
Chefe-Geral da Embrapa Algodão



# Sumário

---

|                                                                                      |           |
|--------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>Introdução</b>                                                                    | <b>9</b>  |
| <b>Identificação de espécies de <i>Trichogramma</i></b>                              | <b>10</b> |
| <b>Análises moleculares na identificação de <i>Trichogramma</i></b>                  | <b>12</b> |
| <b>Espécies de <i>Trichogramma</i> identificadas via sequência do DNA ribossomal</b> | <b>16</b> |
| <b>Chaves moleculares e estudos filogenéticos com <i>Trichogramma</i> spp.</b>       | <b>20</b> |
| <b>Considerações finais</b>                                                          | <b>27</b> |
| <b>Referências</b>                                                                   | <b>27</b> |



## Introdução

Inimigos naturais da família Trichogrammatidae são liberados em todo o mundo contra um grande número de lepidópteros-praga, em vários sistemas produtivos, incluindo culturas anuais, pomares, florestas e produtos armazenados (Kot, 1964; Smith, 1994; Grenier, 1994; Li, 2004; Pinto, 2006; Querino; Zucchi, 2019).

Insetos do gênero *Trichogramma* são parasitoides exclusivos de ovos, principalmente de lepidópteros, cuja família consiste de aproximadamente 650 espécies descritas em 80 gêneros (Pinto, 1997). Esses insetos são parasitoides diminutos, com cerca de 0,7 mm, distribuídos mundialmente nas regiões paleártica, neártica, australiana, oriental, neotropical e afrotropical, contando com cerca de 235 espécies (Pinto; Stouthamer, 1994; Pinto, 1999, 2006).

Com exceção da Guiana Francesa e Suriname, todos os países da América do Sul registram a ocorrência de *Trichogramma*, totalizando 43 espécies. No Brasil, é encontrado o maior número, com pelo menos 29 espécies conhecidas (Zucchi; Monteiro, 1997; Silva, 2002; Querino; Zucchi, 2003a, 2003b; Querino; Zucchi, 2019).

Uma etapa fundamental que deve ser considerada antes da criação massal e comercialização é a correta identificação dos inimigos naturais (Hassan, 1995; Ivezić et al., 2018). Procedimentos padrões para comparação de espécies de *Trichogramma* candidatas para o controle biológico têm sido propostos (Hassan, 1994), visando à determinação de linhagens apropriadas e de qualidades conhecidas, antes que as liberações de campo sejam realizadas. Com as liberações, a efetividade de *Trichogramma* no campo depende grandemente de seu comportamento de procura, preferência pelo hospedeiro e tolerância às condições ambientais (Hassan, 1995).

A introdução de espécie de *Trichogramma* incorretamente identificada pode ser um real problema, caso o inseto-praga alvo para o controle biológico não esteja associado à suposta espécie do parasitoide (Almeida; Stouthamer, 2003). Outro problema pode ocorrer quando a espécie liberada for a mesma que uma espécie nativa

existente, supostamente mais adaptada e eficiente que a espécie introduzida nas condições do agroecossistema (Poorjavad et al., 2012). Além disso, caso a espécie nativa não esteja ainda registrada/identificada, se perderá a oportunidade de seu registro como espécie nativa (Almeida; Stouthamer, 2003).

Uma grande limitação nos estudos taxonômicos, associados à morfologia dos parasitoides, é que fêmeas de *Trichogramma* não são identificáveis, a menos que sejam associadas aos machos. Isso apresenta um problema particular para formas de reprodução totalmente partenogenéticas, na qual machos não estão presentes, isto é, formas partenogenéticas não reversíveis (Stouthamer et al., 1990b). A solução surgiu com a identificação de *Trichogramma* baseada na sequência do DNA do espaçador transcrito interno 2 (ITS2), proposto por Stouthamer et al. (1999b).

## Identificação de espécies de *Trichogramma*

A correta identificação de espécies é a primeira etapa de um programa de controle biológico bem-sucedido (Pinto; Stouthamer, 1994; Ercan et al., 2022). Porém, há dificuldades na identificação de indivíduos de *Trichogramma*, visto que é requerida habilidade especializada (Pinto; Stouthamer, 1994). Casos de identificação incorreta têm sido registrados na Europa em espécies amplamente disseminadas como *Trichogramma euproctidis* e *Trichogramma evanescens* (Polaszek et al., 2012).

A avaliação de espécimens de *Trichogramma* preparados em lâminas é um processo que requer tempo e considerável experiência, devido ao pequeno tamanho e à falta de caracteres morfológicos distintos (Platner et al., 1999).

A descoberta das características morfológicas do macho (Nagarkatti; Nagaraja, 1968, 1971) foi um grande avanço no estudo taxonômico, embora não tenha resolvido os casos nos quais apenas fêmeas são

produzidas (Almeida; Stouthamer, 2015). Muitas espécies compartilham estruturas similares da genitália e isso obriga os especialistas a contar com caracteres menos confiáveis que, muitas vezes, são intraespecificamente variáveis e sujeitos à plasticidade fenotípica (Pinto; Stouthamer, 1994; Pinto et al., 1999).

Condições do ambiente, como temperatura e tamanho do hospedeiro, podem afetar as características morfológicas dos parasitoides (Pinto et al., 1989), além de existir um grande número de espécies crípticas no gênero *Trichogramma* devido à morfologia geral similar dentro desse grupo de trichogramatídeos (Knutson, 1998).

Assim, na escolha da técnica a ser utilizada para identificação das espécies de *Trichogramma*, o tipo de reprodução é considerado importante. A forma reprodutiva mais comum entre os himenópteros é arrenotoquia, em que machos haploides são originados de ovos infertilizados e fêmeas diploides de ovos fertilizados. A Telitoquia é uma outra forma de reprodução em que fêmeas se originam de ovos infertilizados e é causada pela bactéria do gênero *Wolbachia* Hertig (Rickettsiaceae) (Luck et al., 1992; Almeida; Stouthamer, 2018).

O simbiote *Wolbachia* tem sido extensivamente estudado em uma ampla gama de organismos, sendo sua presença estimada em cerca de 16, 22 e 19% das espécies infectadas no Panamá, Grã-Bretanha e América do Norte, respectivamente (Werren et al., 1995; West et al., 1998; Werren; Windsor, 2000).

Na reprodução telítoca, os machos de *Trichogramma* não se originam quando as bactérias são herdadas citoplasmaticamente, isto é, eles não passam para gerações seguintes (Huigens et al., 2000). As filhas são produzidas quando a partenogênese induzida por *Wolbachia* suprime a formação do fuso durante a anáfase na primeira divisão mitótica, e restaura a diploidia pela fusão dos dois núcleos mitóticos (Stouthamer, 1977), tendo este simbiote um importante papel na evolução, ecologia e reprodução de seus hospedeiros (Werren, 1997).

Nos casos em que a infecção por *Wolbachia* pode ser curada pelo tratamento com antibiótico e aumento da temperatura (Stouthamer et al., 1990a; Huigens et al., 2004; Almeida et al., 2010), a produção

de machos pode ser restaurada e se utilizar a taxonomia morfométrica, caso contrário, quando a infecção é irreversível, esse método de identificação é inviável.

Caso em que a telitoquia em *Trichogramma* não é reversível e *Wolbachia* não está associada a seu hospedeiro foi registrado por Stouthamer et al. (1990b). Nessa forma de reprodução, apenas a utilização da técnica molecular baseada no sequenciamento do DNA ribossomal (DNAr) da região ITS-2 foi viável para identificação de *Trichogramma cacoeciae*, cuja reprodução telítica é resultado de algum fator genético nuclear (Stouthamer et al., 1990b; Almeida; Stouthamer, 2003). Isso também se aplica aos casos em que as espécies de *Trichogramma* são infectadas com *Wolbachia* e apenas produzem fêmeas, demonstrando a importância das técnicas moleculares como únicas e confiáveis ferramentas na identificação de fêmeas telitocas (Stouthamer et al., 1990b; Stouthamer et al., 1993; Schilthuizen; Stouthamer, 1997; Almeida; Stouthamer, 2015).

## Análises moleculares na identificação de *Trichogramma*

---

Técnicas moleculares são amplamente utilizadas para detecção, discriminação, análises filogenéticas, taxonomia e caracterização de agentes de controle biológico pertencentes ao gênero *Trichogramma* (Koca et al., 2018), além de serem empregadas no estudo de genética de populações, biologia da conservação e diversidade genética entre populações naturais de insetos (Oosterhout et al., 2004).

Para simplificar a identificação de espécies de *Trichogramma*, vários métodos foram propostos: (1) análise alozímica (Pintureau; Babault, 1980, 1981, 1982; Pintureau; Keita, 1989; Kazmer, 1991; Pinto et al., 1992, 1993; Pintureau, 1993); (2) testes de compatibilidade reprodutiva (Nagarkatti; Nagaraja, 1968; Pinto et al., 1991; Pintureau, 1991); (3) sequência de DNA de espaçadores ribossomais

(Landry et al., 1993; Orrego; Agudelo-Silva, 1993; Sappal et al., 1995; Kan et al., 1996; Kan et al., 1997; Pinto et al., 1997); (4) polimorfismo de comprimento de fragmentos de DNA (RFLP) de genoma mitocondrial completo (Vanlerberghe-Masutti, 1994).

O DNA ribossomal está presente em todos os organismos e é composto de muitas regiões – genes e espaçadores – que evoluem em ritmos diferentes (Hillis; Dixon, 1991). As regiões dos espaçadores transcritos internos (ITS1 e ITS2) têm sido usadas para distinguir os diferentes organismos em níveis de espécies e intraespecificamente em muitos táxons (Carbone; Kohn, 1993; Bowles; McManus, 1993; Hsiao et al., 1994; Buckler IV et al., 1997).

Almeida e Stouthamer (2015) confirmaram a baixa variação intraespecífica no comprimento de sequências de ITS2 detectada por Stouthamer et al. (1999b) e Silva et al. (1999). De acordo com Stouthamer et al. (1999b), o ITS2 pode ser usado para identificação de espécies do gênero *Trichogramma* porque a variação intraespecífica é relativamente pequena em relação à diferença interespecífica. Em geral, a variação entre o tamanho das sequências ITS2 de espécies de *Trichogramma* é limitada ao número de trechos repetidos de microsatélites encontradas nas sequências de ITS2 (Almeida; Stouthamer, 2015). Segundo Fenton et al. (1997), a variação no número de microsatélites repetidos parece ser comum em sequência de ITS, sendo a variação similar de microsatélites também encontrada em ácaros eriofídeos.

Poorjavad et al. (2012) encontraram baixa variabilidade intraespecífica no comprimento (3 a 18 bases) e determinaram significantes diferenças interespecíficas. Koca et al. (2018) não encontraram nenhuma variação genética nas sequências de ITS2-DNAr nas nove populações de *Trichogramma brassicae* coletadas em cultivos de milho, na Província de Düzce, Turquia. De acordo com Liu et al. (2017), embora as sequências estudadas tenham apresentado significativas diferenças interespecíficas, elas também apresentaram baixa variabilidade em tamanho (2 a 10 bases).

O DNAr nuclear consiste de três regiões altamente conservadas, separadas por duas regiões também muito conservadas dentro das espécies, mas varia substancialmente entre espécies. A reação em

cadeia da polimerase (PCR) pode ser utilizada para amplificar esses espaçadores ITS, utilizando iniciadores – primers – universais que se ligam em regiões altamente conservadas (Silva et al., 1999; Stouthamer et al., 1999b; Sumer et al., 2009).

Entre os marcadores moleculares, o DNAr é encontrado em todos os organismos e contém várias regiões que evoluem em diferentes taxas. Portanto, seu uso como um marcador molecular é preferido em estudos para comparação de espécies e populações intimamente relacionadas. Adicionalmente, sabe-se que os métodos baseados no DNA não são afetados pelo ciclo biológico ou sexo das espécies de *Trichogramma* (Vanlerberghe-Masutti, 1994).

As sequências de ITS2 do DNAr são de utilidade como uma técnica de identificação geral para espécies de *Trichogramma* e antes que qualquer característica possa ser proposta como apropriada para separar espécies, uma variação intraspecífica potencial deve ser levada em consideração (Stouthamer et al., 1999b). O polimorfismo ocorre naturalmente e depende da variação na sequência do DNA, além de criar a base da variação intraespécies e interespecies em genomas de planta e animais (Meksem; Kahl, 2005). Estudos moleculares com *Trichogramma* têm frequentemente utilizado sequências ITS2 (Campbell et al., 1993; Stouthamer et al., 1999b, 2000; Silva et al., 1999; Pinto et al., 2002; Li et al., 2004; Davies et al., 2006; Wahner et al., 2008; Jeong et al., 2010; Poorjavad et al., 2012; Almeida; Stouthamer, 2003, 2015; Santos et al., 2015; Liu et al., 2017; Ivezić et al., 2018; Viana et al., 2021; Can et al., 2022; Ercan et al., 2022).

Apesar de as sequências de DNAr-ITS2 serem utilizadas com sucesso como uma ferramenta de identificação geral para espécies de *Trichogramma* (Stouthamer et al., 1999b), uma exceção foi verificada no caso das espécies crípticas *Trichogramma minutum* e *Trichogramma platneri*, que não foram distinguidas nos estudos morfológicos e moleculares utilizando as sequências de DNA-ITS2, sugerindo que derivaram de um ancestral comum (Stouthamer et al., 2000), apesar de serem definidas como espécies diferentes, o que tem sido explicado pelo fato de serem incompatíveis ao se cruzarem (Pinto et al., 1991).

A vantagem das sequências de ITS2 sobre os sistemas baseados na morfologia do inseto é que a identificação das espécies pode ser realizada rapidamente e com baixo custo. Além disso, fêmeas podem ser identificadas, não sendo possível no sistema baseado em caracteres morfométricos dos insetos (Almeida; Stouthamer, 2003, 2015).

Outros autores verificaram a vantagem do uso da região ITS2 para identificação específica e a empregaram para *Trichogramma*, a exemplo de Silva et al. (1999). Da mesma forma, Davies et al. (2006) usaram a região ITS2 para facilmente diferenciar espécies de *Trichogramma pretiosum* de *Trichogramma australicum* Girault. Esse critério foi usado por Espanã-Luna et al. (2008), os quais usaram a percentagem de similaridade entre sequências de ITS2 para identificar as espécies de *T. pretiosum* e *Trichogramma exigum* entre outras.

A variação da sequência de ITS2 dentro das espécies de *Trichogramma* é relativamente pequena em comparação às diferentes espécies encontradas e todas as espécies crípticas distintas morfologicamente são também reconhecidas por diferentes sequências (Stouthamer et al., 1999b). Sequências de ITS2 dentro de cada espécie são muito similares e não existe evidência para duas ou mais famílias de genes que diferem substancialmente dentro do genoma de um único indivíduo, como tem sido encontrado em outros táxons (Vogler; De Salle, 1994).

Análises moleculares utilizando a região do DNAr-ITS2 também têm possibilitado explicar aspectos comportamentais de *Trichogramma* (Viana et al., 2021). Os autores enfatizaram a capacidade de *T. pretiosum* ser um parasitoide generalista, pelo fato de sua grande variação genética intraespecífica, contrariamente ao verificado com *T. marandobai*, *T. manicobai* e *T. galloi*, que apresentam similaridades genéticas determinadas em estudos filogenéticos. Explicam ainda que a região ITS2 do DNAr situa-se entre os genes nucleares RNAr 5.8S e 28S e, por não corresponder a uma região codificadora de proteína, não se expressa como uma característica observável (fenótipo).

A extração de DNA e amplificação do PCR é facilmente realizada e para extração do DNA são utilizados os iniciadores (primers) "forward e reverse" (ITS2- forward: 5' -TGTGAACTGCAG GACACATG-3' localizado na região 5.8S do DNAr; ITS2-reverse: 5' -GTCTTGCC

TGCTCTGCTCTGAG-3' (Stouthamer et al., 1999b), localizado na região 28S do DNAr.

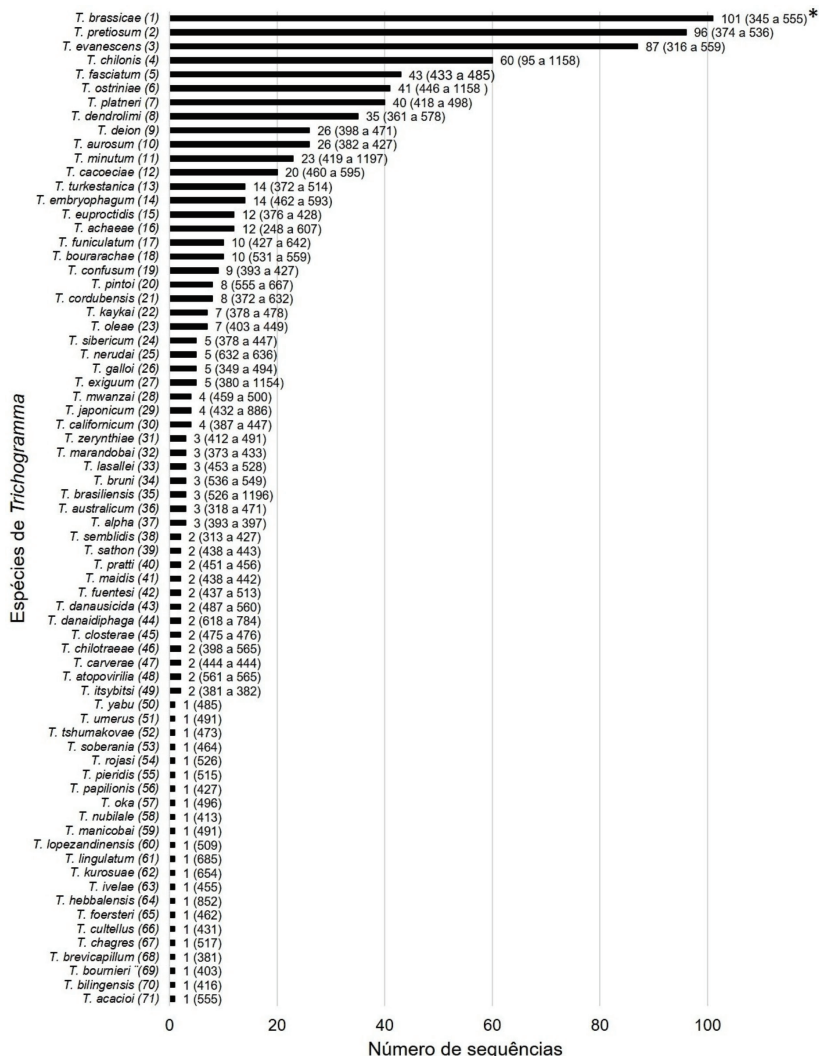
O DNA genômico tem sido extraído utilizando-se um, três, cinco ou dez indivíduos de *Trichogramma* (Walsh et al., 1991; España-Luna et al., 2008; Polaszek et al., 2012; Almeida; Stouthamer, 2015; Santos et al., 2015; Liu et al., 2017; Koca et al., 2018; Ivezić et al., 2018). O produto do PCR é purificado e para confirmar se a correta parte do DNA foi clonada, uma reação de PCR é corrida em gel de agarose com uma amostra extraída de uma cultura de bactéria. Uma vez que o ITS2 é clonado, a cultura é usada para purificar o plasmídeo, sendo utilizada para o sequenciamento do DNA de *Trichogramma* (Silva et al., 1999; Stouthamer et al., 1999b; Ciociola Junior et al., 2001; Almeida; Stouthamer, 2015).

Para reconhecimento das espécies são levadas em consideração o tamanho do ITS2 e sua correspondência com sequências já identificadas via alinhamento manual ou com a utilização de programas específicos (Thompson et al., 1997; Larkin et al., 2007; Ivezić et al., 2018; Can et al., 2022; Ercan et al., 2022).

Novas sequências de *Trichogramma* podem ser comparadas com sequências depositadas no banco de dados do GenBank database - NCBI, para determinação da similaridade entre elas (Santos et al., 2015; Ivezić et al., 2018).

## Espécies de *Trichogramma* identificadas via sequência do DNA ribossomal

Até o presente momento foram depositadas no GenBank 808 sequências de DNA de 71 espécies de *Trichogramma* (Figura 1), representando 30,21% das espécies descritas. Essas espécies foram sequenciadas utilizando as regiões ITS1, ITS2, 5.8S do rRNA e 28S do rRNA, 26S r-RNA gene.



**Figura 1.** Sequências de espécies de *Trichogramma* depositadas no GenBank. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>. \*Número de seqüências (variação da quantidade de pares de bases). Regiões sequenciadas: ITS1, ITS2, 5.8S do rRNA e 28S do rRNA, 26S ribossomal RNA gene, parcial ou completa.

Sequências completas de ITS2 depositadas no GenBank de espécies de *Trichogramma* são em sua maioria hospedeiras de lepidópteros e de importância econômica originárias de culturas anuais, permanentes e florestal (Almeida; Stouthamer, 2015). Novas sequências de ITS2 têm sido comparadas com as sequências do GenBank, permitindo assim a correta identificação das espécies (Liu et al., 2017).

Dentre as espécies sequenciadas (Figura 1) de *Trichogramma*, destacam-se *T. pretiosum*, *T. brassicae*, *T. evanescens* e *T. chilonis* pelo número de estudos taxonômicos moleculares. A primeira espécie é predominante das regiões neártica e neotropical e as demais das regiões paleártica e oriental. Entretanto, apenas uma minoria das espécies listadas na Figura 1 é utilizada no controle biológico aplicado.

A identificação das espécies de *Trichogramma*, via estudos moleculares, tem se mostrado de grande utilidade para solucionar problemas de confundimento de espécies baseado em estudos morfológicos da genitália do macho, de modo que o erro de identificação de espécies representa um sério problema em programas de controle biológico com *Trichogramma* (Almeida; Stouthamer, 2015).

*T. brassicae* foi relatada como um novo registro de espécie introduzida na América do Sul, identificada por intermédio de sequência de ITS2. Acreditava-se ser *T. evanescens*, mas a identificação molecular mostrou ser *T. brassicae* (Almeida; Stouthamer, 2015). Identificação controversa de *T. evanescens* foi registrada tanto por Kostadinov e Pintureau (1991), como por Nagarkatti e Nagaraja (1968) e Kostadinov e Pintureau (1991). Nagarkatti e Nagaraja (1968) relataram caso em que *T. australicum* foi erroneamente referida como *T. evanescens* por aproximadamente 50 anos.

Os tamanhos dos produtos de DNAr-ITS2 das diferentes espécies diferem consistentemente entre si, ao contrário da variação intraespecífica, confirmando sua utilidade na identificação específica de *Trichogramma* (Stouthamer et al., 1999b; Silva et al., 1999; Ciociola Junior et al., 2001; Almeida; Stouthamer, 2003, 2015; Liu et al., 2017; Ercan et al., 2022).

A utilidade de sequências do DNAr-ITS2 tem sido amplamente reconhecida e, por isso, a sua utilização na identificação de espécies de *Trichogramma* tem crescido nas últimas décadas (Tabela 1). Contudo, a identificação de espécies de micro-himenópteros em termos

**Tabela 1.** Espécies de *Trichogramma* identificadas com sequência do DNAr-ITS2.

| Espécies identificadas                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  | Local                                   | Autor                      |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------|----------------------------|
| <i>T. cordubensis</i> , <i>T. evanescens</i> , <i>T. turkestanica</i> ; <i>T. pinto</i> e <i>T. bourarachae</i>                                                                                                                                                                                                                                                         | Portugal                                | Silva et al. (1999)        |
| <i>T. alpha</i> , <i>T. aurosum</i> , <i>californicum</i> , <i>T. cacoeciae</i> , <i>T. deion</i> , <i>T. exiguum</i> , <i>T. itsybitsi</i> , <i>T. minutum</i> , <i>T. platneri</i> , <i>pretiosum</i> e <i>T. sibericum</i>                                                                                                                                           | Estados Unidos                          | Pinto et al. (2002)        |
| <i>T. brassicae</i> , <i>T. nr. Brassicae</i> ; <i>T. carverae</i> , <i>T. funiculatum</i> , <i>T. pretiosum</i>                                                                                                                                                                                                                                                        | Austrália                               | Thomson et al. (2003)      |
| <i>T. yabui</i> , <i>T. okinawae</i> e <i>T. aomoriense</i>                                                                                                                                                                                                                                                                                                             | Japão                                   | Honda et al. (2006)        |
| <i>T. achaeae</i> , <i>T. chilonis</i> , <i>T. japonicum</i> , <i>T. embryophagum</i> , <i>T. pretiosum</i> , <i>T. brassicae</i> , <i>T. dendrolimi</i> , <i>T. evanescens</i> e <i>T. mwanzai</i>                                                                                                                                                                     | Índia                                   | Kumar et al. (2009)        |
| <i>T. bourarachae</i> , <i>T. brassicae</i> , <i>T. cacoeciae</i> / <i>T. embryophagum</i> , <i>T. cordubensis</i> , <i>T. dendrolimi</i> , <i>T. euproctidis</i> , <i>T. evanescens</i> , <i>T. nerudai</i> , <i>T. oleae</i> e <i>T. pinto</i>                                                                                                                        | Mediterrâneo                            | Sumer et al. (2009)        |
| <i>T. ostrinae</i> e <i>T. brassicae</i>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                | Coreia                                  | Jeong et al. (2010)        |
| <i>T. brassicae</i> , <i>T. cacoeciae</i> , <i>T. embryophagum</i> , <i>T. evanescens</i> , <i>T. euproctidis</i> , <i>T. pinto</i> e <i>T. tshumakovae</i>                                                                                                                                                                                                             | Irã                                     | Poorjavad et al. (2012)    |
| <i>T. chilonis</i> , <i>T. chilotraeae</i> , <i>T. evanescens</i> , <i>T. pinto</i> , <i>T. euproctidis</i> , <i>T. siddiqi</i>                                                                                                                                                                                                                                         | Paquistão                               | Nasir et al. (2013)        |
| <i>T. acacioi</i> , <i>T. atopovirilia</i> , <i>T. brassicae</i> , <i>T. bruni</i> , <i>T. cacoeciae</i> , <i>T. dendrolimi</i> , <i>T. esalqueanum</i> , <i>T. exiguum</i> , <i>T. fuentes</i> , <i>T. gallo</i> , <i>T. iracildae</i> , <i>T. lasallei</i> , <i>T. lopezandinensis</i> , <i>T. nerudai</i> , <i>T. pinto</i> , <i>T. pretiosum</i> , <i>T. rojasi</i> | América do Sul (Nativas e introduzidas) | Almeida e Stouhamer (2015) |
| <i>T. chilonis</i> , <i>T. evanescens</i> , <i>T. ostrinae</i> , <i>T. embryophagum</i> , <i>T. dendrolimi</i> e <i>T. japonicum</i>                                                                                                                                                                                                                                    | China e Coreia                          | Liu et al. (2017)          |
| <i>T. brassicae</i> e <i>T. evanescens</i>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              | Sibéria                                 | Ivezić et al. (2018)       |
| <i>T. manicobai</i> , <i>T. marandobai</i> , <i>T. gallo</i> e <i>T. pretiosum</i>                                                                                                                                                                                                                                                                                      | Brasil                                  | Viana et al. (2021)        |
| <i>T. brassicae</i> e <i>T. turkestanica</i>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            | Turquia                                 | Ercan et al. (2022)        |

de raça, utilizando-se métodos clássicos, não tem sido possível de acordo com Landry et al. (1993).

Espera-se que a quantidade de espécies sequenciadas, utilizando-se a região ITS2 do DNA Ribossomal (GenBank) até o presente momento, possa ser aumentada devido à diversidade de espécies ainda por serem descobertas, devido ao fato de que muitas dessas espécies identificadas estão restritas a insetos de culturas de importância para agricultura. Isso reforça o entendimento de que a diversidade e biologia de espécies nativas de espécies de *Trichogramma* é uma etapa-chave na implementação comercial de parasitoides de ovos (Ivezić et al., 2018).

Assim, para o avanço na identificação de novas espécies com uso dessa técnica molecular, a identificação morfológica deve ser considerada por sua importância devido à complementariedade dessas duas técnicas taxonômicas (Sumer et al., 2009; Almeida; Stouthamer, 2015). O surgimento de novos especialistas para identificação morfológica de *Trichogramma* configura-se como um aspecto fundamental a ser considerado (Almeida; Stouthamer, 2015), visto que auxiliará muito os estudos em biologia molecular com *Trichogramma*, principalmente no que diz respeito aos estudos filogenéticos (Schilthuizen; Stouthamer, 1997; Stouthamer et al., 1999b), cujo objetivo é analisar as relações evolutivas entre diferentes espécies.

## Chaves moleculares e estudos filogenéticos com *Trichogramma* spp.

Chaves moleculares têm por objetivo separar espécies diferentes com base no tamanho do produto da PCR da região do ITS-2 e no perfil de fragmento seguindo a restrição com diferentes endonucleases. Sua utilidade para distinguir as espécies de *Trichogramma* tem sido

demonstrada por vários autores (Stouthamer et al., 1999b; Silva et al., 1999; Pinto et al., 2002; Almeida; Stouthamer, 2015).

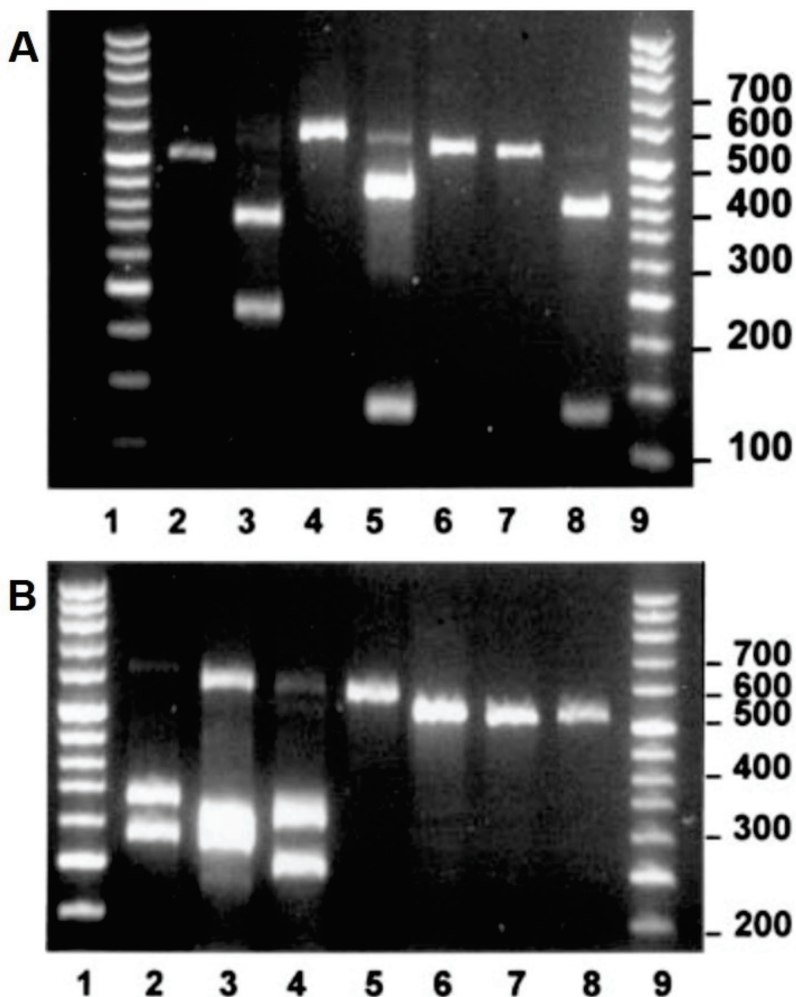
Espécies com produto de PCR similares são distinguidas pela seleção de enzimas de restrição, ao gerar diferentes tamanhos de fragmentos. Para realização desses estudos, pode-se atualmente contar com a disponibilidade de laboratórios de biologia molecular com infraestrutura básica para extração de DNA de material vivo, congelado, preservado em etanol ou seco e realização de amplificações de PCR seguidas de digestões com enzimas de restrição (Post et al., 1993; Kan et al., 1996; Ciociola Junior et al., 2000). Entretanto, como no caso de chaves morfológicas, chaves moleculares serão completamente confiáveis quando todas as espécies forem conhecidas (Almeida; Stouthamer, 2015).

A técnica molecular, por sua utilidade prática, é de valor indispensável na identificação de espécies de *Trichogramma*, contribuindo para o entendimento do *status* de espécies introduzidas e das espécies a serem identificadas (Almeida; Stouthamer, 2015). Esse método tem ainda sua importância na detecção de contaminação potencial em criações de laboratório e na avaliação do desempenho de linhagens após liberações (Silva et al., 1999).

Uma fraqueza potencial da chave molecular baseada em ITS2 é que em alguns casos a chave molecular depende da restrição da sequência ITS2 por uma enzima em particular ou a falta dela. Quando nenhuma restrição é obtida não fica imediatamente claro se a endonuclease funcionou ou se a reação de digestão falhou (Stouthamer et al., 1999b). É importante correr o gel com um controle positivo para assegurar que a reação de restrição funcionou.

Um dos primeiros trabalhos que realizaram a clivagem de diferentes sequências de DNA com enzimas de restrição para distinguir espécies de *Trichogramma* foi realizado por Stouthamer et al. (1999b), ao utilizar as enzimas *MseI*, *EcoRI* e *Maell* (Figura 2).

Rijswijk et al. (2000) distinguiram quatro espécies de *Trichogramma* coletadas em cartões com ovos de *Mamestra brassicae* cultivados em repolho, jardins e plantas arbóreas em Wageningen, Holanda, utilizando a enzima de restrição *MseI*; em outro trabalho, as enzimas



**Figura 2.** Eletroforese em gel de agarose com produtos de PCR de ITS2 mais regiões flanqueadoras para as espécies do complexo *T. deion/ T. pretiosum* com a enzima MseI (A) e EcoRI (B). Linha: 1 - Marcador molecular; 2 - *T. interius*; 3 - *T. kaykai*; 4 - *T. pratti*; 5 - *T. sathon*; 6 - *T. pretiosum*; 7 - *T. oleae*; 8 - *T. deion*; 9 - Marcador molecular.

Fonte: Stouthamer et al. (1999b).

*EcoRI*, *MseI*, *PvuI* e *NruI* foram testadas para separação de sete espécies de *Trichogramma* do Brasil, com tamanhos que variaram de 522 pb a valores maiores que 660 pb (Ciociola Junior et al., 2001). Kumar et al. (2009) estudaram onze espécies nativas da Índia e exóticas de *Trichogrammatídeos* dos gêneros *Trichogramma* e *Trichogrammatoidea*, utilizando as enzimas *EcoRI*, *MseI*, *MvaI* e *TaqI*; Nasir et al. (2013) identificaram seis espécies em zonas ecológicas do Paquistão, utilizando as enzimas *Bsp119I* e *BseXI*.

Com base em uma única sequência de ITS2 de *T. tshumakovae*, Poorjavad et al. (2012) a distinguiram de *T. evanescens*, ao verificar que a maior banda após a digestão de restrição com a enzima *MnI* resultou em 460 pb para *T. tshumakovae*, enquanto para *T. evanescens* foi de apenas 300 pb. *EcoRI* clivou ambas as espécies em apenas dois fragmentos. Duas bandas claramente diferentes, com tamanho de 236 e 307 pb foram encontradas para *T. tshumakovae*, entretanto para *T. evanescens* duas bandas similares (270 e 282 pb), de modo que apenas uma única banda foi visível no gel.

Três enzimas de restrição (*EcoRI*, *MseI* e *MaeI*) utilizadas para construção de chave molecular (Tabela 2) distinguiram 17 espécies em função da clivagem dos produtos do ITS2 das diferentes espécies (Almeida; Stouthamer, 2015). Nesse estudo, uma previsão do tamanho de fragmentos foi obtida pela utilização de programa do Webcutter 2.0 (Heiman, 1997).

España-Luna et al. (2008) utilizaram duas enzimas de restrição (*EcoRI* e *AluI*) para avaliar sete espécies de *Trichogramma* do México, sendo que duas (*T. minutum* e *T. platneri*) não foram separadas nas chaves moleculares, e, segundo Stouthamer et al. (2000), foram consideradas idênticas em estudos moleculares. O mesmo resultado foi obtido para *T. minutum* e *T. platneri* por Pinto et al. (2002), que utilizaram as enzimas de restrição *EcoRI*, *MseI* e *BsmI* para distinguir onze espécies de *Trichogramma* de diferentes regiões nos Estados Unidos. Sumer et al. (2009) usaram três enzimas de restrição (*MnII*, *MseI* e *DraI*) para distinguir dez espécies de *Trichogramma* coletada em lavouras do Mediterrâneo.

O uso da chave molecular elaborada com base nos tamanhos dos produtos de PCR da região ITS2, assim como a digestão das enzimas

**Tabela 2.** Chave molecular para identificação de espécies *Trichogramma* com base no tamanho do produto de PCR e no padrão de restrição das endonucleases.

|                                                                |                             |
|----------------------------------------------------------------|-----------------------------|
| 1. Tamanho do produto do PCR < 620 pb                          | 2                           |
| Tamanho do produto do PCR > 620 pb                             | 10                          |
| 2. Tamanho do produto do PCR < 550 pb                          | 3                           |
| Tamanho do produto do PCR > 550 pb                             | 7                           |
| 3. Tamanho do produto do PCR ≤ 500 pb                          | 4                           |
| Tamanho do produto do PCR > 550 pb                             | 5                           |
| 4. Clivagem do produto do PCR por <i>MseI</i> ≈ 280 e 191 pb   | <i>T. esalqueanum</i>       |
| Sem clivagem do Produto do PCR por <i>MseI</i>                 | <i>T. exiguum</i>           |
| 5. Clivagem do produto do PCR por <i>EcoRI</i>                 | 6                           |
| Sem clivagem do Produto do PCR por <i>EcoRI</i>                | <i>T. pretiosum</i>         |
| 6. Clivagem do produto do PCR por <i>MseI</i> ≈ 441 pb         | <i>T. dendrolimi</i>        |
| Clivagem do produto do PCR por <i>MseI</i> ≈ 411 pb            | <i>T. brassicae</i>         |
| 7. Sem clivagem do Produto do PCR por <i>MseI</i>              | 8                           |
| Clivagem do produto do PCR por <i>MseI</i>                     | 9                           |
| 8. Clivagem do produto do PCR por <i>MaeI</i> ≈ 267 e 218 pb   | <i>T. fuentesi</i>          |
| Clivagem do produto do PCR por <i>MaeI</i> ≈ 182 e 113 pb      | <i>T. galloi</i>            |
| 9. Clivagem do produto do PCR por <i>EcoRI</i> ≈ 346 e 228 pb  | <i>T. cacoeciae</i>         |
| Sem clivagem do Produto do PCR por <i>EcoRI</i>                | <i>T. lasallei</i>          |
| 10. Tamanho do produto do PCR < 670 pb                         | 11                          |
| Tamanho do produto do PCR > 670 pb                             | 14                          |
| 11. Sem clivagem do Produto do PCR por <i>MseI</i>             | 12                          |
| Clivagem do produto do PCR por <i>MseI</i>                     | 13                          |
| 12. Clivagem do produto do PCR por <i>MaeI</i> ≈ 480 e 143 pb  | <i>T. lopezandinisensis</i> |
| Clivagem do produto do PCR por <i>MaeI</i> ≈ 517 pb            | <i>T. iracildae</i>         |
| 13. Clivagem do produto do PCR por <i>MseI</i> ≈ 390 e 194 pb  | <i>T. rojasi</i>            |
| Clivagem do produto do PCR por <i>MseI</i> ≈ 463 e 187 pb      | <i>T. bruni</i>             |
| 14. Tamanho do produto do PCR > 700 pb                         | <i>T. nerudai</i>           |
| Tamanho do produto do PCR < 700 pb                             | 15                          |
| 15. Clivagem do produto do PCR por <i>EcoRI</i>                | <i>T. pintoi</i>            |
| Sem clivagem do Produto do PCR por <i>EcoRI</i>                | 16                          |
| 16. Clivagem do produto do PCR por <i>MseI</i> ≈ 478 e 196 pb  | <i>T. acacioi</i>           |
| Clivagem do produto do PCR por <i>MseI</i> ≈ 345, 198 e 137 pb | <i>T. atopovirilia</i>      |

Fonte: Almeida e Stouthamer (2015).

de restrição EcoRI e AluI, pode incrementar a precisão nas espécies liberadas para o controle biológico (España-Luna et al., 2008) e produzir resultados confiáveis e replicáveis (Silva et al., 1999).

As análises filogenéticas, que estudam as relações evolutivas entre diferentes espécies, são elaboradas por intermédio de resultados de sequências do DNA ribossomal. Assim, Clustal W e Clustal são exemplos de softwares empregados para fazer o alinhamento de sequências múltiplas e para gerar árvores filogenéticas (Hall, 1999; Viana et al., 2021; Ercan et al., 2022). Os estudos de distância genética e árvores filogenéticas podem ser calculadas via MEGA (Molecular Evolutionary Genetic Analysis) software (Kumar et al., 2018; Ercan et al., 2022). Estudos evolutivos podem ser inferidos utilizando-se diferentes métodos, entre os quais a máxima verossimilhança, baseado no modelo Kimura 2-parâmetro (Kimura, 1980).

Li et al. (2004) avaliaram o *status* taxonômico, com base em análise filogenética de quatro espécies de *Trichogramma* intimamente relacionadas, utilizando o marcador ITS2 para detectar diferenças entre espécies. Conforme cladograma elaborado, em que foram adicionadas 67 sequências do GenBank, a sequência de *T. maidis* e a de *T. evanescens* foram agrupadas em ramos diferentes de *T. confusum* e *T. chilonis*. Os resultados sugerem que *T. maidis* é distinta de *T. brassicae*, sendo, portanto, espécies crípticas de *T. Evanescens*. Por sua vez, *T. confusum* e *T. chilonis* não são espécies crípticas, mas duas espécies intimamente relacionadas.

Com base na construção de dendrograma, Dem'yanchuk et al. (2008) separaram as espécies em dois grupos. O primeiro incluiu as espécies *T. pintoi* e *T. dendrolimi*, enquanto o segundo consistiu das espécies *T. cacociae*, *T. semblidis* e *T. evanescens*. As sequências da região ITS2 de *T. pintoi* e *T. dendrolimi* obtiveram 98% de similaridade, enquanto para *T. cacociae*, *T. semblidis*, e *T. evanescens*, a similaridade foi de 87–98%. Os dois grupos apresentaram similaridade de apenas 61–65%.

Samara et al. (2008) compararam a espécie *T. aurosum* de populações europeia com norte-americanas, além de verificaram que o clado *aurosum* foi descrito como monofilético formando um segundo grupo com as outras quatro espécies da seção *exiguum* (*T. pretiosum*, *T. cacoeciae*, *T. evanescens* e *T. exiguum*). Nesse estudo, análises de polimorfismo de comprimento de fragmento amplificado (AFLP) apresentaram um alto potencial para revelar a diversidade genética, demonstrando ser uma ferramenta importante para genética populacional de *T. aurosum*.

Santos et al. (2015) distinguiram três grupos conforme dendrograma obtido a partir das distâncias genéticas entre as espécies (*T. pretiosum*, *T. galloi* e *T. exiguum*) estudadas. Viana et al. (2021) determinaram três grupos compreendendo *T. manicobai* e *T. marandobai* (grupo I), *T. galloi* (grupo II) e *T. pretiosum* (grupo III), confirmando ser o marcador ITS2 um poderoso DNA barcode para discriminar espécies de *Trichogramma*. Koca et al. (2018) não detectaram variação genética em nove amostras de *Trichogramma brassicae* estudadas, porém distinguiram em grupos distintos essa espécie de outras (sequências do GenBank) via análise filogenética, demonstrando sua utilidade em diagnósticos rápidos.

Estudos filogenéticos realizados por Ercan et al. (2022) dividiram as espécies de *Trichogramma* estudadas em dois principais grupos. Cinco espécimens foram incluídos no grupo *T. turkestanica* e 32 outros espécimens no grupo *T. brassicae* de acordo com as análises de sequências ITS2. Outros grupos foram formados por espécies obtidas de sequências do GeBank. Can et al. (2022) confirmaram seis amostras como sendo *T. evanescens* e as distinguiram filogeneticamente de outras espécies utilizando o DNA ribossomal-ITS2 e DNA mitocondrial-COI (Citocromo Oxidase I), com sequências obtidas do GenBank. Essas duas regiões de genes são consideradas poderosas ferramentas para estudos filogenéticos para os níveis taxonômicos inferiores (Cruickshank, 2002).

## Considerações finais

---

Com este documento se verificou que a identificação de espécies de *Trichogramma* por meio de marcadores de DNAr-ITS2 pode ser utilizada para complementar classificações baseadas em caracteres morfológicos, na detecção de contaminação potencial em criações de laboratório e na avaliação do desempenho de linhagens após as liberações. Além disso, as sequências de DNA podem ser aplicadas em estudos filogenéticos e na elaboração de chaves moleculares, por ser uma técnica de fácil separação das espécies de *Trichogramma*.

Sequências ITS2 utilizadas em estudos taxonômicos provaram ser úteis em prover uma identificação confiável de espécies de *Trichogramma*, de modo que a técnica molecular é indispensável na identificação de espécies de *Trichogramma*, em que o resultado do status da introdução de espécies é melhor entendido e novas espécies poderão ser identificadas.

## Referências

---

- ALMEIDA, R. P. de; LENTEREN, J. C. van; STOUTHAMER, R. Does *Wolbachia* infection affect *Trichogramma atopovirilia* behaviour? **Brazilian Journal of Biology**, v. 70, n. 2, p. 435-442, 2010.
- ALMEIDA, R. P. de; STOUTHAMER, R. ITS-2 sequences-based identification of *Trichogramma* species in South America. **Brazilian Journal of Biology**, v. 75, n. 4, p. 974-982, 2015.
- ALMEIDA, R. P. de; STOUTHAMER, R. Molecular identification of *Trichogramma cacoeciae* Marchal (Hymenoptera: Trichogrammatidae): a new record for Peru. **Neotropical Entomology**, v. 32, p. 269-272, 2003.
- ALMEIDA, R. P. de; STOUTHAMER, R. Phylogeny of the *Trichogramma* endosymbiont *Wolbachia*, an alpha-proteobacteria (Rickettsiae). **Brazilian Journal of Biology**, v. 78, n. 3, p. 421-428, 2018.

BOWLES, J.; MCMANUS, D. P. Rapid discrimination of *Echinococcus* species and strains using a polymerase chain reaction-based RFLP method.

**Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 57, p. 231-240, 1993.

BUCKLER IV, E. S.; IPPOLITO, A.; HOLTSFORD, T. P. The evolution of ribosomal DNA: divergent paralogues and phylogenetic implications.

**Genetics**, v. 145, p. 821-832, 1997.

CAMPBELL, B. C.; STEFFEN-CAMPBELL, J. D.; WERREN, J. H. Phylogeny of the *Nasonia* species complex (Hymenoptera: Pteromalidae) inferred from an internal transcribed spacer (ITS2) and 28S rDNA sequences.

**Insect Molecular Biology**, v. 2, p. 225-237, 1993.

CAN, F.; ERCAN, F.; ULARL, B. First discovery of the natural egg parasitoid of *Cydalima perspectalis* (Walker, 1859) in Turkey with molecular methods (Lepidoptera: Crambidae). **SHILAP Revista de lepidopterología**, v. 50, p. 607-616, 2022.

CARBONE, I.; KOHN, L. Ribosomal DNA sequence divergence within transcribed spacer 1 of the Sclerotiniaceae. **Mycologia**, v. 85, p. 15-427, 1993.

CIOCIOLA JUNIOR, A. C.; ALMEIDA, R. P. de; STOUTHAMER, R. Does degradation of DNA in dead *Trichogramma* individuals lead to failure of their identification using PCR? **Proceedings of the Section Experimental and Applied Entomology**, v. 11, p. 33-36, 2000.

CIOCIOLA JUNIOR, A. C.; ZUCCHI, R. A.; STOUTHAMER, R. Molecular Key to seven Brazilian species of *Trichogramma* (Hymenoptera: Trichogrammatidae) Using sequences of the ITS2 region and restriction analysis. **Neotropical Entomology**, v. 30, p. 259-262, 2001.

CRUICKSHANK, R. H. Molecular markers for the phylogenetics of mites and ticks. **Systematic & Applied Acarology**, v. 7, p. 3-14, 2002.

DAVIES, A. P.; LANGE, C. L.; O'NEILL, S. L. A Rapid Single-Step Multiplex Method for Discriminating Between *Trichogramma* (Hymenoptera: Trichogrammatidae) Species in Australia. **Journal of Economic of Entomology**, v. 99, n. 6, p. 2142-2145, 2006.

DEM'YANCHUK, N. P.; OBLAP, R. V.; NOVAK, N. B.; MEL'NICHUK, M. D. Molecular-Genetics Study of Entomophages of the Genus *Trichogramma* Westw. **Cytology and Genetics**, v. 42, n. 4, p. 263-266, 2008.

ERCAN, F. S.; ATES, M. A.; ÖZTEMİZ, S. rDNA-ITS2 characterization of *Trichogramma* species (Hymenoptera: Trichogrammatidae) in Turkey. **Egyptian Journal of Biological Pest Control**, v. 32, p. 1-7, 2022.

ESPAÑA-LUNA, M. P.; GONZÁLEZ-HERNÁNDEZ, A.; ALVARADO-GÓMEZ, O. G.; LOZANO-GUTIÉRREZ, J. Identificación molecular de especies crípticas de *Trichogramma* Westwood (Hymenoptera: Trichogrammatidae) de importancia agrícola en México. **Acta Zoológica Mexicana**, v. 24, n. 1, p. 1-14, 2008.

FENTON, B.; MALLOCH, G.; MOXEY, E. Analysis of eriophyid mite rDNA internal transcribed spaces sequences reveals variable simple sequence repeats. **Insect Molecular Biology**, v. 6, p. 23-32, 1997.

GRENIER, S. Rearing of *Trichogramma* and other egg parasitoids on artificial diet. In: WAJNBERG, E.; HASSAN, S. A. (ed.). **Biological control with egg parasitoids**. Wallingford: CAB International, 1994. p. 73-92.

HALL, T. A. BioEdit: A User-Friendly Biological Sequence Alignment Editor and Analysis Program for Windows 95/98/NT. **Nucleic Acids Symposium Series**, v. 41, p. 95-98, 1999.

HASSAN, S. A. Introduction to the "Effectiveness and Assessment" session. **Les Colloq del'INRA**, v. 73, p. 107-111, 1995.

HASSAN, S. A. Strategies to select *Trichogramma* species for use in biological control. In: WAJNBERG, E.; HASSAN, S. A. (ed.). **Biological Control with Egg Parasitoids**. Wallingford: CAB International, 1994. p. 55-71.

HEIMAN, M. Webcutter 2.0. 1997. Disponível em <http://www.firstmarket.com/cutter/cut2.html>.

HILLIS, D. M.; DIXON, M. T. Ribosomal DNA: molecular evolution and phylogenetic inference. **The Quarterly Review of Biology**, v. 66, p. 411-453, 1991.

- HONDA, J. Y.; TAYLOR, L.; RODRIGUEZ, J.; YASHIRO, N.; HIROSE, Y. A taxonomic review of the Japanese *Trichogramma* (Hymenoptera: Trichogrammatidae) with descriptions of three new species. **Applied Entomology and Zoology**, v. 41, n. 2, p. 247-267, 2006.
- HSIAO, C.; CHATTERTON, N. J.; ASAY, K. H.; JENSEN, K. B. Phylogenetic relationships of 10 grass species: an assessment of phylogenetic utility of the internal transcribed spacer region in nuclear ribosomal DNA in monocots. **Genome**, v. 37, p. 112-120, 1994.
- HUIGENS, M. E.; ALMEIDA, R. P.; BOONS, P. A. H.; LUCK, R. F.; STOUTHAMER, R. Natural interspecific and intraspecific horizontal transfer of parthenogenesis - inducing *Wolbachia* in *Trichogramma* wasps. **Proceedings of the Royal Society of London - Series B: Biological Sciences**, v. 271, n. 1538, p. 509-515, 2004.
- HUIGENS, M. E.; LUCK, R. F.; KLAASSEN, R. H. G.; MAAS, M. F. P. M.; TIMMERMANS, M. J. T. N.; STOUTHAMER, R. Infectious parthenogenesis. **Nature**, v. 405, p. 178-179, 2000.
- IVEZIĆ, A.; RUGMAN-JONES, P.; STOUTHAMER, R.; IGNJATOVIĆ-ČUPINA, A. Molecular identification of *Trichogramma* egg parasitoids of *Ostrinia nubilalis* in northeastern Serbia. **Archives of Biological Sciences**, v. 70, n. 3, p. 425-432, 2018.
- JEONG, G.; KIM, H.; CHOI, Y.; KIM, W.; PARK, K.; BAE, S.; KIM, J.; CHOI, J. Molecular identification of two *Trichogramma* species (Hymenoptera: Trichogrammatidae) in Korea. **Journal of Asia-Pacific Entomology**, v. 13, p. 41-44, 2010.
- KAN, F. J. P. M. van; SILVA, I. M. M. S.; SCHILTHUIZEN, M.; PINTO, J. D.; STOUTHAMER, R. Use of DNA-based methods for the identification of minute wasps of the genus *Trichogramma*. **Proceedings of the Section Experimental and Applied Entomology**, v. 7, p. 233-238, 1996.
- KAN, F. J. P. M. van; HONDA, J.; PINTO, J. D.; STOUTHAMER, R. Molecular based techniques for *Trichogramma* identification. **Proceedings of the Section Experimental and Applied Entomology**, v. 8, p. 59-62, 1997.

KAZMER, D. J. Isoelectric focusing procedures for the analysis of allozymic variation in minute arthropods. **Annals of the Entomological Society of America**, v. 84, p. 332-339, 1991.

KIMURA, M. A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. **Journal of Molecular Evolution**, v. 16, p. 111-120, 1980.

KNUTSON, A. **The Trichogramma manual**. Texas: Texas A&M University, 1998. 42 p. (Texas Agricultural Extension Service Bulletins).

KOCA, A. S.; İMREN, M.; KÜTÜK, H. Determination of the Genetic Variation within the Egg Parasitoid, *Trichogramma brassicae*, Bezdenko (Hymenoptera: Trichogrammatidae) Populations in Düzce Province, Turkey. **International Journal of Agriculture and Wildlife Science**, v. 4, n. 1, p. 26-32, 2018.

KOSTADINOV, D.; PICTUREAU, B. A possibility to discriminate females of three closely related species of *Trichogramma* (Hymenoptera: Trichogrammatidae) with special purpose analysis of the type of *Trichogramma evanescens* Westwood. **Annales de la Société Entomologique de France**, v. 27, p. 393-400, 1991.

KOT, J. Experiments in the biology and ecology of species of the genus *Trichogramma* Westw. and their use in plant protection. **Ekologia Polska - Series A**, n. 15, p. 243-303, 1964.

KUMAR, S.; STECHER, G.; LI, M.; KNYAZ, C.; TAMURA, K. MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across computing platforms. **Molecular Biology and Evolution**, v. 35, p. 1547-1549, 2018.

KUMAR, G. A.; JALALI, S. K.; VENKATESAN, T.; STOUTHAMER, R.; NIRANJANA, P.; LALITHA, Y. Internal transcribed spacer-2 restriction fragment length polymorphism (ITS-2-RFLP) tool to differentiate some exotic and indigenous trichogrammatid egg parasitoids in India. **Biological Control**, v. 49, p. 207-213, 2009.

LANDRY, B. S.; DEXTRAZE, L.; BOIVIN, G. Random amplified polymorphic DNA markers for DNA fingerprinting and genetic variability assessment of minute parasitic wasp species (Hymenoptera: Mymaridae and

Trichogrammatidae) used in biological control programs of phytophagous insects. **Genome**, v. 36, p. 580-587, 1993.

LARKIN, M. A.; BLACKSHIELDS, G.; BROWN, N. P.; CHENNA, R.; MCGETTIGAN, P. A.; MCWILLIAM, H.; VALENTIN, F.; WALLACE, I. M.; WILM, A.; LOPEZ, R.; THOMPSON, J. D.; GIBSON, T. J.; HIGGINS, D. G. Clustal W and Clustal X Versions 2.0. **Bioinformatics**, v. 23, p. 2947-2948, 2007.

LI, Z-I.; ZHENG, L.; SHEN, Z-R. Using internally transcribed spacer 2 sequences to re-examine the taxonomic status of several cryptic species of *Trichogramma* (Hymenoptera: Trichogrammatidae). **European Journal of Entomology**, v. 101, p. 347-358, 2004.

LIU, Y-D.; HOU, M-L.; SONG, K. Molecular identification of *Trichogramma* species from South and South-East Asia and natural *Wolbachia* infection. **Entomologica Fennica**, v. 28, p. 57-66, 2017.

LUCK, R. F.; STOUTHARNER, R.; NUNNEY, L. Sex determination and sex ratio patterns in parasitic hymenoptera. In: WRENCH, D. L.; EBBERT, M. A. (ed.). **Evolution and diversity of sex ratio in haplodiploid insects and mites**. New York: Chapman and Hall, 1992. p. 442-476.

MEKSEM, K.; KAHL, G. **The handbook of Plant Genome Mapping: genetic and physical mapping**. Weinheim: Wiley-VCH, 2005.

NAGARKATTI, S.; NAGARAJA, H. Biosystematic studies on *Trichogramma* species I. Experimental hybridization between *Trichogramma australicum*, *T. evanescens* and *T. minutum*. **Technical Bulletin, Commonwealth Institute of Biological Control**, v.10, p. 81-96, 1968.

NAGARKATTI, S.; NAGARAJA, H. Redescription of some known species of *Trichogramma*, showing the importance of male genitalia as a diagnostic character. **Bulletin of Entomological Research**, v. 61, p. 13-31, 1971.

NASIR, M. F.; HAGEDORN, G.; BÜTTNER, C.; REICHMUTH, C.; SCHÖLLER, M. Molecular identification of *Trichogramma* species from Pakistan, using ITS-2 region of DNAr. **Biological Control**, v. 58, p. 483-491, 2013.

OOSTERHOUT, C. van; HEUVEN, M. K. van; BRAKEFIELD, P. M. On the neutrality of molecular genetic markers: pedigree analysis of genetic variation in fragmented populations. **Molecular Ecology**, v. 13, n. 5, p. 1025-1034, 2004.

ORREGO, C.; AGUDELO-SILVA, F. Genetic variation in the parasitoid wasp *Trichogramma* (Hymenoptera, Trichogrammatidae) revealed by DNA amplification of a section of the nuclear ribosomal repeat. **The Florida entomologist**, v. 76, p. 519- 524, 1993.

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

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

PINTO, J. D. The systematics of the North American species of *Trichogramma* (Hymenoptera: Trichogrammatidae). **Memoirs of the Entomological Society of Washington**, v. 22, p. 1-287, 1999.

PINTO, J. D.; KOOPMANSCHAP, A. B.; PLATNER, G. R.; STOUTHAMER, R. The North American *Trichogramma* (Hymenoptera: Trichogrammatidae) parasitizing certain Tortricidae (Lepidoptera) on apple and pear, with ITS2 DNA characterizations and description of a new species. **Biological Control**, v. 23, p. 134-142, 2002.

PINTO, J. D.; PLATNER, G. R.; SASSAMAN, C. A. Electrophoretic study of two closely related of North American *Trichogramma*: *T. pretiosum* and *T. deion*. **Annals of the Entomological Society of America**, v. 86, p. 702-709, 1993.

PINTO, J. D.; VELTEN, R. K.; PLATNER, G. R.; OATMAN, E. R. Phenotypic plasticity and taxonomic characters in *Trichogramma*. **Annals of the Entomological Society of America**, v. 85, p. 413-422, 1989.

PINTO, J. D.; KAZMER, D. J.; PLATNER, G. R.; SASSAMAN, C. A. Taxonomy of the *Trichogramma minutum* complex (Hymenoptera: Trichogrammatidae): allozymic variation and its relationship to reproductive

and geographic data. **Annals of the Entomological Society of America**, v. 85, p. 413-422, 1992.

PINTO, J. D.; STOUTHAMER, R. Systematics of the Trichogrammatidae with emphasis on *Trichogramma*. In: WAJNBERG, E.; HASSAN, S. A. (ed.). **Biological Control with Egg Parasitoids**. Wallingford: CAB International, 1994. p. 1-36.

PINTO, J. D.; STOUTHAMER, R.; PLATNER, G. R. A new cryptic species of *Trichogramma* (Hymenoptera: Trichogrammatidae) from the Mojave desert of California as determined by morphological, reproductive and molecular data. **Entomological Society of Washington**, v. 99, p. 238-247, 1997.

PINTO, J. D.; STOUTHAMER, R.; PLATNER, G. R.; OATMAN, E. R. Variation in reproductive compatibility in *Trichogramma* and its taxonomic significance (Hymenoptera: Trichogrammatidae). **Annals of the Entomological Society of America**, v. 84, p. 37-46, 1991.

PINTUREAU, B. Enzymatic analysis of the genus *Trichogramma* (Hym.: Trichogrammatidae) in Europe. **Entomophaga**, v. 38, p. 411-431, 1993.

PINTUREAU, B. Indices d'isolement reproductif entre espèces proches de Trichogrammes (Hym.: Trichogrammatidae). **Annales de la Société Entomologique de France**, v. 27, p. 379-392, 1991.

PINTUREAU, B.; BABAUULT, M. Caractérisation enzymatique de *Trichogramma evanescens* et de *T. maidis* (Hym., Trichogrammatidae); étude des hybrides. **Entomophaga**, v. 26, p. 11-22, 1981.

PINTUREAU, B.; BABAUULT, M. Comparaison des estérases chez 19 souches de *Trichogramma* (Hym., Trichogrammatidae) appartenant au groupe d'espèces *evanescens*. **Archives de Zoologie Expérimentale et Générale**, v. 121, p. 249-260, 1980.

PINTUREAU, B.; BABAUULT, M. Comparaison des enzymes chez 10 souches de *Trichogramma* (Hym., Trichogrammatidae). **Les Colloq del'INRA**, v. 9, p. 31-44, 1982.

PINTUREAU, B.; KEITA, F. B. Nouvelles données sur les estérases des *Trichogrammes*. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 17, p. 603-608, 1989.

PLATNER, G. R.; VELTEN, R. K.; PLANOUTENE, M.; PINTO, J. D. Slide-mounting techniques for *Trichogramma* (Trichogrammatidae) and other minute parasitic Hymenoptera. **Entomological News**, v. 110, p. 56-64, 1999.

POLASZEK, A.; RUGMAN-JONES, P. F.; STOUTHAMER, R.; HERNANDEZ-SUAREZ, E.; CABELLO, T.; PÉREZ, M. del P. Molecular and morphological diagnoses of five species of *Trichogramma*: biological control agents of *Chrysodeixis chalcites* (Lepidoptera: Noctuidae) and *Tuta absoluta* (Lepidoptera: Gelechiidae) in the Canary Islands. **BioControl**, v. 57, p. 21-35, 2012.

POORJAVAD, N.; GOLDANSAZ, S. H.; MACHTELINCKX, T.; TIRRY, L.; STOUTHAMER, R.; THOMAS, van L. Iranian *Trichogramma*: ITS2 DNA characterization and natural Wolbachia infection. **BioControl**, v. 57, p. 361-374, 2012.

POST, R. J.; FLOOK, P. K.; MILLEST, A. L. Methods for the preservation of insects for DNA studies. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 21, p. 85-92, 1993.

QUERINO, R. B.; ZUCCHI, R. A. Annotated checklist and illustrated key to the species of *Trichogramma* Westwood (Hymenoptera: Trichogrammatidae) from South America. **Zootaxa**, v. 134, p. 201-231, 2019.

QUERINO, R. B.; ZUCCHI, R. A. New species of *Trichogramma* Westwood (Hymenoptera: Trichogrammatidae) associated with lepidopterous eggs in Brazil. **Zootaxa**, v. 163, p. 1-10, 2003a.

QUERINO, R. B.; ZUCCHI, R. A. Six new species of *Trichogramma* Westwood (Hymenoptera: Trichogrammatidae) from a Brazilian forest reserve. **Zootaxa**, v. 4656, n. 2, 134, p. 1-11, 2003b.

RIJSWIJK, M. van; HEIJDEN R. van der; JONGEMA, Y.; STOUTHAMER, R. Occurrence and molecular identification of the Dutch *Trichogramma* species. **Proceedings of the Section Experimental and Applied Entomology**, v. 11, p. 67-71, 2000.

- SAMARA, R.; MONJE, J. C.; REINEKE, A.; ZEBITZ, C. P. W. 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.; ALMEIDA, R. P. de; PADILHA, I. Q. M.; ARAÚJO, D. A. M.; CREÃO-DUARTE, A. J. Molecular identification of *Trichogramma* species from regions in Brazil using the sequencing of the ITS2 region of ribosomal DNA. **Brazilian Journal of Biology**, v. 75, n. 2, p. 391-395, 2015.
- SAPPAL, N. P.; JENG, R. S.; HUBBES, M.; LIU, F. Restriction fragment length polymorphisms in polymerase chain reaction amplified ribosomal DNAs of three *Trichogramma* (Hymenoptera: Trichogrammatidae) species. **Genome**, v. 38, p. 419-425, 1995.
- SCHILTHUIZEN, M.; STOUTHAMER, R. Horizontal transmission of parthenogenesis inducing microbes in *Trichogramma* wasps. **Proceedings of the Royal Society of London - Series B**, v. 264, p. 361-366, 1997.
- SILVA, I. M. M. S.; HONDA, J.; KAN, F. van; HU, J.; LUIS NETO, P. B.; STOUTHAMER, R. Molecular differentiation of five *Trichogramma* species occurring in Portugal. **Biological Control**, v. 16, p. 177-184, 1999.
- SILVA, R. B. Q. **Taxonomia do gênero *Trichogramma* Westwood 1833 (Hymenoptera: Trichogrammatidae) na América do Sul**. 2002. 214 f. Tese (Doutorado em Entomologia) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, SP.
- SMITH, S. M. Methods and timing of releases of *Trichogramma* to control lepidopterous pest. In: WAJNBERG, E.; HASSAN, S. A. (ed.). **Biological control with egg parasitoids**. Wallingford: CAB International, 1994. p. 113-144.
- STOUTHAMER, R. Wolbachia-induced parthenogenesis. In: O'NEILL, S.; WERREN, J. H.; HOFFMANN, A. A. (ed.). **Influential Passengers: inherited microorganisms and arthropod reproduction**. New York: Oxford University Press, 1997. p. 102-124.
- STOUTHAMER, R.; BREEUWER, J. A. J.; HURST, G. D. D. *Wolbachia pipientis*: microbial manipulator of arthropod reproduction. **Annual Review of Microbiology**, v. 53, p. 71-102, 1999a.

STOUTHAMER, R.; BREEUWER, J. A. J.; LUCK, R. F.; WERREN, J. H. Molecular identification of microorganisms associated with parthenogenesis. **Nature**, v. 361, p. 66-68, 1993.

STOUTHAMER, R.; HU, J.; KAN, F. van; PLATNER, G. R.; PINTO, J. D. The utility of internally transcribed spacer 2 DNA sequences of the nuclear ribosomal gene for distinguishing sibling species of *Trichogramma*. **BioControl**, v. 43, p. 421- 440, 1999b.

STOUTHAMER, R.; GAI, Y.; KOOPMANSCHAP, A. B.; PLATNER, G. R.; PINTO, J. D. ITS-2 sequences do not differ for the closely related species *Trichogramma minutum* and *T. platneri*. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v. 95, p. 105-111, 2000.

STOUTHAMER, R.; LUCK, R.F; HAMILTON, W.D. Antibiotics cause parthenogenetic *Trichogramma* to revert to sex. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 87, p. 2424-2427, 1990a.

STOUTHAMER, R.; PINTO, J. D.; PLATNER, G. R.; LUCK, R. F. Taxonomic status of thelytokous forms of *Trichogramma* (Hymenoptera: Trichogrammatidae). **Annals of the Entomological Society of America**, v. 83, p. 475-581, 1990b.

SUMER, F.; TUNCBILEK, A. S.; OZTEMIZ, S.; PINTUREAU, B.; RUGMAN-JONES, P. F.; STOUTHAMER, R. A molecular key to the common species of *Trichogramma* of the Mediterranean region. **Biological Control**, v. 54, p. 617-624, 2009.

THOMPSON, J. D.; GIBSON, T. J.; PLEWNIAK, F.; JEANMOUGIN, F.; HIGGINS, D. G. The CLUSTAL\_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. **Nucleic Acids Research**, v. 25, p. 4876-4882, 1997.

THOMSON, L. J.; RUNDLE, B. J.; CAREW, M. E.; HOFFMANN, A. A. Identification and characterization of *Trichogramma* species from south-eastern Australia using the internal transcribed spacer 2 (ITS-2) region of the ribosomal gene complex. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v. 106, n. 3, p. 235-240, 2003.

VANLERBERGHE-MASUTTI, F. Genetic identification and phylogeny of parasitic wasp (Hymenoptera: Trichogrammatidae) species by mitochondrial DNA RFLP and RAPD markers. **Insect Molecular Biology**, v. 3, p. 229-237, 1994.

VIANA, J. B. V.; QUERINO, R. B.; CARVALHO, L. C. B.; LIMA, P. S. C. Sequence analysis of the internal transcribed spacer 2 (ITS2) region of rDNA for identifying *Trichogramma* species and evaluating genetic diversity. **Brazilian Journal of Biology**, v. 81, n. 4, p. 928-933, 2021.

VOGLER, A. P.; DE SALLE, R. Evolution and phylogenetic information content of the ITS-1 region in the tiger beetle *Cincidela dorsalis*. **Molecular Biology and Evolution**, v. 11, p. 393-405, 1994.

WAHNER, N.; ADDISON, M. F.; TIMM, A. E. DNA sequence analysis of the internal transcribed spacer 2 (ITS 2) region as tool for molecular identification of *Trichogrammatoidea lutea* (Girault) and *Trichogrammatoidea cryptophlebiae* (Nagaraja) (Hymenoptera: Trichogrammatidae). **African Plant Protection**, v. 14, p. 8-14, 2008.

WALSH, P. S.; METZGAR, D. A.; HIGUCHI, R. Chelex-100 as a medium for simple extraction of DNA for PCR-based typing from forensic material. **BioTechniques**, v. 10, p. 506-513, 1991.

WERREN, J. H. Biology of *Wolbachia*. **Annual Review of Entomology**, v. 42, p. 587-609, 1997.

WERREN, J. H.; WINDSOR, D. M. *Wolbachia* infection frequencies in insects: evidence of a global equilibrium? **Proceedings of the Royal Society of London - Series B: Biological Sciences**, v. 267, n. 1450, p. 1277-1285, 2000.

WERREN, J. H.; ZHANG, W.; GUO, L. R. Evolution and phylogeny of *Wolbachia*: reproductive parasites of arthropods. **Proceedings of the Royal Society of London - Series B**, v. 261, n. 1360, p. 55-71, 1995.

WEST, S. A.; COOK, J. M.; WERREN, J. H.; GODFRAY, C. J. *Wolbachia* in two insect host parasitoid communities. **Molecular Ecology**, v. 7, n. 11, p. 1457-1465, 1998.

ZUCCHI, R. A.; MONTEIRO, R. C. O gênero *Trichogramma* na América do Sul. In: PARRA, J. R. P.; ZUCCHI, R. A. (ed.). ***Trichogramma e o controle biológico aplicado***, Piracicaba: Fealq, 1997. p. 41-66.

