

**Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”**

Regulação da microbiota intestinal de hospedeiros permissivo e não-permissivo por *Cotesia flavipes* (Cameron) (Hymenoptera: Braconidae)

Nathalia Cavichioli de Oliveira

Dissertação apresentada para obtenção do título de
Mestra em Ciências. Área de concentração: Entomologia

**Piracicaba
2015**

Nathalia Cavichioli de Oliveira
Bacharel em Ciências Biológicas

Regulação da microbiota intestinal de hospedeiros permissivo e não-permissivo por
***Cotesia flavipes* (Cameron) (Hymenoptera: Braconidae)**

Orientador:
Prof. Dr. **FERNANDO LUIS CÔNSOLI**

Dissertação apresentada para obtenção do título de
Mestra em Ciências. Área de concentração: Entomologia

Piracicaba
2015

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
DIVISÃO DE BIBLIOTECA - DIBD/ESALQ/USP**

Oliveira, Nathalia Cavichioli de
Regulação da microbiota intestinal de hospedeiros permissivo e não-permissivo por
Cotesia flavipes (Cameron) (Hymenoptera: Braconidae) / Nathalia Cavichioli de Oliveira. - -
Piracicaba, 2015.
94 p. : il.

Dissertação (Mestrado) - - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz".

1. Ecologia microbiana 2. Holobioma 3. Parasitoide 4. Regulação hospedeira
5. Simbiontes I. Título

CDD 595.798
O48r

“Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte – O autor”

DEDICATÓRIA

A quem mais poderia dedicar a não ser ao Autor da vida? Àquele que dá sabedoria ao coração e entendimento à mente do homem (Jo 38:36)? Àquele que deu tudo o que tenho e a quem tem tudo o que eu sou em Suas mãos,
Ao meu amado, ao meu Deus.

AGRADECIMENTOS

Ao meu Deus, que me deu o privilégio de ingressar e concluir este mestrado e que presenteou com cada pessoa, cada suprimento, cada detalhe ao longo de todo o curso. Ao Único digno de toda honra, glória e louvor. A Ele toda minha gratidão.

Aos meus pais por todo apoio, sábios conselhos e instrução, pelas orações incessantes, pelo cuidado e amor, pelo conforto nos momentos difíceis, pela maravilhosa amizade, sustento e por todos os sacrifícios feitos em amor por nós.

Ao meu irmão, pelo amor e demonstrações dele, pelo constante companherismo, amizade e cumplicidade.

Aos meus avós por todo amor, preocupação e cuidado sempre presentes, mesmo estando distantes, e por todas orações perseverantes.

À Aliança Bíblica Universtaria (ABU) pela amizade e orações em tempos bons e ruins.

Aos meus líderes, amigos e irmãos da Comunidade Restauração pela indispensável participação em minha vida como canais de Deus.

Ao meu orientador Prof. Dr. Fernando Luís Cònsoli, pela excelente orientação durante todo o curso de Mestrado, pela paciência e dedicação em ensinar e pelo exemplo de profissional que se tornou para mim.

Ao Felipe Domingues por me auxiliar inicialmente na dissecação das lagartas.

Ao Daniel, à Bruna, ao Laboratório de Resistência de Artrópodes a Táticas de Controle e ao Laboratório de Biologia de Insetos, em especial à Neide pelas dicas de criação e fornecimento de insetos.

À Aline Guidolin, Antônio Rogério Nascimento, Horácio Montenegro e Lucas Dantas pelo imprescindível auxílio nas análises de bioinformática.

À todos os meus colegas de laboratório, pelo auxílio, companhia, cafés e bate-papos.

Ao Laboratório de Radioentomologia do CENA, pela irradiação de insetos, em especial ao Prof. Dr. Walter Arthur, por ceder seu laboratório e equipamentos, e à técnica de laboratório Lia Costa, pela atenção e excelente execução de seu trabalho.

À todos os professores que ministraram as excelentes disciplinas que cursei e à todos os colegas que nelas me acompanharam.

Ao Departamento de Entomologia e Acarologia da ESALQ-USP, por todo suporte e orientação.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes) pelo fornecimento da bolsa e à FAPESP por fornecer apoio financeiro (Projeto FAPESP 2011/50877-0) para a condução desse projeto.

EPÍGRAFE

“Confie no Senhor de todo o seu coração,
E não se apoie em seu próprio entendimento.
Reconhece-o em todos os seus caminhos,
E ele endireitará as suas veredas.
Não seja sábio a seus próprios olhos;
Tema ao Senhor e evite o mal.
Isso dará a você saúde ao corpo,
E vigor aos ossos.”

Provérbios 3:5-8.

SUMÁRIO

RESUMO	11
ABSTRACT	13
1 INTRODUÇÃO.....	15
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	19
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	31
3.1 Criações de insetos	31
3.2 Efeito do parasitismo por <i>C. flavipes</i> na microbiota intestinal de hospedeiros permissivo e não-permissivo	32
3.3 Verificação do efeito das secreções maternas na regulação da microbiota intestinal do hospedeiro	33
3.4 Extração de DNA, amplificação e sequenciamento da região V4 do 16S rRNA.....	33
3.5 Análises das sequências.....	34
4 RESULTADOS	37
4.1 Efeito do parasitismo por <i>Cotesia flavipes</i> na microbiota intestinal do hospedeiro permissivo <i>Diatraea saccharalis</i>	37
4.2 Efeito do parasitismo por <i>Cotesia flavipes</i> na microbiota intestinal do hospedeiro não-permissivo <i>Spodoptera frugiperda</i>	45
4.3 Efeitos das secreções maternas na regulação da microbiota do hospedeiro permissivo	50
4.4 Efeitos das secreções maternas na regulação da microbiota do hospedeiro não-permissivo	54
5 DISCUSSÃO.....	57
6 CONCLUSÕES.....	61
REFERÊNCIAS	63
ANEXOS.....	77

RESUMO

Regulação da microbiota intestinal de hospedeiros permissivo e não-permissivo por *Cotesia flavipes* (Cameron) (Hymenoptera: Braconidae)

Parasitoides interferem no sistema imunológico de seus hospedeiros, influenciando a expressão de genes relacionados à resposta celular e humoral, podendo interferir na relação hospedeiro - microbiota intestinal. Além disso, parasitoides induzem alterações fisiológicas no hospedeiro que alteram o consumo e a utilização de alimento, e que podem influenciar a microbiota intestinal do mesmo. Alterações nessa microbiota poderiam afetar as relações e contribuições ao hospedeiro e, conseqüentemente, influenciar o desenvolvimento do próprio parasitoide. O objetivo deste trabalho foi o de verificar o efeito do parasitismo por *Cotesia flavipes* (Cameron) (Hymenoptera: Braconidae) na estrutura e no potencial funcional de contribuição da microbiota intestinal de *Diatraea saccharalis* (F.) (Lepidoptera: Crambidae), hospedeiro permissivo, e de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae), hospedeiro não-permissivo. Além disso, buscou-se verificar se as secreções utilizadas pelo parasitoide (veneno, fluidos do cálice e vírus simbiote) na regulação hospedeira estariam associadas à manipulação da microbiota intestinal do hospedeiro. O efeito do parasitismo na microbiota intestinal associada às porções antero-mediana e posterior do intestino dos hospedeiros estudados foi avaliado na fase inicial (1 DAP – dia após o parasitismo), intermediária (5 DAP) e final (9 DAP) do desenvolvimento larval do parasitoide. A avaliação foi feita por meio da comparação da diversidade e abundância de bactérias associadas ao trato intestinal de *D. saccharalis* e *S. frugiperda* parasitadas ou não por *C. flavipes*. A caracterização das bactérias foi feita via análise metagenômica em plataforma Illumina MiSeq utilizando a região V4 do gene ribossomal 16S. O pacote de softwares QIIME foi utilizado para a atribuição taxonômica das mesmas e o potencial funcional foi inferido por meio do software PICRUSt. O parasitismo afetou a abundância e diversidade de unidades taxonômicas operacionais (UTOs) da microbiota intestinal da porção antero-mediana e posterior de ambos hospedeiros. As alterações observadas para as duas regiões intestinais investigadas não seguiram o mesmo padrão ao longo do desenvolvimento do parasitoide. As análises realizadas também demonstraram que as alterações da microbiota induzidas pelo parasitismo refletiram em alterações significativas no potencial funcional de contribuição da microbiota associada ao trato digestivo de *D. saccharalis* e *S. frugiperda*. As análises da microbiota de lagartas pseudo-parasitadas demonstraram que as secreções maternas injetadas pela fêmea do parasitoide no momento do parasitismo estão envolvidas, pelo menos parcialmente, com os processos que levam às modificações na diversidade e abundância da microbiota intestinal hospedeira, assim como de seu potencial de contribuição funcional. Esses resultados indicam que outros fatores/alterações produzidos em condições normais de parasitismo, seja pela influência de secreções de teratócitos e das próprias larvas do parasitoide em desenvolvimento também estão envolvidos na manipulação da microbiota hospedeira. Várias das alterações observadas no potencial de contribuição da microbiota intestinal do hospedeiro podem refletir sua qualidade nutricional e, conseqüentemente, favorecer sua exploração pelo parasitoide. Assim, o processo de regulação hospedeira por parasitoides se estende ao conjunto de organismos associados que compõem o holobionte representado pela lagarta hospedeira.

Palavras-chave: Ecologia microbiana; Holobioma; Parasitoide; Regulação hospedeira; Simbiontes

ABSTRACT

Regulation of the gut microbiota of permissive and non-permissive hosts parasitized by *Cotesia flavipes* (Cameron) (Hymenoptera: Braconidae)

Parasitoids interfere with the immune system of their hosts by influencing the expression of genes related to cellular and humoral responses, which may interfere with the host - gut microbiota relationship. Furthermore, parasitoids induce physiological changes in the host, modifying food consumption and utilization, influencing then the host gut microbiota. These changes can affect the relationship and contributions of the gut microbiota to the host and therefore influence parasitoid development. This study aimed to evaluate the effect of parasitism by *Cotesia flavipes* (Cameron) (Hymenoptera: Braconidae) in the structure and potential functional contribution of the gut microbiota of the permissive host *Diatraea saccharalis* (F.) (Lepidoptera: Crambidae) and the non-permissive host *Spodoptera frugiperda* (JE Smith) (Lepidoptera: Noctuidae). In addition, the participation of the secretions female parasitoids (venon, calyx fluid and symbiotic virus) use in host regulation in the manipulation of the host gut microbiota was also investigated. The effects of host parasitization on the microbiota associated with the anterior (foregut-midgut) and posterior (hindgut) portions of host gut were evaluated at the early (1 DAP - day after parasitism), intermediate (5 DAP) and final (9 DAP) stages of parasitoid larval development. The diversity and abundance of the gut microbiota of *D. saccharalis* and *S. frugiperda* was compared in between parasitized and non-parasitized larvae by *C. flavipes*. The gut microbiota was characterized by sequencing the V4 region of the 16S ribosomal gene using the Illumina MiSeq platform. The software package QIIME was used for taxonomic attribution and the PICRUSt software was used to infer the potential functional contribution of the gut microbiota. Host parasitization affected the abundance and diversity of operational taxonomic units (OTUs) of the two gut regions investigated (foregut-midgut and hindgut) in both hosts. The changes observed for both gut regions did not follow the same pattern throughout parasitoid development. Changes in the gut microbiota induced by parasitization reflected in significant changes in the potential of the functional contribution of the gut microbiota associated with *D. saccharalis* and *S. frugiperda*. Analyses of pseudo-parasitized larvae demonstrated that the maternal secretions female parasitoids inject when ovipositing are involved, at least partially, with the processes that lead to changes in the abundance, diversity and potential functional contribution of the host gut microbiota. These results indicate that other factors / changes produced during normal parasitization, such as secretions from teratocytes and/or the developing parasitoid larvae can also be involved in the manipulation of host gut microbiota. Several of the changes observed in the potential contribution of the host gut microbiota may reflect its nutritional quality and therefore favor host exploitation by parasitoids. Thus, the process of host regulation by parasitoids also involves the regulation of the gut-associated bacteria, which altogether comprise the holobionte represented by the host larvae.

Keywords: Holobiome; Host regulation; Microbial ecology; Parasitoid; Symbionts

1 INTRODUÇÃO

Ecossistemas são compostos por complexas interações e inter-relações entre seres vivos, de forma que a modificação em um elo pode afetar, direta ou indiretamente, os demais elos dessa cadeia de interações. O termo simbiose (do grego *syn*, juntos, e *bios*, vida) é empregado para descrever qualquer interação entre espécies (DE BARY, 1879). Dentro deste conceito destacam-se as associações de microrganismos com organismos multicelulares, que recentemente tem ganhado maior destaque devido às crescentes descobertas do papel de simbiontes nas diversas relações ecológicas e multitróficas de seus hospedeiros (MORAN, 2006). Estudos nessa área têm sido facilitados pelo desenvolvimento de novas técnicas de sequenciamento (BRAGG; TYSON, 2014), que ampliam a compreensão da diversidade e complexidade de comunidades microbianas, desfazendo, com isso, um conceito até então bem estabelecido, o de indivíduo (GILBERT; SAPP; TAUBER, 2012; GUERRERO; MARGULIS; BERLANGA, 2013). Assim, o funcionamento do indivíduo e as suas respostas ao ambiente são agora abordados de forma holística, incluindo as relações estabelecidas entre o indivíduo e os simbiontes a ele associados, passando o indivíduo a ser definido por holobionte (GILBERT; SAPP; TAUBER, 2012; GUERRERO; MARGULIS; BERLANGA, 2013). O termo holobionte foi inicialmente proposto por Mindell (1992) para descrever a natureza composta de espécies associadas a simbiontes primários. Essa definição foi posteriormente estendida às interações do organismo a todos os simbiontes a ele associados (MARGULIS, 1993).

Insetos são amplamente utilizados como modelo no estudo de simbiose, pois estabelecem diversos tipos de associações com microrganismos, de facultativas a obrigatórias, que podem ser imprescindíveis à sua sobrevivência e aptidão biológica (BOURTZIS; MILLER, 2003). O intestino de insetos, por exemplo, é um ambiente rico nessas associações, principalmente as de caráter facultativo, pois a aquisição da maioria dos microrganismos da microbiota intestinal se dá pela sua ingestão a cada geração (DILLON; DILLON, 2004; ENGEL; MORAN, 2013). Bactérias associadas ao trato digestivo de insetos, assim como em humanos, podem influenciar em diversos processos fisiológicos hospedeiro (DILLON, 2004; CLEMENT et al., 2012; DILLON; ENGEL; MORAN, 2013). A microbiota intestinal de insetos pode contribuir com os processos de digestão e utilização do alimento via produção de enzimas digestivas (ANAND et al., 2010; KRISHNAN et al., 2014) e detoxificação de xenobióticos (KIKUCHI et al., 2012; ADAMS et al., 2013), além de propiciar a exploração de fontes alimentares subótimas pelo inseto hospedeiro através da produção e liberação de

vitaminas (EICHLER; SCHAUB, 2002), aminoácidos específicos (DOUGLAS, 2006; NIKOH et al., 2011) e ciclagem do nitrogênio (FRENCH; TURNER; BRADBURY, 1976; OHKUMA, et al., 1996; HONGOHO et al., 2008). É observada também a participação da microbiota intestinal nas interações intra e interespecíficas de seu hospedeiro, como o processo de especiação (BRUCKER; BORDENSTEIN, 2013), preferência por parceiros para o acasalamento (SHARON et al., 2001, SHARON et al., 2010), produção de semioquímicos (DILLON; VENNARD; CHARNLEY, 2002; LEROY et al., 2011) e proteção contra patógenos (AZAMBUJA; FEDER; GARCIA, 2003; AZAMBUJA; GARCIA; RATCLIFFE, 2005; CIRIMOTICH et al., 2011; BAHIA et al., 2014).

Para o bom funcionamento das associações microrganismo - inseto hospedeiro, há a necessidade de controle da população de simbioses. Isso se faz necessário para que ela não atinja níveis demasiadamente altos, possivelmente danosos ao hospedeiro, ao mesmo tempo que se torna necessária para evitar a eliminação total de bactérias, mantendo-as em um nível que permita o fornecimento de nutrientes, compostos com atividade antimicrobiana, entre outros benefícios gerados ao hospedeiro (RYU et al., 2010; CHARROUX; ROYET, 2012). Para tal, esta microbiota é regulada por diversos fatores, como as propriedades físico-químicas do intestino (pH e condições redox, por exemplo), do alimento ingerido, presença de enzimas digestivas e desenvolvimento de estruturas especializadas no intestino (DILLON; DILLON, 2004; ENGEL; MORAN, 2013). Outros fatores ligados ao sistema imunológico de insetos, tais como lisozimas (CHAPELLE et al., 2009), espécies reativas de oxigênio (ROS) (LEE et al., 2013) e peptídeos antimicrobianos (RYU et al., 2008; MEISTER et al., 2009), também possuem o mesmo papel (CHARROUX; ROYET, 2012).

Perturbações geradas no hospedeiro pelo ataque de inimigos naturais também podem comprometer o equilíbrio da microbiota associada ao inseto hospedeiro. Foi demonstrado que a supressão do sistema imunológico de *Spodoptera exigua* (Huebner) (Lepidoptera: Noctuidae) após a infecção por baculovírus aumentou a carga bacteriana no intestino do hospedeiro, favorecendo o processo patológico da infecção viral (JAKUBOWSKA; VOGEL; HERRERO, 2013). Apesar de não haver relatos na literatura que demonstrem o efeito de parasitoides na microbiota intestinal de seus hospedeiros, há fortes indícios de que as modificações observadas por baculovírus possam também ocorrer em resposta ao parasitismo por entomófagos, mesmo sem o contato direto do mesmo com o intestino do hospedeiro. Isto se deve ao fato de que quando bem sucedido, o parasitismo ocasiona mudanças na fisiologia hospedeira que podem afetar direta ou indiretamente a microbiota intestinal e, assim, gerar mudanças adicionais no hospedeiro. Numerosos estudos têm mostrado a regulação do sistema

imunológico de hospedeiros por parasitoides, com a inativação de diversas vias de defesa, tais como a IMD por meio da inibição dos fatores de transcrição NF- κ B (BAE; KIM, 2009; BITRA; SUDERMAN; STRAND, 2012). Mas esses fatores de transcrição também estão envolvidos na regulação de populações de simbioses intestinais (CHARROUX; ROYET, 2012). Além disso, alterações comportamentais e fisiológicas induzidas no hospedeiro parasitado, como alteração na preferência (SMILANICH et al., 2011), no consumo e utilização de alimentos (ROSSI et al., 2014), alterações hormonais que influenciam a muda e a metamorfose (PFISTER-WILHELM; LANZREIN, 1996; MAHMOUD et al., 2012), e alterações no metabolismo de nitrogênio e excreção (KAHN; VINSON; MITLIN, 1976), são todas elas alterações em funções fisiológicas que atuam como importantes moduladores da microbiota intestinal (DILLON; DILLON, 2004; BRODERICK; LEMAITRE, 2012; YUN et al., 2014; HAMMER; MCMILLAN; FIERER, 2014).

A capacidade do parasitoide em regular o hospedeiro depende da especificidade da relação hospedeiro-parasitoide. Durante seu curso evolutivo, insetos desenvolveram diversos mecanismos de defesa contra inimigos naturais, ao mesmo tempo que inimigos naturais aprimoraram suas estratégias de parasitismo para permitir a exploração bem sucedida do hospedeiro (ABRAMS, 2000). Parasitoides podem atacar hospedeiros permissivos, aqueles que a prole do parasitoide consegue se estabelecer e se desenvolver, e não-permissivos, aqueles que possuem a capacidade de resistir à colonização pelo imaturo do parasitoide. Dependendo do grupo de parasitoides, o processo de regulação hospedeira pode envolver um arsenal químico e biológico utilizado pelo parasitoide, composto por veneno, vírus simbiote (polidnavírus), teratócitos, fluídos do cálice ovariano e substâncias produzidas pela própria larva do parasitoide (VINSON; IWANTSCH, 1980; BECKAGE; GELMAN, 2004; CÔNSOLI; VINSON, 2009; ASGARI; RIVERS, 2011; STRAND; BURKE, 2013).

Neste estudo buscamos ampliar o conhecimento das relações envolvendo insetos hospedeiros, sua microbiota intestinal e parasitoides, verificando as alterações induzidas na diversidade e no potencial de contribuição funcional da microbiota intestinal de *Diatraea saccharalis* (F.) (Lepidoptera: Crambidae), hospedeiro permissivo, e de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae), hospedeiro não-permissivo, pelo parasitismo por *Cotesia flavipes* (Cameron) (Hymenoptera: Braconidae). Além disso, buscou-se verificar se alterações na comunidade dos hospedeiros poderiam ser induzidas pelas secreções derivadas da fêmea parasitoide (veneno, fluídos do cálice e vírus simbiote) que são utilizadas no processo de regulação hospedeira.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Simbiontes em insetos

Simbiose é o termo utilizado para descrever associações entre organismos de espécies diferentes (DE BARY, 1879). O resultado da interação na aptidão dos indivíduos associados classifica estas relações basicamente em parasitismo, comensalismo e mutualismo. Quando a aptidão de uma espécie é afetada negativamente, ao passo em que há aumento na aptidão da outra, há uma relação de parasitismo. Se uma das espécies é beneficiada sem acarretar danos à outra, chamamos de comensalismo. Já quando há benefício recíproco às espécies, não significando necessariamente que ambas se beneficiem na mesma intensidade, denominamos de mutualismo (PARMENTIER; MICHEL, 2013). Quando é difícil definir o efeito na aptidão dos organismos associados em sistemas mais complexos, por exemplo, pode-se utilizar simplesmente o termo simbiote, de designação mais ampla (MCFALL-NGAI, 2014). Dependendo do local em que se encontra o simbiote em relação à espécie hospedeira, o mesmo pode ser classificado como ectossimbiote, quando este é externo ao hospedeiro, e endossimbiote quando o mesmo se localiza no interior do hospedeiro. No último caso, há ainda mais uma divisão entre endocitobionte e ectocitobionte. No primeiro, o interior de uma célula hospedeira é utilizada como abrigo, enquanto no segundo o simbiote está no lúmen de algum órgão ou na hemocele (BOURTZIS; MILLER, 2003). O grau de dependência dos organismos associados os classifica em simbiontes primários e secundários. Simbiontes primários, também chamados de obrigatórios, são aqueles que normalmente possuem longa história evolutiva com seus hospedeiros, desenvolvendo relações indissociáveis. Já os simbiontes secundários (ou facultativos) podem ter associações recentes com seus hospedeiros e, por isso, ainda mantêm a capacidade de viver independentemente (MOYA et al., 2008). Muitos simbiontes são transmitidos verticalmente, ou seja, por via materna; geralmente, este tipo de transmissão está ligado a relações mais estreitas com o hospedeiro. Outros simbiontes são transmitidos horizontalmente, isto é, a partir de uma fonte externa; neste caso, o hospedeiro deve ser colonizado novamente a cada geração ou até mesmo mais de uma vez durante a vida do hospedeiro (MORAN, 2006; DOUGLAS, 2015).

Uma grande parte dos insetos está associada a endossimbiontes hereditários e muitos destes estão envolvidos em associações obrigatórias (FELDHAAR; GROSS, 2009). Endossimbiontes primários são encontrados principalmente em bacteriócitos, que são células especializadas em abrigar bactérias. Estas células podem estar livres na hemocele ou reunidas

em um órgão específico denominado bacterioma (MORAN; TELANG, 1998). Estes simbioses são transmitidos verticalmente, com a indispensável função de fornecer aos seus hospedeiros importantes contribuições para a sua sobrevivência e desenvolvimento. Por exemplo, insetos com dietas nutricionalmente restritas contam com o auxílio destes microrganismos para obtenção de nutrientes que podem ser limitados ou inexistentes em sua dieta ou que não podem ser produzidos por conta própria. A maioria dos pulgões estão associados ao endocitobionte *Buchnera*, o qual fornece aminoácidos essenciais que não poderiam ser obtidos de outra forma (DOUGLAS, 1998). Do mesmo modo, *Wigglesworthia glossinidia*, uma bactéria mutualista obrigatória de *Glossina morsitans* Westwood (Diptera: Glossinidae), a mosca tsé-tsé, produz vitaminas essenciais que não estão presentes na dieta alimentar natural do hospedeiro (sangue de vertebrados) (SNYDER et al., 2010). O papel destes simbioses não se limita apenas à nutrição, já que *W. glossinidia* também é responsável pela maturação do sistema imunológico do hospedeiro e pela indução da transcrição de PGRP-LB, substância de caráter antimicrobiano que tem ação tanto na resistência ao *Trypanosoma* parasita, quanto na regulação de sua própria população (WANG et al., 2009; WEISS; WANG; AKSOY, 2011).

Em contraste com os simbioses primários associados a bacteriócitos, os simbioses facultativos podem ser encontrados tanto na hemolinfa quanto associados a órgãos ou tecidos, e não são necessários à sobrevivência do hospedeiro. Endossimbioses secundários podem ser transmitidos horizontal ou verticalmente (OLIVER et al., 2010). Apesar de pouco explorados, esses simbioses também podem beneficiar vários aspectos biológicos de seus hospedeiros, como a reprodução, fecundidade e sobrevivência (OLIVER; MORAN; HUNTER, 2005; OLIVER et al., 2010; SIMON et al., 2011). *Sodalis glossinidius*, por exemplo, é um endossimbionte secundário da mosca tsé-tsé, maternalmente transmitido e encontrado em vários tecidos da mosca hospedeira, tendo como função aparente aumentar a longevidade e a capacidade do hospedeiro em resistir a infecções por tripanossomas (BALMAND et al., 2013). *Wolbachia* e *Spiroplasma* são as bactérias endossimbioses facultativas mais comumente encontradas em insetos (YUN et al., 2014). *Wolbachia* é um endocitobionte transmitido maternalmente, capaz de manipular as propriedades de reprodução de seus hospedeiros pela eliminação de machos, indução de partenogênese, feminização de machos e, mais comumente, a incompatibilidade citoplasmática (STOUTHAMER; BREEUWER; HURST, 1999). Também pode exercer papel essencial na reprodução de parasitoides, como no caso de *Asobara tabida* Nees (Hymenoptera: Braconidae), em que sua ausência em fêmeas gera incapacidade de produção de oócitos maduros (DEDEINE et al., 2001). Estes

endossimbiontes também podem influenciar no metabolismo de ferro, regulando o estresse oxidativo e, assim, a morte celular, aumentando sua permanência na célula hospedeira (KREMER et al., 2009). Mas em alguns casos, a presença de *Wolbachia* pode reduzir a suscetibilidade do hospedeiro a agentes patogênicos, induzindo a regulação positiva de genes envolvidos na resposta imunológica, como aqueles que codificam peptídeos antimicrobianos (WEISS; AKSOY, 2011). *Spiroplasma*, normalmente um agente de distorção da razão sexual em *Drosophila* causando a morte embrionária de machos (HASELKORN, 2010), pode aumentar a sobrevivência de seu hospedeiro *Drosophila hydei* Sturtevant (Diptera: Drosophilidae) ao ataque pelo parasitoide *Leptopilina heterotoma* Thomson (Hymenoptera: Figitidae) (XIE; VILCHEZ; MATEOS, 2010).

O trato intestinal de insetos é conhecido por abrigar comunidade composta por diversos microrganismos que podem estabelecer complexas associações de simbiose com o hospedeiro. O grau de persistência das diferentes espécies nas comunidades microbianas as classifica em alóctones e autóctones (DILLON; DILLON, 2004). Bactérias denominadas alóctones (transitórias), não possuem a capacidade de colonizar o intestino hospedeiro, exceto sob circunstâncias anormais. Estas bactérias são derivadas do ambiente circundante, tais como o filoplano de plantas ou a epiderme do animal hospedeiro. Quando uma espécie microbiana é considerada autóctone, ela é capaz de colonizar um nicho particular do intestino, multiplicando-se a uma taxa igual ou superior à sua taxa de eliminação a partir do intestino (DILLON; DILLON, 2004).

A diversidade da microbiota intestinal pode variar dependendo das estruturas especializadas presentes no intestino, dos valores de pH, das condições redox, enzimas digestivas, tipo de alimento ingerido e habitat do hospedeiro (YUN et al., 2014). Em alguns casos, uma espécie autóctone só é capaz de colonizar o ambiente na presença de outros membros da comunidade microbiana (DILLON; DILLON, 2004). A maioria dos simbioses intestinais nos insetos são extracelulares, habitando livremente o espaço luminal ou aderidos ao epitélio intestinal (BOURTZIS; MILLER, 2003). Estas comunidades microbianas participam de diversos tipos de interação, da patogênica ao mutualismo obrigatório. Atualmente, considera-se que a compreensão da biologia de insetos seja incompleta sem a análise detalhada da microbiota intestinal, dado o impacto significativo da mesma sobre vários processos da vida de seus hospedeiros (MOYA et al., 2008). Estudos conduzidos principalmente com cupins e baratas têm sido voltados às contribuições nutricionais da microbiota intestinal de insetos que vivem em dietas nutricionalmente restritas, principalmente pelo suprimento de enzimas, vitaminas, aminoácidos específicos, esteróis e nitrogênio

(BREZNAK; BRUNE, 1994; DOUGLAS, 2009; KRISHNAN et al., 2014). No entanto, a microbiota intestinal participa também de diversos aspectos da bioecologia do hospedeiro, como, por exemplo, nas relações intra e interespecíficas como especiação (BRUCKER; BORDENSTEIN, 2013), preferência de acasalamento (SHARON et al., 2001, 2010) e produção de semioquímicos (DILLON; VENNARD; CHARNLEY, 2002; LEROY et al., 2011), como também na proteção contra patógenos via produção de uma barreira mucosa, competição por nutrientes e pré-ativação do sistema imunológico do hospedeiro (AZAMBUJA; FEDER; GARCIA, 2003, AZAMBUJA; GARCIA; RATCLIFFE, 2005; CIRIMOTICH et al., 2011; BAHIA et al., 2014)

2.2 Relações hospedeiro-parasitoide

Insetos zoófagos se utilizam de alimento de origem animal para a obtenção da energia necessária à sua sobrevivência e desenvolvimento. Dentro desta divisão encontram-se os predadores e parasitoides (CÔNSOLI; VINSON, 2009). Predadores necessitam consumir várias presas para completar seu ciclo de vida, enquanto parasitoides utilizam um único artrópode hospedeiro como fonte alimentar (MILLS, 2009). Parasitoides ocorrem em sete ordens de insetos, mas a maioria dos parasitoides pertencem a Hymenoptera ou Diptera (GODFRAY, 2001; PENNACCHIO; CACCIA; DIGILIO, 2014). Os parasitoides podem colocar um ou mais ovos no hospedeiro, sendo então denominados solitários ou gregários, respectivamente. Ainda, dependendo do local onde o parasitoide se desenvolve, externa ou internamente ao hospedeiro, o mesmo será classificado como ecto ou endoparasitoide, respectivamente (BRODEUR; BOIVIN, 2004).

Existem quatro importantes passos para o sucesso do parasitismo: i) localização do hábitat do hospedeiro, ii) localização do hospedeiro, iii) avaliação da qualidade do hospedeiro ao parasitismo e iv) regulação hospedeira. Após o parasitismo, o hospedeiro sofre uma série de alterações fisiológicas, físicas e ecológicas. Estas alterações são induzidas pelo parasitoide a fim de propiciar um ambiente adequado à sua própria progênie (VINSON; IWANTSCH 1980). As estratégias para exploração hospedeira dividem os parasitoides em idiobiontes e cenobiontes. Os idiobiontes são aqueles que se desenvolvem em hospedeiros em estágios sésseis ou paralisados no estágio em que foram parasitados. Já os cenobiontes se desenvolvem em hospedeiros que continuam a se mover, alimentar e desenvolver aproximadamente até a prole do parasitoide completar seu desenvolvimento imaturo (BECKAGE; THOMPSON; FEDERICI, 1993; PENNACCHIO; STRAND, 2005). Estudos indicam uma escala evolutiva

nas estratégias de manipulação hospedeira por parasitoides. Inicialmente, o estabelecimento e desenvolvimento do parasitoide ocorreram externamente a hospedeiros sésseis (ectoparasitoides idiobiontes), depois em hospedeiros móveis (ectoparasitoides cenobiontes), havendo, a seguir, a conquista do meio interno do hospedeiro, que, a princípio, se restringia a hospedeiros com sistema imunológico menos desenvolvido, como ovos e pupas (endoparasitoide idiobionte). Posteriormente, os parasitoides passaram a explorar hospedeiros com respostas imunológicas mais complexas, como larvas, ninfas e adultos (endoparasitoides cenobiontes) (PENNACCHIO; STRAND, 2005).

Durante o desenvolvimento imaturo do parasitoide, o hospedeiro pode sofrer modificações em diversos aspectos de sua fisiologia. Estas alterações causadas ao longo do tempo correspondem às exigências particulares dos diferentes estágios de desenvolvimento do parasitoide, tornando o ambiente interno mais estável ao seu desenvolvimento (VINSON; IWANTSCH, 1980). A manipulação do sistema imunológico do hospedeiro inicia o processo de regulação hospedeira (VINSON; IWANTSCH, 1980). Vencer as barreiras de defesa do hospedeiro é imprescindível ao estabelecimento do parasitoide imaturo. Alguns parasitoides evitam sua eliminação passivamente, se desenvolvendo em locais inacessíveis às células de defesa do hospedeiro, ou podem possuir também características superficiais que não provocam resposta imunológica (STRAND; PECH, 1995). Outras espécies causam uma perturbação ativa no sistema imunológico hospedeiro por meio da injeção de fatores específicos com a finalidade de impossibilitar, por exemplo, a encapsulação, principal mecanismo para a eliminação de organismos multicelulares em insetos (STRAND; PECH, 1995).

Suprir as exigências nutricionais do parasitoide é também de extrema importância para o sucesso do parasitismo. É observada a regulação das concentrações de carboidratos, como trealose e glicose, alterações nos níveis de lipídeos, aminoácidos livres na hemolinfa, síntese, liberação e armazenamento de proteínas, além de outras modificações na atividade metabólica hospedeira pelo parasitoide (DAHLMAN; VINSON, 1975; VINSON; IWANTSCH, 1980; KAESLIN; PFISTER-WILHELM; LANZREIN, 2005). Estas alterações podem variar de acordo com o hábito alimentar do parasitoide em questão. São relatadas também modificações no consumo e utilização do alimento pelo hospedeiro (GUILLOT; VINSON, 1973). Parasitoides devem garantir que os recursos nutricionais disponíveis no hospedeiro não sejam alocados para o crescimento e desenvolvimento de tecidos que não serão utilizados para o crescimento do imaturo. Assim, alterações morfológicas no hospedeiro também ocorrem, como a inibição do desenvolvimento de discos imaginiais (exemplo, o das asas) e de estruturas

reprodutivas, com a atrofia de gônadas, levando à castração (GELMAN et al., 2005). Em hospedeiros que apresentam elevado potencial reprodutivo, como os pulgões por exemplo, parasitoides desenvolveram excelentes estratégias para realocar recursos. O veneno injetado por *Aphidius ervi* Haliday (Hymenoptera: Braconidae) em seu hospedeiro *Acyrtosiphon pisum* Harris (Hemiptera: Aphididae), induz a apoptose de células germinativas e ovariolos, evitando, assim, a formação de novos embriões. Nesse sistema hospedeiro-parasitoide, os embriões já formados são digeridos por fatores secretados por teratócitos (DIGILIO et al., 2000; FALABELLA et al., 2007).

Alguns parasitoides podem manipular o comportamento do hospedeiro por meio da modulação do sistema nervoso central. Este tipo de manipulação visa à preservação do hospedeiro e, conseqüentemente, do parasitoide em desenvolvimento (LIBERSAT; DELAGO; GAL, 2009; VAN HOUTE; ROS; VAN OERS, 2013). Mudanças nos níveis hormonais, como, por exemplo, nos níveis de hormônio juvenil e ecdisteroides, também são induzidas e alteram os processos de muda e metamorfose, assim como os níveis de expressão de genes do hospedeiro que possam ter papel na nutrição do parasitoide (ADAMO, 1997; KAESLIN; PFISTER-WILHELM; LANZREIN, 2005).

Parasitoides manipulam a fisiologia hospedeira utilizando-se de um arsenal composto por fluidos do cálice, veneno, polidnavírus (PDVs), teratócitos e secreções da própria larva em desenvolvimento. A importância relativa e o modo de ação de cada um destes fatores dependem do sistema analisado, podendo atuar independente ou conjuntamente em diferentes momentos do parasitismo (DAHLMAN, 1991; ASGARI; RIVERS, 2011; STRAND; BURKE, 2013; BURKE; STRAND, 2014).

Os PDVs são vírus simbiossiontes encontrados em algumas das subfamílias de Braconidae e Ichneumonidae (Hymenoptera), sendo respectivamente chamados de Bracovirus (BV) e Ichnovirus (IV) (KROEMER; WEBB, 2003; STRAND; BURKE, 2013). Estes vírus se replicam apenas em células do cálice do ovário do parasitoide, sendo injetados no hospedeiro no momento da oviposição, quando infectam vários tecidos da larva hospedeira para a expressão de inúmeros genes virais, sem que haja sua replicação. Isto se deve à ausência de genes de replicação no momento de empacotamento do genoma viral em vírions, como resultado, a transmissão se dá apenas verticalmente (KROEMER; WEBB, 2003; STRAND; BURKE, 2013). Todos os genes de virulência são expressos somente no hospedeiro do parasitoide, causando infecção sistêmica que desempenha papel essencial na inibição da resposta imunológica, podendo afetar, também, o desenvolvimento e crescimento do hospedeiro (STRAND et al., 1992, 2008, 2013; RODRIGUEZ-PEREZ; BECKAGE, 2006).

O veneno é produzido por um par de glândulas especializadas e é rico em biomoléculas que contêm pequenos peptídeos, incluindo neurotoxinas, amins e enzimas de alto peso molecular (ASGARI; RIVERS, 2011). Esta secreção está envolvida na manipulação da fisiologia do hospedeiro, interferindo nos processos fisiológicos do mesmo a fim de facilitar a sua utilização pelo inimigo natural. São relatadas alterações no sistema endócrino, nervoso e imunológico do hospedeiro, além de redução na fecundidade. Em alguns casos, a expressão de genes virais dos PDVs parece depender da estimulação por componentes do veneno (LIBERSAT; DELAGO; GAL, 2009; ASGARI; RIVERS, 2011; COLINET et al., 2013; BATTAGLIA et al., 2014)

Teratócitos são células derivadas da serosa que envolve o embrião do parasitoide. No momento da eclosão da larva do parasitoide, as células da serosa se dissociam dando origem aos teratócitos (VINSON; IWANTSCH, 1980; STRAND, 2014). Durante o desenvolvimento do parasitoide, os teratócitos não sofrem citocinese, apenas cariocinese, apresentando assim aumento gradual de seu tamanho à medida que a ploidia da célula aumenta (DAHLMAN, 1991; STRAND, 2014). Os produtos sintetizados por estas células podem servir como nutrientes para sustentar o desenvolvimento do parasitoide imaturo pela síntese de proteínas e a expressão de vários grupos de enzimas digestivas. Também estão envolvidos na manipulação do sistema endócrino do hospedeiro por meio de alterações na sinalização da insulina e biossíntese de hormônio juvenil e 20-hidroxiecdisona, causando atrasos no desenvolvimento do hospedeiro. Induzem ainda imunossupressão no hospedeiro pela expressão de inibidores de serinoproteases (serpinas), além de produzirem peptídeos antimicrobianos para diminuir a susceptibilidade do hospedeiro a infecções microbianas (DAHLMAN, 1990; FIRLEJ et al., 2007; ALI et al., 2013; BURKE; STRAND, 2014; ALI; LIM; KIM, 2015).

A própria larva do parasitoide pode secretar substâncias que também tem efeito regulador no hospedeiro. Proteínas produzidas pela glândula salivar da larva, por exemplo, podem desempenhar papel importante na modificação do crescimento e desenvolvimento do hospedeiro na presença do polidnavírus e veneno, induzindo a muda precoce do mesmo (HOCHULI; PFISTER-WILHELM; LANZREIN, 1999; KAESLIN, PFISTER-WILHELM; LANZREIN, 2005). No caso de ectoparasitoides, a secreção salivar da larva é de extrema importância para inibir a coagulação da hemolinfa do hospedeiro após a perfuração de sua cutícula, bem como a melanização induzida pelo ferimento (RICHARDS; EDWARDS, 2002a, 2002b; RICHARDS; JONES; BOWMAN, 2011). A saliva do parasitoide também pode auxiliar no processamento do alimento, como ocorre no parasitoide *Euplectrus separatae*

Kamijo (Hymenoptera: Eulophidae), na qual foi observada a presença de enzima semelhante à tripsina que digere os tecidos do hospedeiro (NAKAMATSU; TANAKA, 2004).

2.3 Interface microbiota e sistema imunológico do hospedeiro

Microrganismos são reconhecidos pelo sistema imunológico de insetos após a ativação de receptores de reconhecimento de padrões (PRRs) de componentes da membrana/parede celular de bactérias e fungos, como os peptidoglicanos (PGN) (FERRANDON et al., 2007). Peptidoglicanos são heteropolímeros compostos por açúcares e aminoácidos. Estas estruturas integram a parede celular microbiana, à qual conferem rigidez e forma (GROSS et al., 2009). Os fungos são geralmente reconhecidos por conterem polissacarídeos β -glucanos. Embora a estrutura do peptidoglicano seja bastante variável entre os diferentes tipos de bactérias, dois tipos básicos podem ser distintos por PRRs. Bactérias Gram-positivas apresentam peptidoglicano do tipo Lys, apresentando lisina como o terceiro aminoácido, enquanto bactérias Gram-negativas e Bacilli Gram-positivos apresentam peptidoglicano do tipo Dap, visto que o aminoácido ácido meso-diaminopimélico ocupa a terceira posição (GROSS et al., 2009).

Os PRRs que reconhecem e se ligam a estas estruturas bacterianas são chamados de proteínas de reconhecimento de peptidoglicanos (PGRPs). Em *Drosophila*, foram identificados 13 genes de PGRP que podem ser classificados em dois subgrupos. Um subgrupo em que seus membros são enzimaticamente inativos, mas ainda se ligam a peptidoglicanos (PGRP-SA, SD, LA, LC, LD, LE, LF), e outro subgrupo que pode reduzir a atividade biológica do peptidoglicano circulante (PGRP-SC1, SC2, LB, SB1, SB2). Isto sugere um papel na modulação da resposta imunológica e na proteção do tecido hospedeiro contra a atividade imunológica excessiva (RYU; HA; LEE, 2010; KOUNATIDIS; LIGOXYGAKIS, 2012).

PGRPs atuam como receptores que desencadeiam duas vias de sinalização diferentes, as vias Toll e IMD (imunodeficiência). A via Toll é a principal via de sinalização para induzir reações imunológicas contra fungos e é ativada por PGN do tipo Lys. A via IMD é essencial na resposta a bactérias Gram-negativas, sendo ativada por PGN do tipo Dap. No entanto, há indícios de que ambas as vias de sinalização possam cooperar em sua resposta a determinados patógenos (FELDHAAR; GROSS, 2008; KOUNATIDIS; LIGOXYGAKIS, 2012; CHU; MAZMANIAN, 2013).

A via Toll é ativada por PGRP-AS e PGRP-SD. Mediados por uma proteína ligante, *Spätzle*, estes PRRs levam à ativação da proteína Toll, um receptor localizado na membrana celular. A ligação de *Spätzle* a *Toll* desencadeia uma cascata de sinalização intracelular que envolve vários fatores resultando na ativação de proteínas pertencentes à família NF- κ B, *DIF* e *Dorsal*. Após a ativação, estas proteínas se translocam para o núcleo e induzem a transcrição dos respectivos genes que codificam peptídeos antimicrobianos (AMP). A ativação da proteína *Cactus* leva à modulação negativa desta via de sinalização (FELDHAAR; GROSS, 2008).

Na via IMD, o reconhecimento de antígenos ocorre pela proteína transmembrana PGRP-LC e proteína intracelular PGRP-LE. Após a interação destas proteínas com a proteína IMD, uma complexa cascata de sinalização intracelular leva à translocação nuclear de *Relish*, um fator de transcrição NF- κ B que ativa a transcrição de vários genes-alvo, incluindo os peptídeos antimicrobianos. Outros genes como os de alguns PGRPs adicionais, *Caudal* e *Pirk*, podem ser transcritos e atuar na regulação negativa da via IMD (KOUNATIDIS; LIGOXYGAKIS, 2012; CHU; MAZMANIAN, 2013).

Além de regular a produção de AMP em resposta à infecção, a via IMD também possui um importante papel na resposta a simbioses. O regulador *Caudal* pertencente à via IMD atua na composição da microbiota intestinal suprimindo a expressão de, pelo menos, parte dos genes controlados por *relish*, genes que codificam AMPs, havendo assim a preservação de simbioses (RYU et al., 2008). Outros reguladores negativos, tais como *Pirk*, sequestram PGRP-LC no citoplasma e evitam a exposição ao peptidoglicano e a ativação da via IMD, imobilizando respostas imunológicas excessivas (CHU; MAZMANIAN, 2013). PGRPs com ação amidase agem na desintoxicação da atividade biológica de peptidoglicanos e evitam a resposta imunológica intensa. PGRPs catalíticos, tais como PGRP-LB e PGRP-SC, limitam a disponibilidade de peptidoglicanos liberados a partir de bactérias do intestino, inibindo a via IMD que, de outra forma, poderia danificar estes simbioses (CHU; MAZMANIAN, 2013).

Infecções bacterianas também podem acionar um sistema redox que gera efetores microbicidas, como as espécies reativas de oxigênio (ROS), que controlam o crescimento de bactérias. Um nível basal de ROS é produzido por uma oxidase transmembranar dupla (DUOX). Após a indução, ROS é eliminado pela ação da enzima catalase, protegendo, assim, o hospedeiro do estresse oxidativo excessivo (CHARROUX; ROYET, 2012).

O intestino de insetos possui estratégias próprias para tolerar microrganismos comensais. O epitélio intestinal está equipado com vários circuitos reguladores negativos para a produção de AMPs via fatores NF- κ B e sistemas DUOX-ROS, permitindo que bactérias benéficas

colonizem o intestino. No entanto, sob condições de infecção patogênica, estes componentes podem ter atividade microbicida, protegendo o hospedeiro contra a invasão por bactérias indesejáveis (RYU; HA; LEE, 2010).

Outros mecanismos para limitar a detecção de endossimbiontes primários pelo sistema imunológico do hospedeiro têm sido relatados. Isto ocorre devido à perda de muitas enzimas necessárias para a biossíntese de peptidoglicanos e lipopolissacarídeos (ZIENTZ; DANDEKAR; GROSS, 2004). Outras bactérias, por se localizarem intracelularmente, podem dificultar o seu reconhecimento (ZIENTZ; DANDEKAR; GROSS, 2004). Endossimbiontes podem se adaptar a atividade antimicrobiana na hemolinfa do hospedeiro, como ocorre com o simbiote *Sodalis glossinidius* associado a *G. morsitans*, o qual é cerca de dez vezes mais resistente ao peptídeo antimicrobiano produzido pelo hospedeiro do que seu parente próximo, a bactéria *Escherichia coli* (HAO et al., 2001).

2.4 Interface parasitoide e sistema imunológico do hospedeiro

A primeira linha de defesa contra a invasão de patógenos é a resistente cutícula que recobre o corpo do inseto. A cutícula consiste de longas fibrilas de N-acetilglicosamina incorporadas à matriz de proteínas e lipídeos (CHAPMAN, 1998). Se houver superação desta barreira física, entra em ação o sistema imunológico inato, que pode ser dividido em dois ramos: (i) o da resposta celular, baseado em hemócitos - células de defesa que atuam na fagocitose, encapsulação, nodulação e cicatrização; (ii) e o da resposta humoral, que envolve proteínas solúveis com atividade antimicrobiana. Também ocorre a liberação de oxigênio reativo citotóxico e enzimas como as lisozimas, relacionadas à despolarização da parede celular, e as fenoloxidasas, enzimas envolvidas na melanização. O inseto pode contar com a ativação simultânea das vias humorais e celulares no processo de defesa imunológica ao ataque por parasitoides (STRAND, 2008; KOUNATIDIS; LIGOXYGAKIS, 2012).

Ao iniciar o ataque, o parasitoide perfura o tegumento do hospedeiro com o ovipositor, rompendo a primeira barreira física. Ao ganhar acesso a hemocele, os ovos são inseridos juntamente com outras substâncias. Este processo induz a principal defesa hospedeira contra organismos multicelulares, o encapsulamento. Neste processo, granulócitos chegam ao local da infecção e liberam substâncias granulares na hemolinfa, as quais atraem plasmócitos que se aderem e se expandem sobre o invasor. Após o término da agregação destas células, forma-se uma cápsula lisa com camadas celulares sobrepostas. A cápsula é então acompanhada pela produção e deposição de melanina via ativação da cascata de profenoloxidase. Durante a

síntese de melanina, moléculas citotóxicas intermediárias (quinonas) são produzidas, auxiliando também no processo de morte do invasor (STRAND; PECH, 1995; CHAPMAN, 1998; STRAND, 2008).

Os parasitoides desenvolveram diferentes estratégias para evitar ou inativar esta resposta imunológica. Meios passivos são usados quando o parasitoide se estabelece em locais inacessíveis aos hemócitos do hospedeiro ou quando apresentam em sua superfície características que impedem o seu reconhecimento (STRAND; PECH, 1995). Outras espécies de parasitoides produzem alterações ativas no sistema imunológico do hospedeiro, injetando elementos específicos no momento da oviposição. Combinações de mecanismos passivos e ativos também podem ser utilizadas por parasitoides (STRAND; PECH, 1995). Dentre as secreções maternas injetadas na hemocele hospedeira no momento do parasitismo, o veneno pode ter funções diferentes na regulação dos vários sistemas do hospedeiro. O veneno de *Leptopilina bouvardi* Barbotin et al. (Hymenoptera: Figitidae) interrompe a ativação da cascata de profenoloxidase em *Drosophila* devido à presença de uma serpina, uma proteína que inibe a ação das serinoproteases (COLINET et al., 2009). Por outro lado, o veneno de *Pteromalus puparum* L. (Hymenoptera: Pteromalidae) causa a redução dos níveis de transcrição de genes relacionados ao citoesqueleto e apoptose de hemócitos no hospedeiro *Pieris rapae* L. (Lepidoptera: Pieridae), resultando em reduções significativas nos processos de encapsulação (FANG et al., 2010). Já no caso de *Hyposoter didymator* Thunberg (Hymenoptera: Ichneumonidae), o veneno não causa nenhum efeito significativo na capacidade de resposta imunológica do hospedeiro, sendo o fluido do ovário aquele responsável por inibir o sistema imunológico do hospedeiro (DORÉMUS et al., 2013).

A expressão de genes virais de Polidnavirus (PDV) desencadeia, em algumas espécies, o processo de apoptose dos hemócitos do hospedeiro. Em outras, altera a capacidade dos plasmatócitos em aderir a superfícies, como àquela do corpo invasor, o ovo do parasitoide, pois perdem a capacidade de responder a uma citocina. A inibição da propagação dos hemócitos pode ser explicada pela inibição do desenvolvimento de F-actina nos hemócitos hospedeiros (STRAND et al., 1992; RODRIGUEZ-PEREZ; BECKAGE, 2006; NALINI et al., 2009; STRAND; BURKE, 2013).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Criações de insetos

3.1.1 *Spodoptera frugiperda*

Ovos de *S. frugiperda* foram cedidos pelo Laboratório de Resistência de Artrópodes a Táticas de Controle, Departamento de Entomologia e Acarologia, Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” (ESALQ/USP), onde uma população de *S. frugiperda* tem sido mantida por mais de 10 anos sem a introdução de espécimens do campo. Lagartas recém-eclodidas foram acondicionadas em recipientes plásticos (100 mL) contendo dieta artificial à base de germe de trigo, feijão e levedura de cerveja (GREENE; LEPPLA; DICKERSON, 1976), onde permaneceram até a fase de pupa. As pupas foram então retiradas do recipiente de criação, tratadas por imersão em solução aquosa de sulfato de cobre a 10% por 10 min, enxaguadas em água estéril e mantidas em contato com papel de filtro em temperatura ambiente até sua completa secagem. As pupas foram transferidas para recipientes acrílicos (13 x 13 x 3,5 cm) forrados com papel filtro para a emergência dos adultos. Adultos recém-emergidos foram acondicionados em gaiolas de PVC revestidas com papel sulfite como substrato para oviposição.

3.1.2 *Diatraea saccharalis*

Ovos de *D. saccharalis* obtidos de criação estoque do Laboratório de Interações em Insetos, Departamento de Entomologia e Acarologia, Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” (ESALQ/USP), foram isolados para a obtenção de lagartas neonatas. Essas lagartas foram colocadas em tubos de vidro contendo dieta artificial à base de germe de trigo e milho até a sua transformação em pupa (PARRA; MIHSFELDT, 1992). As pupas foram transferidas para recipientes acrílicos forrados com papel filtro (13 x 13 x 3,5 cm) até a emergência dos adultos. Os adultos foram posteriormente mantidos em gaiolas de PVC revestidas com papel sulfite para oviposição. Ovos e pupas foram tratados por imersão em solução aquosa de sulfato de cobre a 10% para sua assepsia.

3.1.3 *Cotesia flavipes*

Para a manutenção da população de *C. flavipes*, lagartas de 5-6º instar de *D. saccharalis* foram oferecidas para o parasitismo. Em seguida, estas lagartas foram individualizadas em tubos de vidro contendo dieta e mantidas em câmaras climatizadas para o desenvolvimento dos parasitoides (PARRA, 1999). As massas de pupários de *C. flavipes* formadas foram transferidas para recipientes plásticos para a emergência de adultos, os quais foram posteriormente alimentados com solução aquosa de mel a 50%.

Todos os procedimentos de criação foram realizados em condições controladas ($25\pm 1^\circ\text{C}$; $70\pm 10\%$ UR; fotofase 14 h).

3.2 Efeito do parasitismo por *C. flavipes* na microbiota intestinal de hospedeiros permissivo e não-permissivo

Lagartas de *D. saccharalis* na pré-muda do 5º para o 6º instar (evidenciada pelo afastamento da capsula cefálica em relação à região torácica) foram selecionadas e apenas as que realizaram a muda dentro do intervalo de 12 h foram utilizadas para a condução dos experimentos. As lagartas obtidas foram separadas em dois grupos distintos. Lagartas de um dos grupos foram submetidas individualmente ao parasitismo por *C. flavipes*, enquanto aquelas do outro grupo (não-parasitadas) foram mantidas como controle. As lagartas controle e parasitadas foram individualizadas em recipientes contendo dieta artificial e mantidas em condições controladas ($25\pm 1^\circ\text{C}$; $70\pm 10\%$ UR; fotofase de 14 horas) até a coleta do intestino.

As amostras de intestino de lagartas controle (C) e parasitadas (P) foram coletas em três períodos correspondentes ao parasitismo – no primeiro (1DAP), quinto (5DAP) e nono (9DAP) dias após o parasitismo. Foram utilizadas sete lagartas por período amostral.

Devido à incapacidade de *C. flavipes* parasitar instares tardios do hospedeiro não-permissivo *S. frugiperda*, o estudo do efeito do parasitismo na microbiota intestinal desse hospedeiro foi realizado com lagartas em instar intermediário. Assim, lagartas de *S. frugiperda* na pré-muda do 2º para o 3º instar foram separadas e aquelas que realizaram a muda para o 3º instar dentro do intervalo de 12 h após o isolamento foram submetidas ao parasitismo por *C. flavipes*. As lagartas de *S. frugiperda* foram submetidas aos mesmos procedimentos de parasitismo, criação e coleta de tecido adotados para *D. saccharalis*.

Para a extração do intestino, as lagartas foram esterilizadas superficialmente com solução refrigerada de hipoclorito de sódio a 0,2% em 70% etanol, enxaguadas em água estéril gelada

e dissecadas em solução salina estéril gelada (125 mM NaCl, 4°C), em condições assépticas. O intestino obtido foi enxaguado em solução salina estéril e dividido em duas porções, representadas pelas regiões antero-mediana do intestino (estomodéu e mesêntero) e posterior (proctodéu), para análise separada da microbiota associada. Os tecidos foram armazenados em etanol absoluto a -20°C até a extração do DNA

3.3 Verificação do efeito das secreções maternas na regulação da microbiota intestinal do hospedeiro

Para a verificação da participação de secreções maternas derivadas do parasitoide *C. flavipes* na alteração da microbiota de lagartas de *D. saccharalis* e *S. frugiperda* parasitadas, pupas do parasitoide foram sujeitas a tratamento com radiação gama para a esterilização dos adultos. Dessa forma, hospedeiros atacados por fêmeas estéreis do parasitoide seriam influenciados apenas pelas secreções injetadas pela fêmea (veneno e fluídos do cálice+polidnavirus), visto a ausência de desenvolvimento dos imaturos do inimigo natural.

A esterilização de *C. flavipes* foi realizada via irradiação de pupas do parasitoide em estágio avançado de desenvolvimento (8-10 dias), pela exposição à fonte de ⁶⁰Co (Gammabeam 650), na dose de 75 Gy, por 20 min (LOPES, 2008). O tratamento foi realizado junto ao Centro de Energia Nuclear na Agricultura (CENA), no Laboratório de Irradiação de Alimentos e Radioentomologia. Este procedimento permitiu a inativação das células germinativas das fêmeas, ao mesmo tempo que permitiu a manutenção da viabilidade das partículas virais associadas ao parasitoide. As lagartas parasitadas e não-parasitadas foram mantidas assim como descrito anteriormente, sendo o intestino obtido nos intervalos já mencionados. O processamento do material ocorreu de forma idêntica àquela anteriormente descrita.

3.4 Extração de DNA, amplificação e sequenciamento da região V4 do 16S rRNA

Os intestinos coletados foram macerados utilizando-se nitrogênio líquido e submetidos à extração do DNA genômico (gDNA) com auxílio do produto comercial AxyPrep Bacterial Genomic DNA Kit (Axygen), seguindo as recomendações do fabricante. Após a extração, as amostras de DNA foram armazenadas a -20°C. A qualidade, integridade e pureza do DNA obtido foram medidas por espectrofotometria e eletroforese em gel de agarose.

Os gDNAs extraídos foram utilizados em reações de PCR com o conjunto de iniciadores específicos para a região V4 do gene do 16S ribossomal (16S rRNA) (16SV4F: 5' AGT CAG

TCA GCC GGA CTA CHV GGG TWT CTA AT 3’; 16SV4R: 5’ TAT GGT AAT TGT GTG CCA GCM GCC GCG GTA A 3’). As reações foram programadas a 98°C por 2 min (1 ciclo), seguida de 30 ciclos a 98°C por 45 s, 56°C por 1 min e 72°C por 90 s, com extensão final (1 ciclo) a 72°C por 10 min. As reações foram feitas em volume final de 50 µL, contendo 100-150 ng de gDNA, 1,5 mM de MgCl₂, 1x PCR buffer, 0,2 mM de cada dNTP, 0,32 µM de cada iniciador e 2 U de GoTaq® DNA Polymerase (Promega). Os produtos de amplificação foram separados em gel de agarose a 1,5% contendo 0,5 µg/mL de brometo de etídio em tampão TAE (40 mM Tris-acetato e 1 mM EDTA em pH 8,2) sob voltagem constante (100 V). Os produtos de PCR foram extraídos do gel de agarose e purificados por centrifugação em coluna Ultrafree-DA (Millipore). Posteriormente, 50 ng do material purificado foi submetido a amplificação secundária para adição dos identificadores e iniciadores necessários ao sequenciamento das diferentes bibliotecas em Plataforma Illumina MiSeq (2 x 250 pb, “paired-end sequencing”). Essa reação secundária foi realizada utilizando-se do produto comercial Next Flex 16S V4 Amplicon Seq (Bioo Scientific). A reação foi feita em volume final de 50 µL, contendo 50 ng dos amplicons da região V4 do 16S rRNA produzidos na reação de amplificação primária, NEXTflex™ DNA PCR Master Mix na concentração recomendada, conjunto de iniciadores antissenso (NEXTflex™ 16SV4R- 0,2 µM) específico para cada tratamento amostrado e um mesmo iniciador senso (NEXTflex™ 16SV4F- 0,2 µM) (5’ AAT GAT ACG GCG ACC ACC GAG ATC TAC ACT GTA ATT GTG TGC CAG CMG CCG CGG TAA 3’). A reação foi programada a 98°C por 2 min (1 ciclo), seguido de 30 ciclos a 98°C por 45 s, 56°C por 1 min e 72°C por 90 s, com extensão final (1 ciclo) a 72°C por 10 min. Os amplicons obtidos, com 450 pares de bases, foram purificados utilizando o sistema comercial Agencourt® AMPure® XP (Beckman Coulter) e enviados para sequenciamento em plataforma Illumina MiSeq, junto ao Laboratório de Biologia Animal, coordenado pelo Prof. Dr. Luiz Lehmann Coutinho (ESALQ/USP, Piracicaba, SP).

3.5 Análises das sequências

As leituras foram analisadas utilizando-se das ferramentas disponíveis no software QIIME (CAPORASO et al., 2010b). As leituras oriundas de cada tratamento foram separadas pela identificação de suas sequências codificadoras e submetidas ao processo de trimagem para a remoção dos iniciadores. As leituras também foram submetidas a filtros de qualidade e todas as sequências com valores de qualidade abaixo de 20 (Phred < Q20) foram eliminadas. O comprimento médio das leituras foi de 253 pb. As sequências obtidas pela união das

leituras senso e antissenso foram alinhadas contra as sequências disponíveis no banco de dados do GreenGenes pelo método PyNAST (CAPORASO et al., 2010a), e as sequências válidas foram classificadas em unidades taxonômicas operacionais (UTOs), assumindo 97% como valor limite de similaridade pelo método “UCLUST”. As bactérias foram classificadas de acordo com o táxon mais próximo, dependendo dos valores de similaridade obtidos, sendo utilizados os seguintes limites para sua designação taxonômica: > 97% de similaridade para o nível de espécie, entre 95% - 97% ao nível de gênero, entre 90% - 95% de família, entre 85% - 90 % de ordem, 80% - 85% de classe e de 77% - 80% de filo (ISHAK et al., 2011).

Os dados obtidos foram então submetidos à análise de diversidade alfa pelo índice de Shannon. O índice de Shannon mede o grau de incerteza em prever que “espécie” pertencerá a um indivíduo escolhido ao acaso de uma amostra com S espécies e N indivíduos. Quanto menor o índice de Shannon, menor o grau de incerteza e, portanto, menor a diversidade da amostra. Uma vez que se sabe que as estimativas de riqueza são dependentes do esforço amostral, os dados foram rarefeitos por reamostragem randômica de modo a se trabalhar com o mesmo número de sequências por amostra, utilizando-se o número de sequências da amostra de menor valor.

Curvas de rarefação são utilizadas para indicar aumento no número de UTOs inéditas a cada amostra, quanto mais assintótica a curva, menor o número de UTOs novas adicionadas à amostragem, evidenciando esforço amostral adequado do ambiente testado.

As regiões antero-mediana e posterior do tubo digestivo foram analisadas separadamente devido às suas diferenças fisiológicas.

Medidas de diversidade beta também foram calculadas usando a técnica de Jackknife, que consiste na reamostragem de um subconjunto de dados de profundidade referente a 75% da menor amostra, sendo produzidas 10 reamostragens (repetições) para cada amostra. Em seguida, foram calculadas as matrizes de distância para cada conjunto de dados e utilizadas como base para o agrupamento hierárquico com UPGMA (“Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean”) e parcelas de PCoA (“Principal Coordinates Analysis”), para avaliar o grau de variação entre as repetições, exibida por elipsóides de confiança em torno das amostras.

Para prever potenciais contribuições funcionais da microbiota intestinal dos hospedeiros analisados, foi utilizado o programa PICRUSt (“Phylogenetic Investigation of Communities by Reconstruction of Unobserved States”) (LANGILLE et al., 2013). Este programa estima o número de cópias de genes para cada família de genes em cada microrganismo baseado em sua filogenia e em genomas disponíveis. Para a classificação das sequências do 16S rRNA em

UTOs foi utilizado o banco de dados GreenGenes como referência pelo método fechado no software QIIME, entrada necessária para o PICRUSt. No PICRUSt, as UTOs foram normalizadas pelo número de cópias de 16S rDNA, e os metagenomas foram preditos a partir da enciclopédia KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes). Para avaliar alterações induzidas pelo parasitismo no potencial funcional da microbiota intestinal de *D. saccharalis* e *S. frugiperda*, os genes identificados foram agrupados em quatro categorias de contribuição funcional distintas: 1) enzimas; 2) nutrição; 3) defesa; 4) biodegradação. Para essa análise, foram utilizadas as designações do nível 2, sendo "famílias de enzimas" para (1); "metabolismo de aminoácidos, metabolismo de carboidratos, metabolismo de cofatores e vitaminas e metabolismo de lipídeos" para (2); "metabolismo de terpenoides e policetídeos e biossíntese de outros metabólitos secundários" para (3), e "metabolismo e biodegradação de xenobióticos" para (4).

Todos os testes estatísticos foram feitos utilizando-se do software STAMP ("Statistical Analysis of Metagenomic Profiles") (PARKS et al., 2014). Para as comparações ao nível taxonômico foi utilizado o teste exato de Fisher, combinado com o método Newcombe-Wilson para calcular os intervalos de confiança (cobertura nominal de 95%), enquanto para a correção de hipóteses múltiplas foi aplicado o teste de Benjamini-Hochberg - FDR para indicar os percentuais de falsos positivos (relatado por valores de q), que devem ser esperados entre todos subsistemas significativos. Já para as previsões funcionais foi utilizado o teste G + Fisher combinado com Newcombe-Wilson corrigido por Bonferroni. Um filtro foi aplicado para remover as amostras com um valor de $q > 0,05$.

Nas análises para a verificação do efeito do parasitismo por *C. flavipes* na microbiota intestinal de *D. saccharalis* e *S. frugiperda* em diferentes períodos após o parasitismo, tempo foi mantido como fator. Para os ensaios conduzidos com parasitoides irradiados, as sequências obtidas para a microbiota intestinal do hospedeiro em cada unidade de tempo amostral foram unidas, permanecendo como fatores apenas a porção do intestino e a condição de parasitismo.

4 RESULTADOS

4.1 Efeito do parasitismo por *Cotesia flavipes* na microbiota intestinal do hospedeiro permissivo *Diatraea saccharalis*

O sequenciamento das bibliotecas metagenômicas da região V4 do 16S rRNA da microbiota intestinal associada a *D. saccharalis* gerou 13.764.326 leituras, sendo, em média, 573.513 por amostra. Após o filtro de qualidade padrão do QIIME, com exceção da alteração do limite Phred para 20, o número total de leituras válidas foi de 9.747.087 (70,8% do total de leituras), com comprimento médio de 253 pb.

Apesar do grande número de sequências obtidas, as análises de rarefação das UTOs contidas no conjunto amostral indicaram que a amostragem obtida foi insuficiente para revelar toda a diversidade de UTOs da microbiota intestinal de *D. saccharalis* (ANEXO A). Porém, o índice de diversidade alfa calculado pelo índice de Shannon demonstra ganhos irrisórios na diversidade com amostragens superiores a cerca 40.000 sequências (Figura 1). Os índices de Shannon obtidos para a microbiota associada à região antero-mediana do intestino de *D. saccharalis* indicam maior diversidade 5 dias após o parasitismo (DAP), enquanto a menor diversidade observada foi a 9 DAP (Figura 1A). Também é possível verificar que os valores de diversidade alfa obtidos para amostras controle e parasitadas, para cada período amostral, são bem próximos um do outro, demonstrando um efeito maior do estágio de desenvolvimento do inseto do que da condição de parasitismo (Figura 1). Na região posterior, no entanto, verificamos maior diversidade alfa 1 DAP em insetos não-parasitados e menor para 9 DAP, sendo semelhante em insetos parasitados e não-parasitados (Figura 1). Mas é no intestino posterior que conseguimos detectar a maior influência do parasitismo na microbiota intestinal do hospedeiro, assim como indicado pelos valores de Shannon obtidos para os insetos parasitados 1 e 5 DAP (Figura 1). Apesar da maior diversidade alfa na microbiota intestinal do proctodéu de lagartas parasitadas por *C. flavipes* no 1 e 5 DAP, a diversidade alfa observada 9 DAP foi muito próxima entre os dois tratamentos (parasitado vs. controle) (Figura 1).

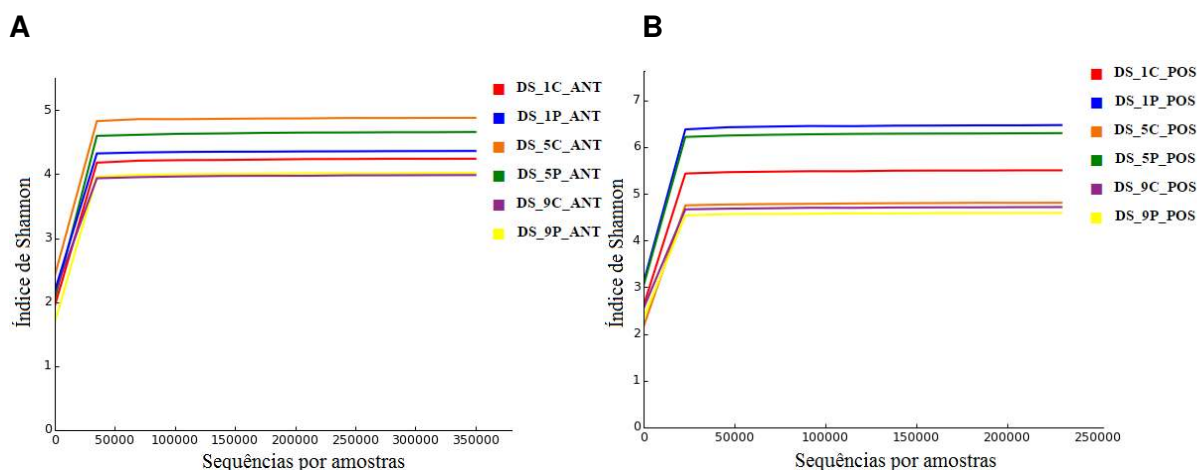


Figura 1 - Índice de diversidade Shannon em função do número de sequências por amostra das regiões **a** antero-mediana (ANT) e **b** posterior (POS) do intestino de lagartas de *Diatraea saccharalis* (DS), após diferentes períodos de desenvolvimento (1, 5 e 9 dias), parasitadas (P) ou não (C) por *Cotesia flavipes*. O patamar em cada curva indica o número mínimo de sequências para capturar a diversidade. Para todas as amostras, a curva tende a assíntota com cerca de 40.000 a 50.000 sequências

As medidas de diversidade beta calculadas pelo método de Jackknife separaram nitidamente os diferentes tratamentos (Figura 2 e ANEXO B). A variação total encontrada na microbiota associada à região antero-mediana do intestino dos diferentes tratamentos analisados foi explicada em 63% pela análise não-ponderada (UNIFRAC não-ponderado) e em 87% pela análise ponderada (UNIFRAC ponderado) (ANEXO B). Em ambas as análises, o eixo PC1 foi o de maior contribuição, explicando 22 e 52% da variação encontrada na microbiota intestinal da porção antero-mediana, respectivamente quando se utilizando da análise não-ponderada e ponderada (ANEXO B). As diferenças encontradas entre as análises não-ponderada e ponderada sugerem que as microbiotas analisadas são mais fortemente influenciadas pela abundância relativa dos seus diferentes componentes do que pela diversidade de UTOs (ANEXO B).

A nítida separação das microbiotas do intestino antero-mediano dos diferentes tratamentos visualizada nas análises de PCoA ganha alta sustentação nas análises de agrupamento UPGMA ponderado e não-ponderado; porém, sem a formação de grupos nitidamente influenciados pelo parasitismo (Figura 2). A análise de UPGMA do UniFrac ponderado também demonstrou maior suporte de *bootstrap*, com valores de sustentação entre 75-100% para todos os grupos formados, demonstrando que diferenças na abundância dos componentes da comunidade é um fator fundamental na separação dos tratamentos. Em ambos os casos, assim como indicado na análise da diversidade alfa, fica evidenciada a forte

influência do estágio de desenvolvimento do hospedeiro na determinação da diversidade de sua microbiota associada à região antero-mediana (Figura 2 e ANEXO B).

O efeito do parasitismo por *C. flavipes* na microbiota intestinal do hospedeiro permissivo *D. saccharalis* foi nitidamente observado na região posterior do intestino. Análises de PCoA da microbiota associada à região posterior do intestino de lagartas de *D. saccharalis* permitiram a melhor separação das microbiotas oriundas de lagartas parasitadas daquelas de lagartas não-parasitadas, com exceção da microbiota obtida 9 DAP, em que a distância entre o parasitado e seu respectivo controle foi muito pequena, evidenciando poucas alterações na comunidade devido ao parasitismo (ANEXO C). Assim como descrito para a região antero-mediana, o eixo PC1 foi o que mais contribuiu para explicar a variação encontrada entre os tratamentos, esclarecendo cerca de 26 e 68% da variação encontrada entre as microbiotas quando utilizando-se de análises não-balanceada e balanceada, respectivamente (ANEXO C). O mesmo foi verificado na análise de agrupamento UPGMA, sendo que todos os grupos formados apresentaram sustentação por *bootstrap* superior a 75% (Figura 2).

A análise da microbiota associada à porção antero-mediana do intestino de *D. saccharalis* indicou que a mesma é composta, em média, predominantemente por bactérias do Filo Proteobacteria (83,2%), seguido por representantes de Firmicutes (9,3%) e Actinobacteria (4,4%) (Figura 2). As três classes de Proteobacteria estão presentes, sendo Gamma-Proteobacteria (75,5%) a dominante e representada basicamente por UTOs não-identificadas pertencentes a Enterobacteriaceae (59,2%). Em Actinobacteria há predomínio da UTO identificada como pertencendo ao gênero *Rubrobacter* (2,6%), enquanto um gênero não-identificado de Planococcaceae (5,1%) é o Firmicutes predominante.

Semelhantemente à região antero-mediana, a região posterior do intestino de *D. saccharalis* tem Proteobacteria (73%) como filo dominante; porém, os filoss Actinobacteria (14%) e Firmicutes (11%) aparecem em maior abundância relativa se comparados ao intestino antero-mediano (Figura 2). Além disso, é possível observar que o parasitismo favoreceu o grupo Firmicutes em relação aos demais. Proteobacteria é representada principalmente por um gênero não-identificado de Enterobacteriaceae (44,6%), enquanto Firmicutes e Actinobacteria tem como principais representantes um gênero não-identificado de Planococcaceae (6,2%) e *Streptomyces* (6,6%), respectivamente.

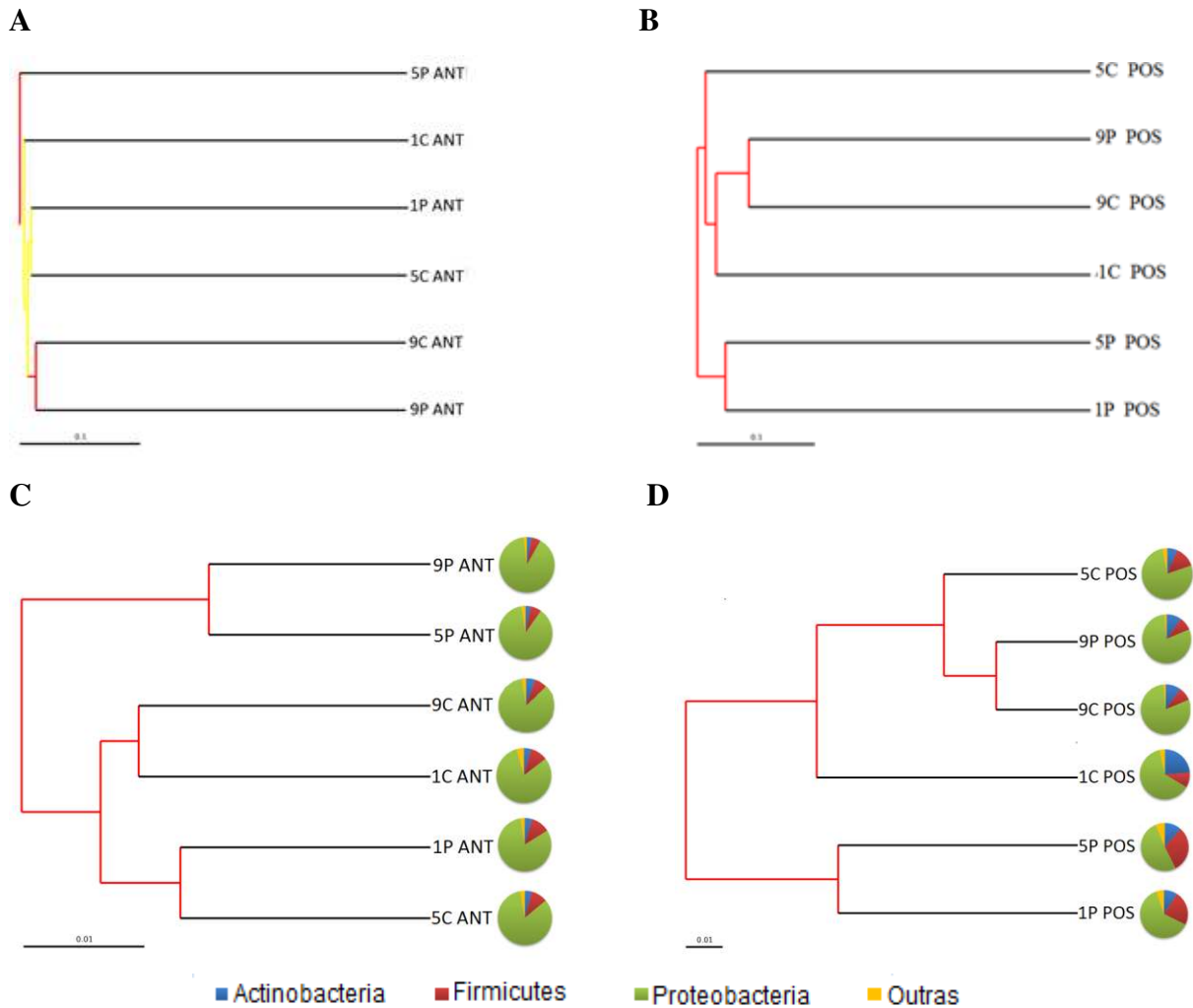


Figura 2 - Análise de agrupamento (UPGMA) não-ponderada (*a, b*) e ponderada (*c, d*) e abundância relativa (*c, d*) da microbiota associada à região antero-mediana (ANT) (*a, c*) e posterior (POS) (*b, d*) do intestino de lagartas de *Diatraea saccharalis*, após diferentes períodos de desenvolvimento (1, 5 e 9 dias) do parasitismo (P) ou não (C). As cores dos nós da análise de UPGMA (*a-d*) representam a porcentagem de suporte: vermelho: 75-100%; amarelo: 50-75% de suporte bootstrap. A abundância relativa (%) de filós de bactérias da microbiota intestinal associada a lagartas de *D. saccharalis* parasitadas ou não por *Cotesia flavipes* (*c, d*) é ilustrada em histogramas

Considerando os principais gêneros, ou seja, os que aparecem com abundância relativa mínima de 5% em pelo menos um dos tratamentos, é possível verificar que o parasitismo produziu alterações na composição da comunidade bacteriana intestinal de *D. saccharalis* (Figura 3). O parasitismo induziu a diminuição da abundância das UTOs pertencentes a Enterobacteriaceae, as dominantes na microbiota da porção antero-mediana do intestino de *D. saccharalis*, no primeiro dia após o parasitismo (1DAP), ao mesmo tempo em que foi observado aumento na abundância geral das demais UTOs nessa comunidade (Figura 3). No

quinto dia após o parasitismo, foi observado aumento nas UTOs pertencentes a Enterobacteriaceae e naquelas referentes a *Acinetobacter*, com diminuição das demais em lagartas parasitadas se comparadas àquelas não-parasitadas (Figura 3). No nono dia de desenvolvimento após o parasitismo, a abundância relativa das UTOs representando *Acinetobacter* foi aumentada, enquanto a das demais UTOs foi reduzida (Figura 3).

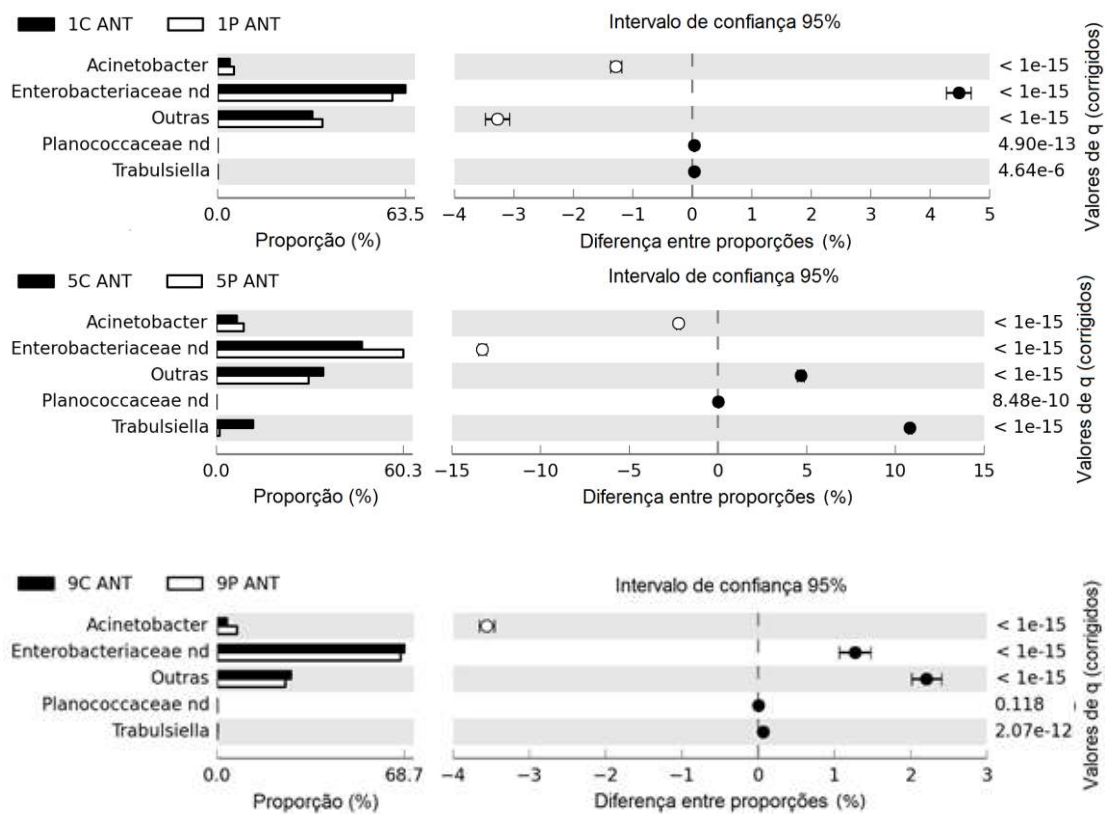


Figura 3 - Diferenças na proporção relativa (%) de gêneros de bactéria com abundância mínima de 5% na microbiota intestinal associada à região antero-mediana (ANT) do intestino de lagartas de *Diatraea saccharalis* em diferentes períodos de desenvolvimento (1, 5 e 9 dias) após o parasitismo (P) ou não (C) por *Cotesia flavipes*

Na região posterior do intestino de *D. saccharalis*, o parasitismo influenciou de forma negativa a abundância relativa de *Streptomyces* e de UTOs representando os gêneros não-identificados de Enterobacteriaceae e Xantomonadaceae em detrimento do aumento dos demais, já no primeiro dia após o parasitismo (Figura 4). O mesmo padrão se repetiu no quinto dia após o parasitismo, com a exceção das UTOs indeterminadas de Xantomonadaceae, que tiveram sua abundância relativa aumentada. No nono dia após o

parasitismo, as alterações foram menos conspícuas, com aumento das UTOs referentes a *Shingobium* e *Streptomyces* e das UTOs correspondentes ao gênero predominante não-identificado de Enterobacteriaceae. As demais UTOs sofreram redução em sua abundância, não havendo alterações significativas nas UTOs correspondentes a uma Planococcaceae não-identificada (Figura 4).

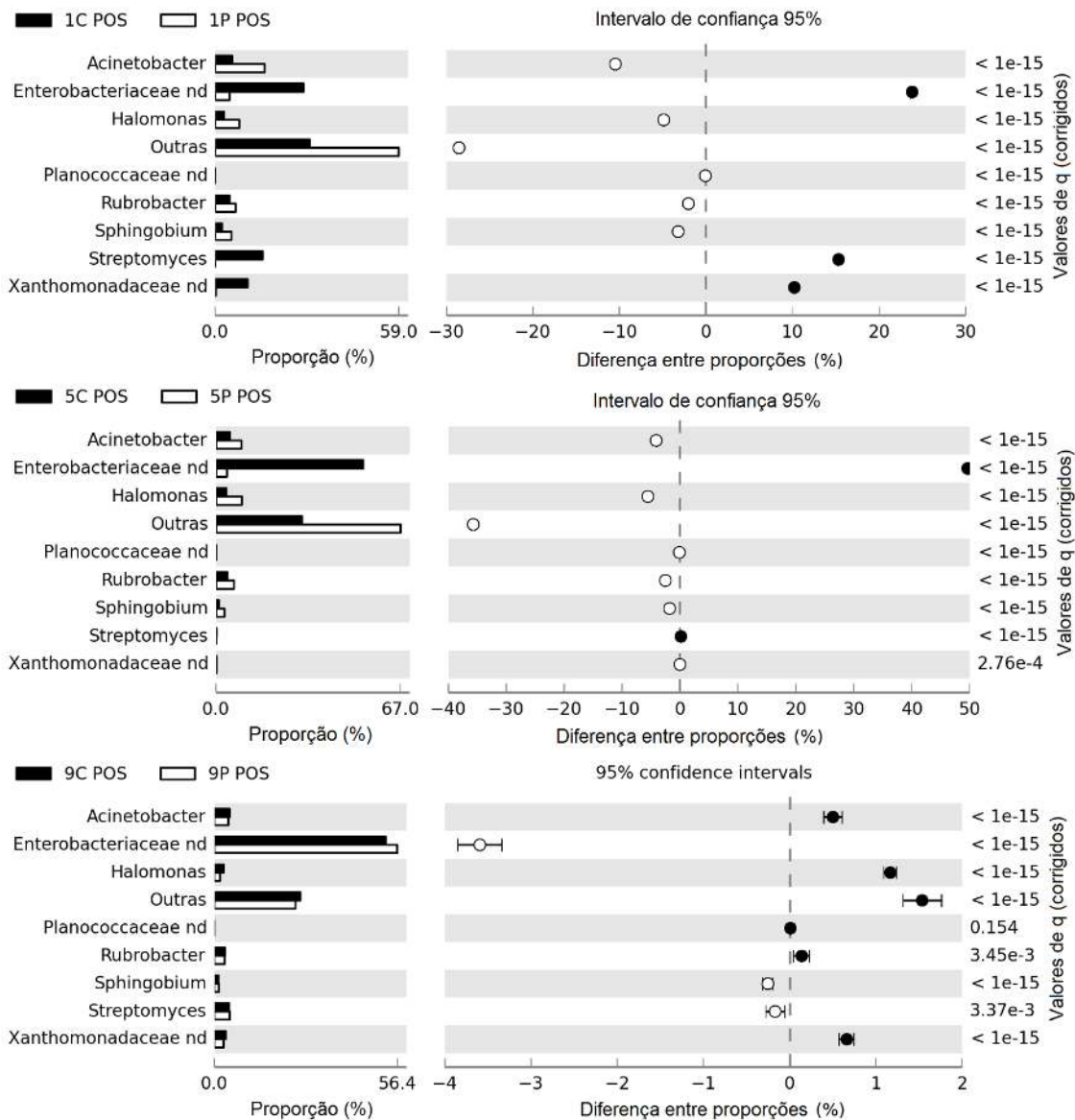


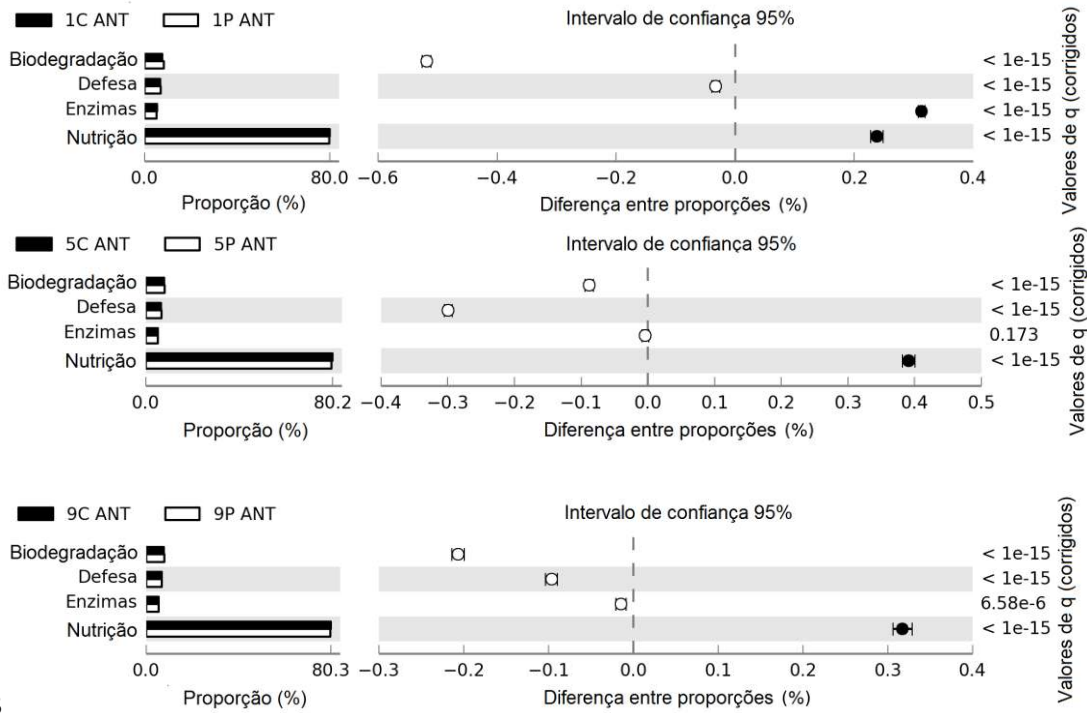
Figura 4 - Diferenças na proporção relativa (%) de gêneros de bactéria com abundância mínima de 5% na microbiota intestinal associada à região posterior (POS) do intestino de lagartas de *Diatraea saccharalis* parasitadas (P) ou não (C) por *Cotesia flavipes*, em diferentes períodos de desenvolvimento (1, 5 e 9 dias)

A análise do potencial de contribuição funcional da microbiota pela estimativa da diversidade e abundância gênica dessa microbiota demonstrou um amplo potencial funcional da microbiota associada ao trato digestivo de *D. saccharalis* (ANEXO D). Além disso, foi possível verificar que as alterações induzidas pelo parasitismo influenciaram o potencial de contribuição funcional da microbiota intestinal do hospedeiro, podendo, assim, interferir em outras relações bióticas e abióticas estabelecidas pelo hospedeiro (ANEXO D).

O potencial de contribuição funcional da microbiota associada à região antero-mediana do intestino de *D. saccharalis* foi alterada pelo parasitismo. Já com 1 DAP, houve a elevação do potencial de contribuição da microbiota para a degradação de xenobióticos e defesa (Figura 5). Ao mesmo tempo, diminuiu o potencial para nutrição e enzimas (Figura 5). No quinto dia após o parasitismo, o mesmo padrão de alterações foi mantido, exceto por não alterar o potencial relativo a enzimas (Figura 5). No nono dia o parasitismo reduziu o potencial relativo de contribuição da microbiota quanto à nutrição, enquanto elevou os demais (Figura 5).

Houve alteração também no potencial da microbiota intestinal de *D. saccharalis* associada a porção posterior. No 1 DAP, houve elevação apenas do potencial relativo a biodegradação, com redução dos demais. No 5 DAP, além de biodegração, o potencial de defesa também foi elevado. Já no 9 DAP, ocorreu o inverso do padrão observado no 5 DAP (Figura 5).

A



B

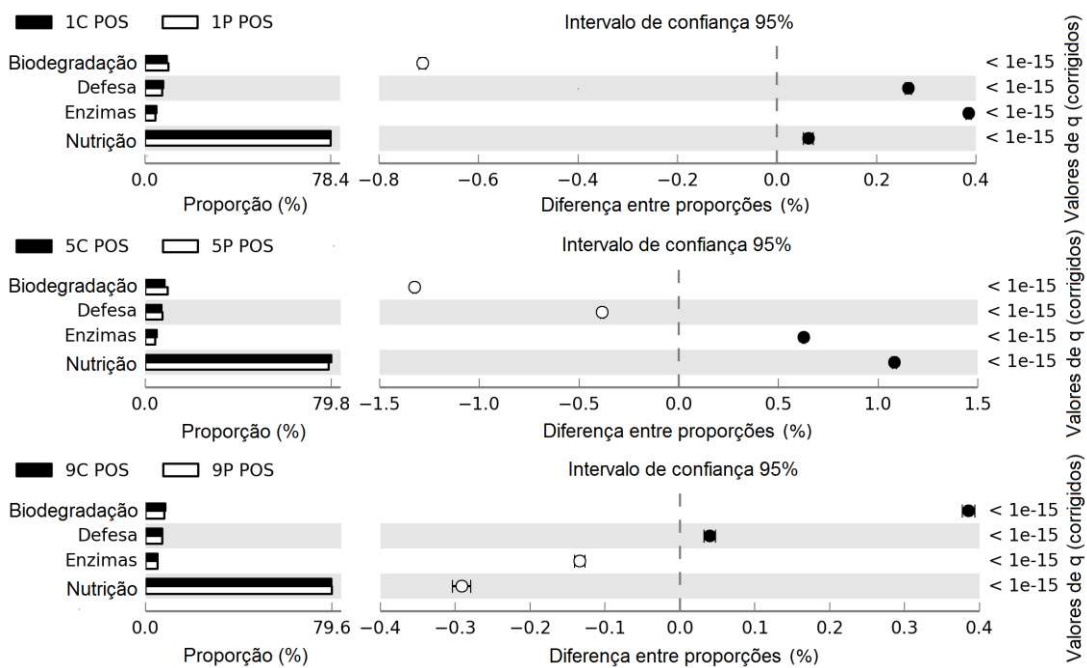


Figura 5 - Diferenças (%) no potencial de contribuição funcional da microbiota das regiões *a* antero-mediano e *b* posterior do intestino de lagartas de *Diatraea saccharalis* em diferentes períodos de desenvolvimento (1, 5 e 9 dias), parasitadas (P) ou não (C) por *Cotesia flavipes*, em relação à biodegradação, defesa, produção de enzimas e nutrição

4.2 Efeito do parasitismo por *Cotesia flavipes* na microbiota intestinal do hospedeiro não-permissivo *Spodoptera frugiperda*

O número total de leituras obtidas após sequenciamento de bibliotecas metagenômicas da região V4 do 16S rRNA da microbiota associada ao intestino de lagartas de *S. frugiperda* foi de 13.824.843. Esse número foi reduzido para 8.771.445 (63,4%) leituras após aplicação do filtro de qualidade padrão do QIIME. O comprimento médio das leituras foi de 253 pb.

As curvas de rarefação da microbiota associadas ao trato digestivo de *S. frugiperda* tenderam à assíntota, indicando sucesso no esforço amostral para a completa amostragem da diversidade existente (ANEXO J), sendo ainda mais evidente quando da análise do efeito do tamanho amostral nos índices de diversidade alfa, dados pelo índice de Shannon (Figura 6). *Spodoptera frugiperda* mostrou diferentes perfis de saturação, indicando variação na diversidade entre as amostras (ANEXO K e Figura 6). Ao contrário da microbiota de *D. saccharalis*, a microbiota associada à região antero-mediana e posterior de *S. frugiperda* não apresentou padrão consistente de diversidade nos períodos amostrais quando a microbiota dos insetos não-parasitados é comparada àquela dos parasitados (Figura 6). Ao observarmos os índices de Shannon calculados, verifica-se que a diversidade da microbiota na região antero-mediana do intestino de *S. frugiperda* com 1 e 5 DAP foi bastante reduzida nos indivíduos parasitados, ocorrendo o inverso aos 9 DAP (Figura 6). Na região posterior do intestino, a diversidade da microbiota aos 5 DAP foi menor nos indivíduos parasitados se comparada a dos parasitados, ocorrendo o inverso aos 1 e 9 DAP (Figura 6).

Na análise de Jackknife, as sequências foram aleatoriamente sub-amostradas e a semelhança entre a microbiota foi quantificada com base em relações filogenéticas por UniFrac em PCoA e análise de agrupamento UPGMA. Na análise de PCoA da porção antero-mediana, houve separação entre a microbiota dos diferentes tratamentos, sendo explicados 73% da variabilidade total existente pelas análises de UniFrac não-ponderadas e 97% pelas análises de UniFrac ponderadas, evidenciando o importante papel da abundância dos membros da microbiota intestinal na separação dos tratamentos (ANEXO K).

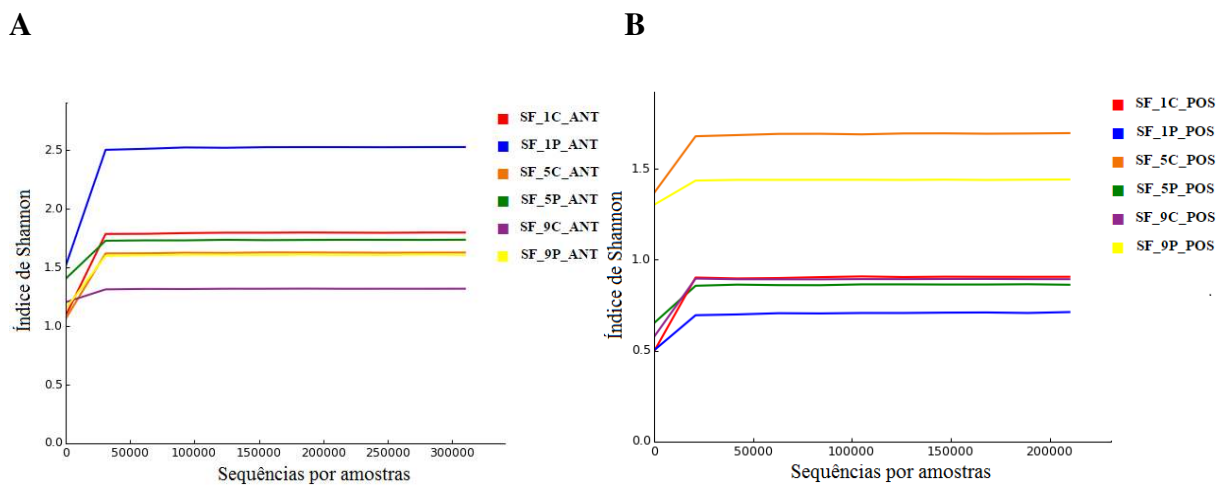


Figura 6 - Índice de diversidade Shannon em função do número de seqüências amostradas da microbiota associada às regiões **a** antero-mediana (ANT) e **b** posterior (POS) do intestino de lagartas de *Spodoptera frugiperda* (SF) em diferentes períodos de desenvolvimento (1, 5 e 9 dias) após o parasitismo (P) ou não (C) por *Cotesia flavipes*. O patamar em cada curva indica o número mínimo de seqüências para capturar a diversidade

As análises de UPGMA indicaram forte sustentação para os grupos formados, principalmente quando se levou em conta a abundância dos diferentes componentes da microbiota intestinal (UniFrac ponderado), visto que nesse caso os valores de suporte de *bootstrap* obtidos foram sempre superiores a 75% (Figura 7). Porém, vários dos valores de suporte de *bootstrap* obtidos para os grupos formados pela análise de UPGMA, levando-se em consideração apenas o relacionamento filogenético dos diferentes componentes da microbiota (UniFrac não-ponderado), foram inferiores a 50% (Figura 7a). Não foi evidenciada a formação de grupos distintos entre parasitadas e não-parasitadas, não sendo também evidenciada a formação de grupos devido ao estágio de desenvolvimento do inseto, com exceção para aqueles no primeiro dia após o parasitismo (Figura 7a, c).

A estrutura da comunidade bacteriana associada à porção posterior do trato digestivo de *S. frugiperda* também sofreu maior variação ao considerarmos a abundância dos grupos, explicando de 97% a 100% da variabilidade total existente nas análises não-ponderadas e ponderadas, respectivamente (Figuras 7b, d). Novamente, o eixo PC1 explicou 42 e 96% da variação observada entre as microbiotas analisadas pelos métodos não-balanceado e balanceado (Figuras 7b, d; ANEXO L). As análises de UPGMA pelo método não-ponderado resultaram na formação de dois grandes grupos com valores de suporte de *bootstrap* acima de 50% (Figura 7 b). Um desses grupos reúne a microbiota de lagartas com 1 DAP, parasitadas

ou não, apesar das mesmas terem resolvido em subgrupo distinto, e a microbiota de lagartas não-parasitadas aos 5 DAP. O outro grupo reúne em um mesmo subgrupo as microbiotas das lagartas parasitadas e não-parasitadas aos 9 DAP, permanecendo a microbiota de lagartas parasitadas aos 5 DAP colocada externamente a esse subgrupo (Figura 7b).

Já nas análises de UPGMA pelo método ponderado, verifica-se a formação de três grupos principais, todos com suporte de bootstrap superior a 75% (Figura 7d). Nesse caso é possível visualizar que a microbiota associada à porção posterior do intestino de lagartas parasitadas de *S. frugiperda* 1 DAP é a mais distinta de todas, colocando-se em um ramo isolado (Figura 7d). A microbiota de lagartas não-parasitadas aos 1 e 5 DAP resolveram em um subgrupo único, enquanto aquela aos 9 DAP se colocou em um grupo junto ao das microbiotas de lagartas parasitadas aos 5 e 9 DAP, ficando em um subgrupo junto ao da microbiota de lagartas parasitadas aos 5 DAP (Figura 7d). Considerando a abundância das UTOs, ou seja, amostras ponderadas, observa-se pouca variação, a qual é evidenciada pela pequena formação de elipsoides ao redor das amostras (ANEXO L).

De modo geral, a comunidade bacteriana do intestino de *S. frugiperda* é predominantemente composta por *Enterococcus* e um gênero não-identificado de Lactobacillales. *Enterococcus* predomina em ambas as porções analisadas do intestino; porém, na região posterior, o gênero indeterminado pertencente a ordem Lactobacillales é encontrado em maior abundância do que na região antero-mediana (Figuras 8 e 9).

O parasitismo induziu alterações na abundância das UTOs encontradas. Enquanto a UTO identificada como sendo próxima a *Enterococcus* apresentou pequeno aumento em sua abundância na região antero-mediana do intestino, a UTO pertencente a Lactobacillales sofreu leve redução devido ao parasitismo. Este padrão se manteve durante os três períodos analisados (Figura 8). Na região posterior, o parasitismo induziu a redução de ambas UTOs no início do parasitismo, ocorrendo elevação da abundância relativa da UTO *Enterococcus* na fase intermediária do parasitismo. Ao final do parasitismo, houve a inversão do padrão anteriormente observado (Figura 9).

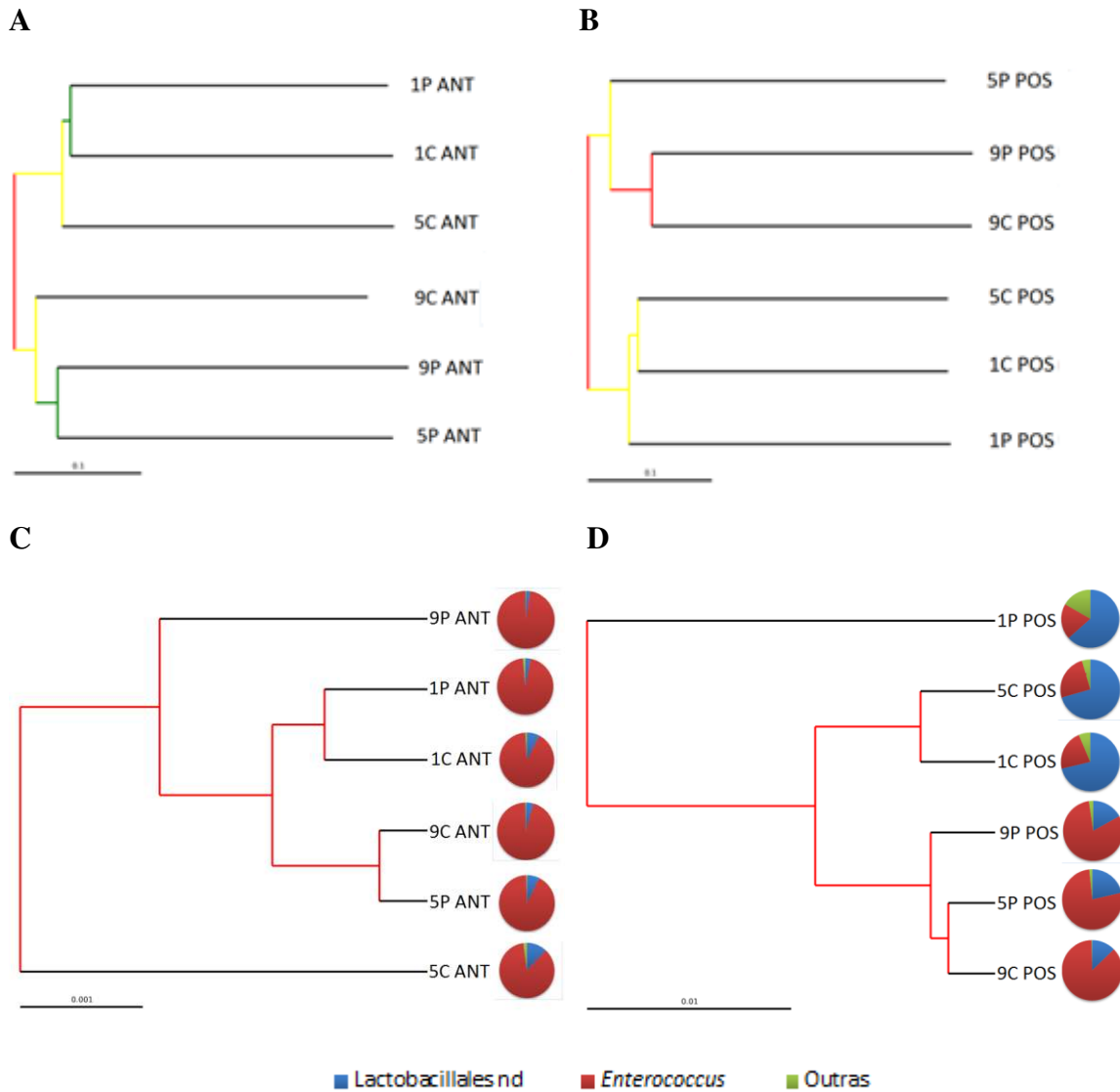


Figura 7 - Análise de agrupamento (UPGMA) não-ponderada (**a**, **b**) e ponderada (**c**, **d**) e abundância relativa (**c**, **d**) da microbiota associada à região antero-mediana (ANT) (**a**, **c**) e posterior (POS) (**b**, **d**) do intestino de lagartas de *S. frugiperda*, após diferentes períodos de desenvolvimento (1, 5 e 9 dias) do parasitismo (P) ou não (C). As cores dos nós da análise de UPGMA (**a-d**) representam a porcentagem de suporte: vermelho: 75-100%; amarelo: 50-75%; verde: 25-50% de suporte bootstrap. A abundância relativa (%) de filos de bactérias da microbiota intestinal associada a lagartas de *S. frugiperda* parasitadas ou não por *Cotesia flavipes* (**c**, **d**) é ilustrada em gráficos circulares (*nd* = gênero não-identificado)

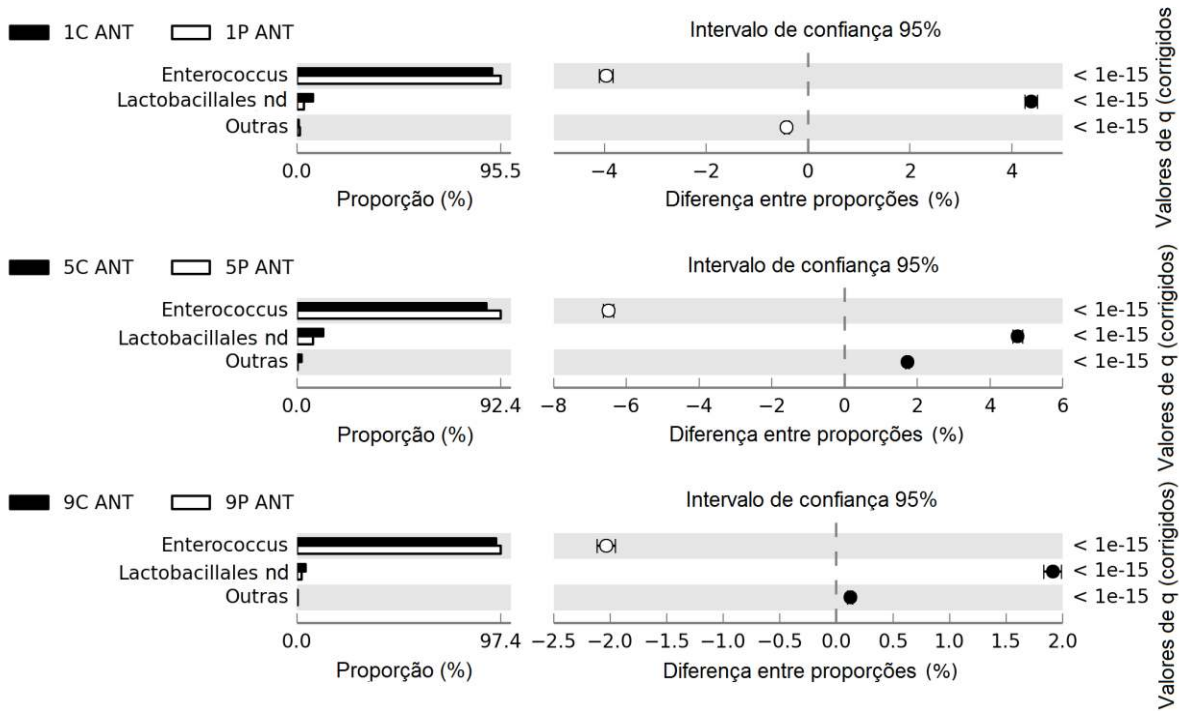


Figura 8 - Diferenças na proporção relativa (%) de gêneros de bactéria com abundância mínima de 5% na microbiota intestinal associada à região antero-mediana (ant) do intestino de lagartas de *Spodoptera frugiperda* em diferentes períodos de desenvolvimento (1, 5 e 9 dias) após o parasitismo (p) ou não (c) por *Cotesia flavipes*

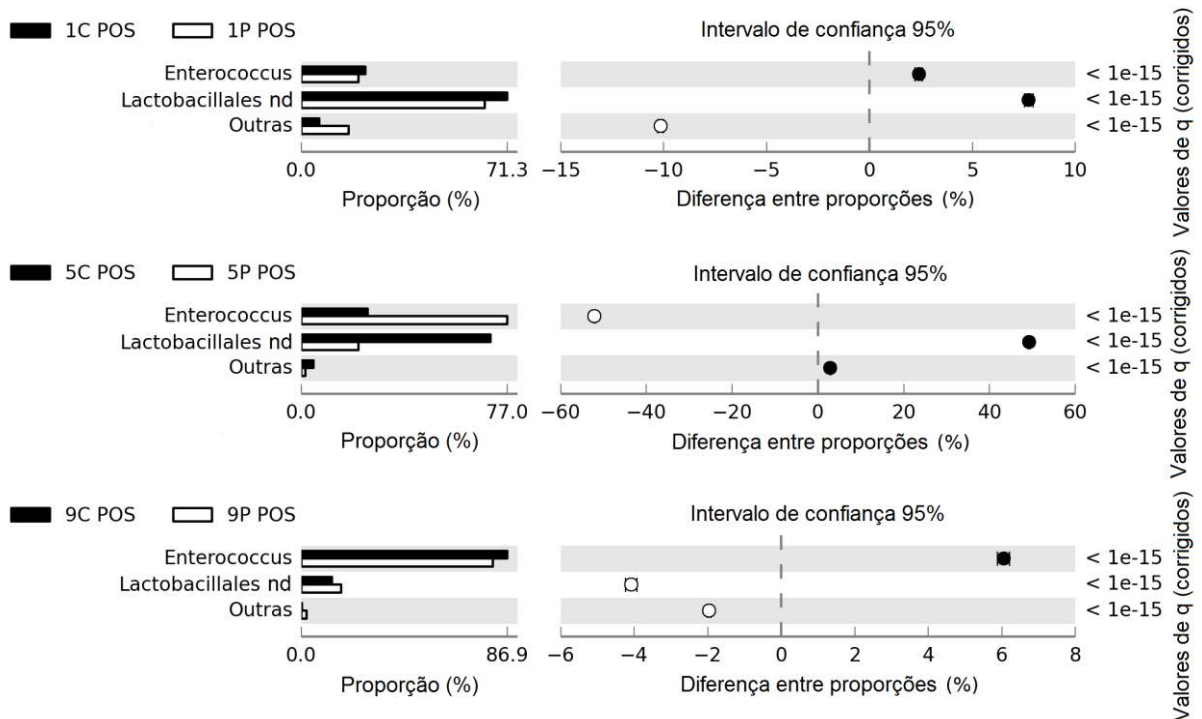


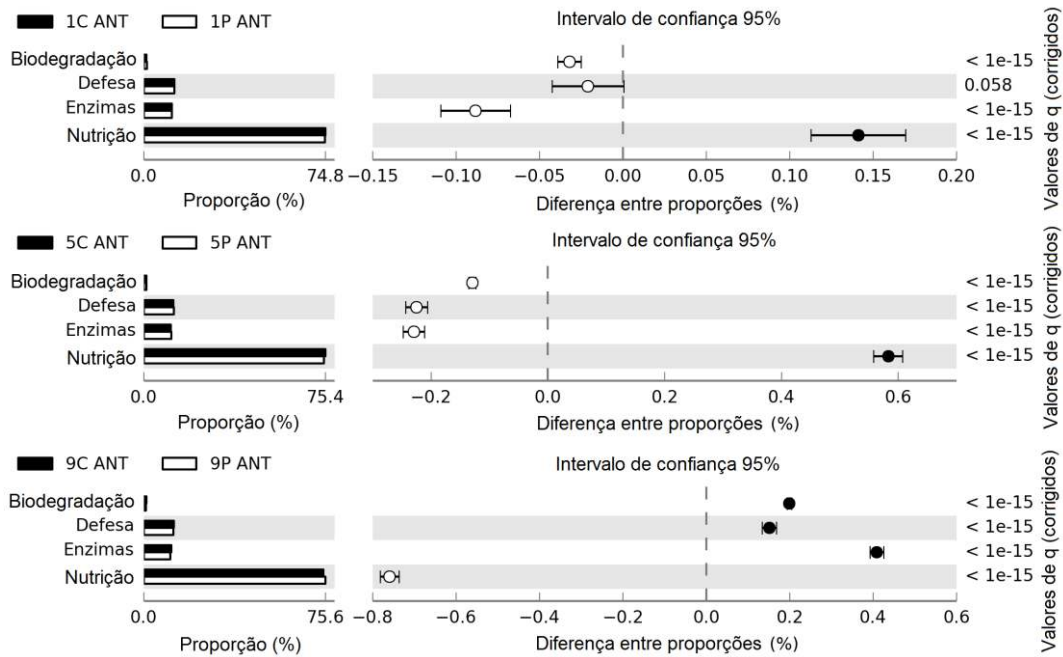
Figura 9 - Diferenças na proporção relativa (%) de gêneros de bactéria com abundância mínima de 5% na microbiota intestinal associada à região posterior (POS) do intestino de lagartas de *Spodoptera frugiperda* em diferentes períodos de desenvolvimento (1, 5 e 9 dias) após o parasitismo (P) ou não (C) por *Cotesia flavipes*

O parasitismo por *C. flavipes* alterou o número de genes funcionais da microbiota intestinal. As alterações no potencial de contribuição da microbiota associada à porção antero-mediana do intestino do hospedeiro não-permissivo 1 DAP foi próxima àquela observada para a microbiota do hospedeiro permissivo, *D. saccharalis*, sendo observado um aumento no potencial de contribuição para a biodegradação e produção de enzimas, com redução no potencial de contribuição para nutrição (Figura 10). No quinto dia após o parasitismo, somente nutrição foi afetada negativamente, sendo as demais categoriais favorecidas. Já aos 9 DAP, todos os padrões de alteração foram invertidos em relação ao quinto dia (Figura 10). O potencial de contribuição funcional da microbiota associada à porção posterior do intestino de *S. frugiperda* também foi alterado logo no 1 DAP, com a elevação do potencial de biodegradação e redução dos demais (Figura 10). No 5 DAP, o potencial de contribuição para nutrição e enzimas foi reduzido, enquanto aquele para biodegradação e defesa foi elevado. No 9 DAP repetiu-se o padrão do primeiro dia após o parasitismo (Figura 10).

4.3 Efeitos das secreções maternas na regulação da microbiota do hospedeiro permissivo

O índice de Shannon obtido para a microbiota associada à região antero-mediana do intestino de *D. saccharalis* parasitadas por fêmeas estéreis de *C. flavipes* foi semelhante ao obtido para lagartas controle (Figura 11), mas o índice obtido para a região posterior do intestino de *D. saccharalis* diferiu daquele do controle. Houve ganhos irrisórios na diversidade com amostragens superiores a cerca de 40.000 sequências (Figura 11), semelhantemente ao descrito anteriormente para lagartas parasitadas por fêmeas não irradiadas de *C. flavipes*.

A



B

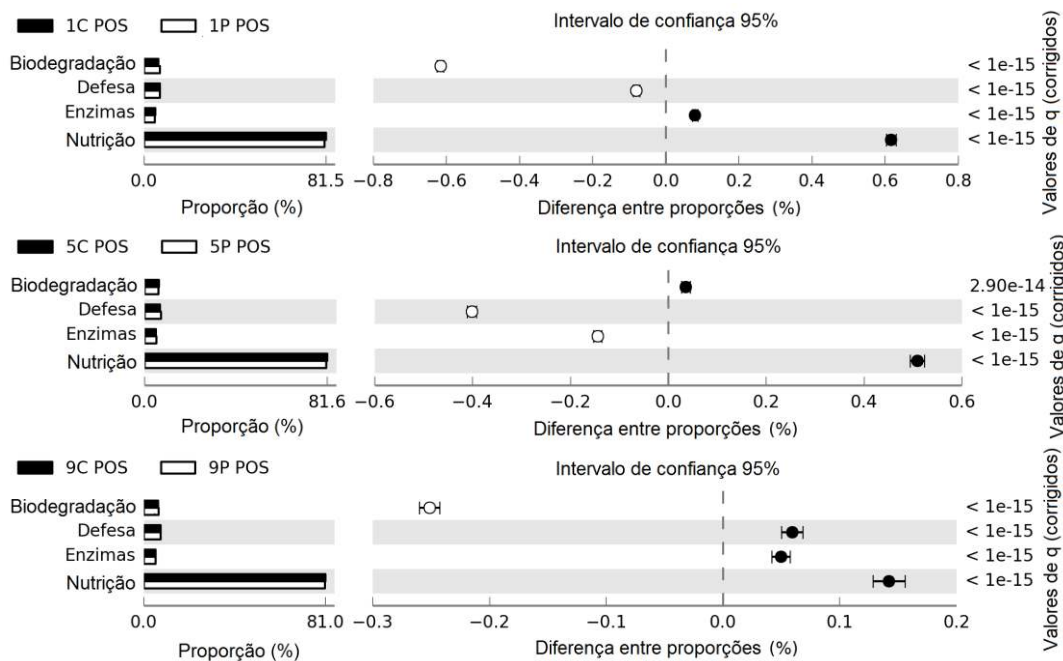


Figura 10 - Diferenças (%) no potencial de contribuição funcional da microbiota das regiões **a** antero-mediano e **b** posterior do intestino de lagartas de *Spodoptera frugiperda* em diferentes períodos de desenvolvimento (1, 5 e 9 dias), parasitadas (P) ou não (C) por *Cotesia flavipes*, em relação à biodegradação, defesa, produção de enzimas e nutrição

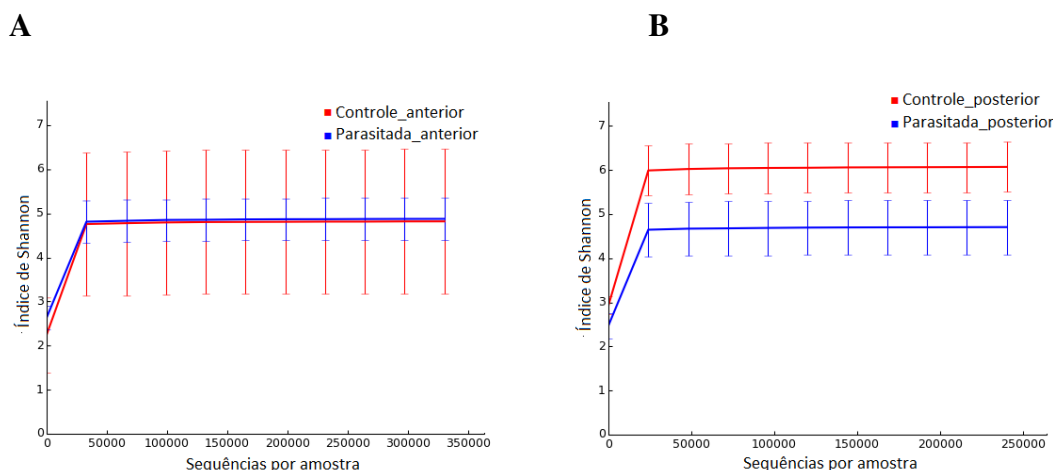
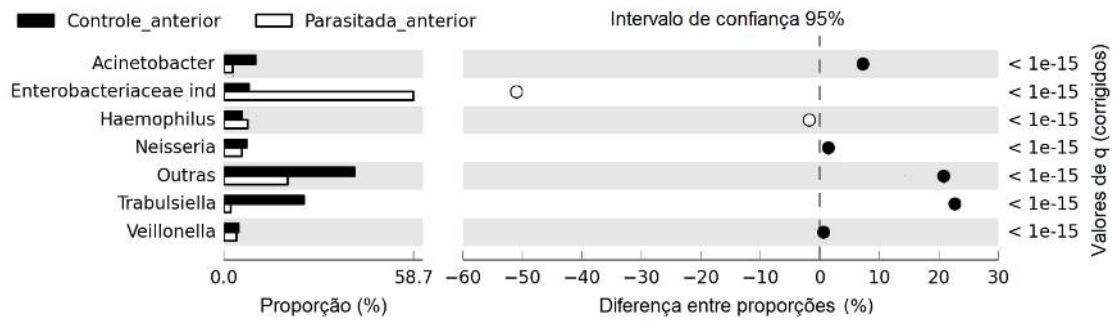


Figura 11 - Índice de diversidade Shannon em função do número de sequências por amostra das regiões **a** antero-mediana e **b** posterior do intestino de lagartas de *Diatraea saccharalis*, parasitadas ou não (controle) por *Cotesia flavipes* esterilizadas por radiação

Apesar da semelhança nos valores de diversidade alfa calculados, análises da abundância relativa de UTOs representativas de gêneros com pelo menos 5% de abundância relativa indicaram haver alterações na composição da comunidade bacteriana intestinal de *D. saccharalis* em resposta às secreções maternas injetadas por fêmeas irradiadas de *C. flavipes* (Figura 12). Na porção antero-mediana do intestino de *D. saccharalis*, estas secreções induziram o aumento da abundância das UTOs de um gênero não-identificado de Enterobacteriaceae e de *Haemophilus*, ao mesmo tempo em que foi observado diminuição na abundância geral das demais UTOs nessa comunidade (Figura 12). Na porção posterior, foi observado o incremento no número de UTOs somente daquelas pertencentes a um gênero não-identificado de Enterobacteriaceae e de UTOs referentes a *Trabulsuela*, com declínio na abundância relativa das demais (Figura 12).

A análise funcional permitiu a verificação de que as alterações induzidas pelas secreções maternas influenciaram o potencial de contribuição da microbiota intestinal do hospedeiro permissivo quando parasitado por fêmeas irradiadas de *C. flavipes* (ANEXO Q). Após a análise dos grupos funcionais selecionados, observou-se maior abundância de genes relacionados ao potencial de contribuição da microbiota da região antero-mediana do intestino de lagartas de *D. saccharalis* parasitadas por fêmeas irradiadas de *C. flavipes* (Figura 13). No entanto, o potencial de contribuição funcional da microbiota quanto à defesa e biodegradação foi reduzido na região posterior do intestino de lagartas de *D. saccharalis* parasitadas por fêmeas irradiadas de *C. flavipes*, enquanto o potencial dessa microbiota para contribuir com a nutrição e produção de enzimas foi favorecido (Figura 13).

A



B

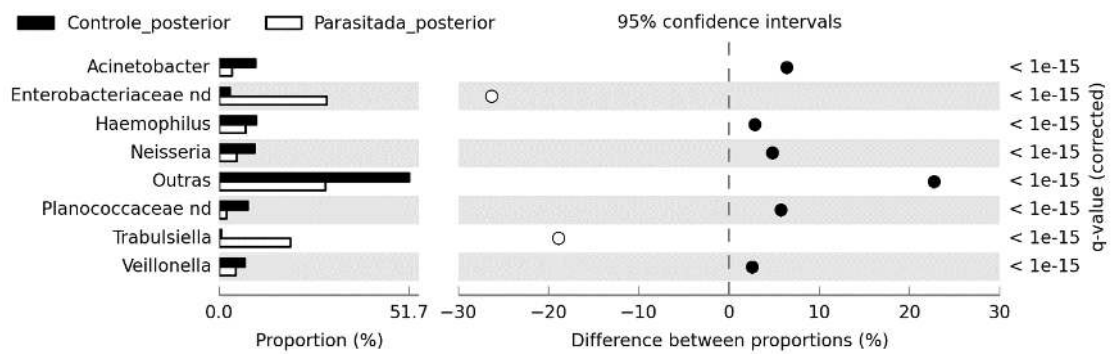
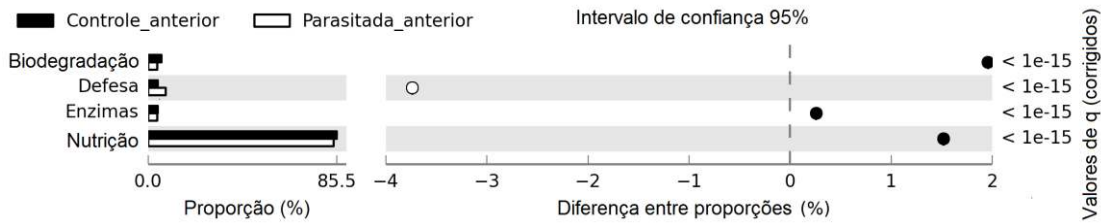


Figura 12 - Diferenças na proporção relativa (%) de gêneros de bactéria com abundância mínima de 5% na microbiota intestinal associada às regiões **a** antero-mediana e **b** posterior do intestino de lagartas de *Diatraea saccharalis* parasitadas ou não (controle) por *Cotesia flavipes* esterilizadas por radiação (nd = gênero não-identificado)

A



B

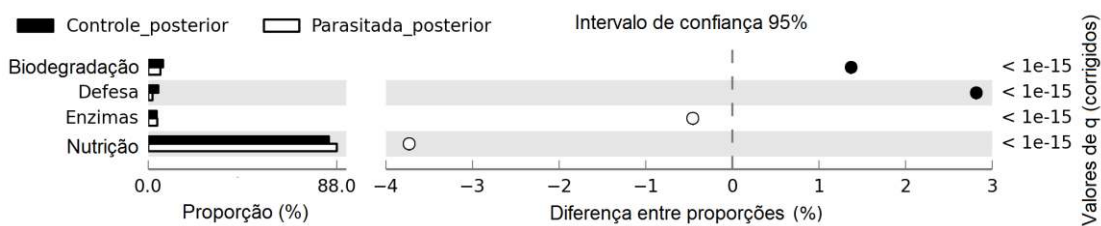
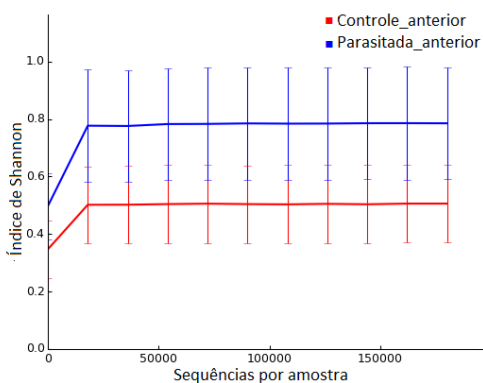


Figura 13- Diferenças (%) no potencial de contribuição funcional da microbiota das regiões **a** antero-mediano e **b** posterior do intestino de lagartas de *Diatraea saccharalis* parasitadas ou não (controle) por *Cotesia flavipes*, em relação à biodegradação, defesa, produção de enzimas e nutrição

4.4 Efeitos das secreções maternas na regulação da microbiota do hospedeiro não-permissivo

O parasitismo de lagartas do hospedeiro não-permissivo *S. frugiperda* por fêmeas irradiadas de *C. flavipes* induziu alterações na diversidade alfa da microbiota associada a ambas as porções do intestino do hospedeiro analisadas (Figura 14).

A



B

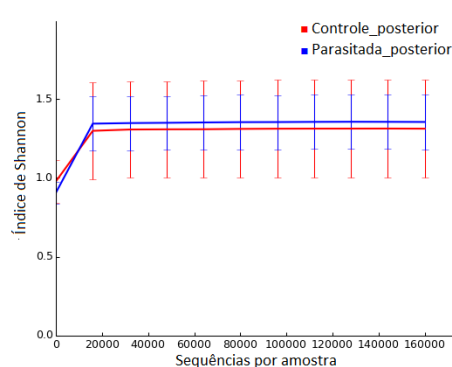


Figura 14 - Índice de diversidade Shannon em função do número de seqüências por amostra das regiões **a** antero-mediana e **b** posterior do intestino de lagartas de *Spodoptera frugiperda*, parasitadas ou não (controle) por *Cotesia flavipes* esterilizadas por radiação

As secreções maternas do parasitoide induziram alterações na abundância das UTOs na comunidade intestinal de *S. frugiperda*. A UTO identificada como sendo próxima a

Enterococcus apresentou redução em sua abundância relativa na região antero-mediana do intestino, já as UTOs de gênero não-indentificado de Lactobacillales aumentaram em abundância (Figura 15a). O mesmo padrão se repetiu na região posterior (Figura 15b).

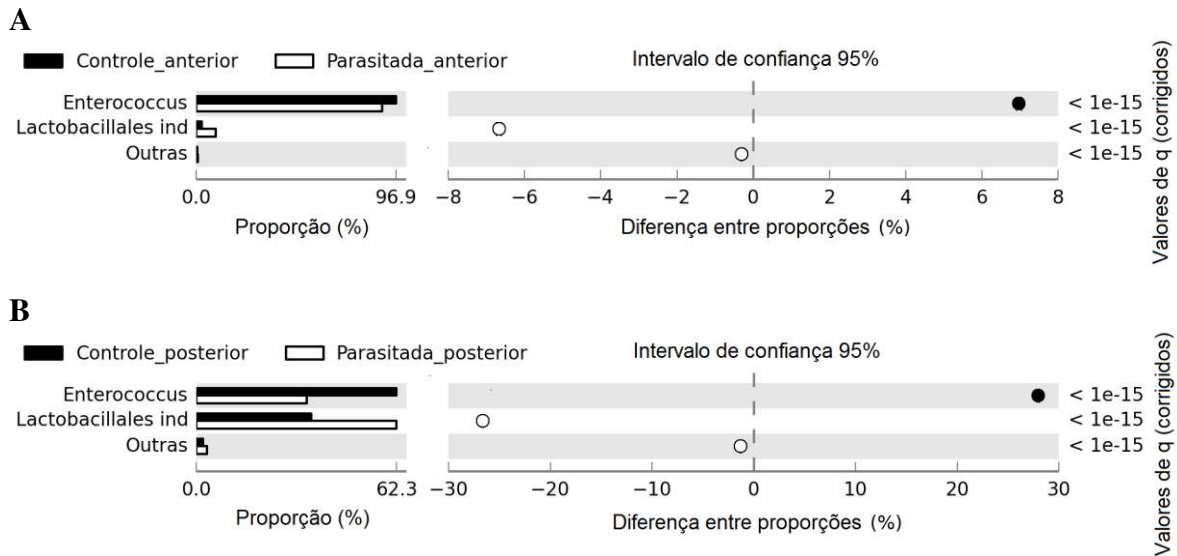


Figura 15 - Diferenças na proporção relativa (%) de gêneros de bactéria com abundância mínima de 5% na microbiota intestinal associada às regiões **a** antero-mediana e **b** posterior do intestino de lagartas de *Spodoptera frugiperda* parasitadas ou não (controle) por *Cotesia flavipes* esterilizadas por radiação (nd = gênero não-identificado)

O parasitismo de *S. frugiperda* por *C. flavipes* irradiadas alterou o potencial de contribuição funcional da microbiota intestinal do hospedeiro (ANEXO T). As alterações no potencial de contribuição da microbiota associada ao intestino de *S. frugiperda* foram menos evidentes do que as encontradas no hospedeiro permissivo, *D. saccharalis*. Houve aumento no potencial de contribuição quanto à nutrição, mas redução em relação à biodegradação, defesa e produção de enzimas pela microbiota associada à região antero-mediana (Figura 16a). Na porção posterior intestino de *S. frugiperda*, somente o potencial de contribuição quanto à defesa foi afetado negativamente (Figura 16b).

A

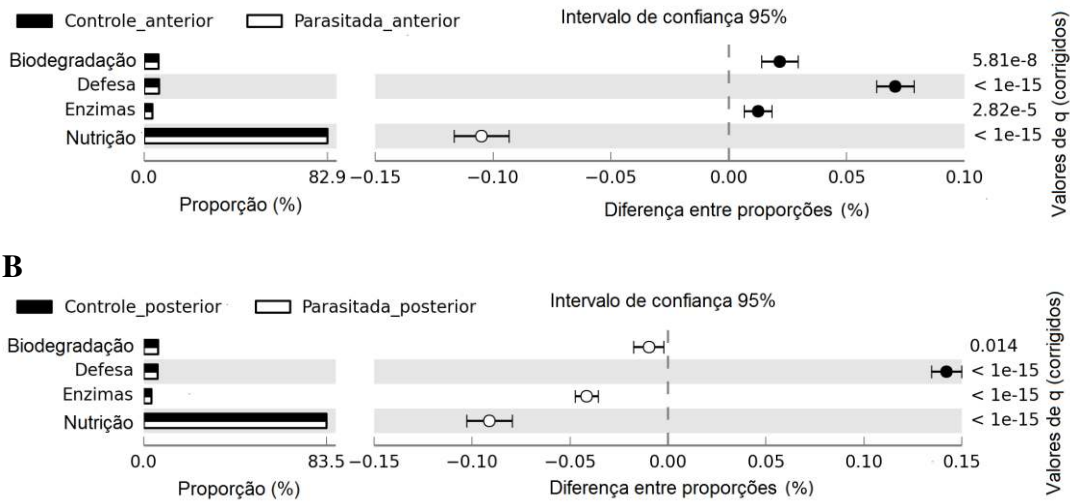


Figura 16 - Diferenças (%) no potencial de contribuição funcional da microbiota das regiões **a** antero-mediano e **b** posterior do intestino de lagartas de *Spodoptera frugiperda* parasitadas ou não (controle) por *Cotesia flavipes*, em relação à biodegradação, defesa, produção de enzimas e nutrição

5 DISCUSSÃO

As alterações associadas ao processo de regulação hospedeira pelo parasitoide *C. flavipes* ao atacar hospedeiros de modo a regular a fisiologia e a bioecologia dos mesmos a fim de promover um ambiente favorável ao estabelecimento e desenvolvimento de sua prole, também resultam em alterações da microbiota intestinal associada ao hospedeiro, seja ele permissivo ou não. As alterações causadas na estrutura da microbiota intestinal modificam o potencial de contribuição funcional da mesma, dada a alteração da diversidade e abundância de genes da microbiota envolvidos em processos de interesse. Ao manipular a microbiota intestinal hospedeira e o potencial de contribuição funcional da mesma, o parasitoide altera as relações estabelecidas entre hospedeiro-microbiota, influenciando a microbiota a contribuir funcionalmente para processos que sejam de interesse à manipulação da qualidade hospedeira e à sobrevivência e desenvolvimento do parasitoide. Sendo assim, a microbiota intestinal do hospedeiro torna-se mais um fator a ser considerado nos estudos de ecologia nutricional de parasitoides, bem como uma fonte interessante de novos processos de regulação direta e/ou indireta do hospedeiro por parasitoides.

As alterações na microbiota intestinal do hospedeiro permissivo *D. saccharalis* e do não-permissivo *S. frugiperda*, induzidas pelo parasitismo por *C. flavipes*, caracterizam o estabelecimento de um processo de disbiose (TAMBOLI et al., 2004) ou seja, aquele em que há apenas alteração do balanço entre os diferentes componentes da microbiota, sem que haja alteração na sua diversidade específica. Estes resultados indicam que as alterações da microbiota intestinal hospedeira são independentes da história evolutiva da interação hospedeiro-parasitoide e do sucesso do parasitoide em explorar um determinado hospedeiro, como observado na relação *S. frugiperda* - *C. flavipes*. Porém, as modificações da microbiota intestinal do hospedeiro não-permissivo foram menos intensas do que aquelas observadas no hospedeiro permissivo, *D. saccharalis*. Assim, outros fatores relacionados aos processos de crescimento e desenvolvimento do parasitoide também devem influenciar as alterações induzidas na microbiota intestinal do hospedeiro. Essa hipótese ganha sustentação ao verificarmos que as diferenças na estrutura e no potencial de contribuição da microbiota intestinal de lagartas pseudo-parasitadas, ou seja, parasitadas por fêmeas estéreis de *C. flavipes*, não induziram alterações equivalentes àquelas observadas em lagartas em que o parasitoide se desenvolveu por completo. Essas observações sugerem que fatores outros derivados de teratócitos, da larva e suas próprias secreções e/ou da interação de estímulos

provenientes de diferentes fontes do parasitoide também exercem efeito na microbiota intestinal hospedeira.

Por outro lado, a observação de alterações induzidas exclusivamente pelas secreções maternas na microbiota intestinal do hospedeiro, apontam para a participação do vírus simbiote (Polidnavirus) e do veneno associados a *C. flavipes*, visto que ambos pertencem ao arsenal de moléculas químicas de parasitoides voltadas a regulação de inúmeros processos fisiológicos do hospedeiro, como, por exemplo, o metabolismo e a resposta imunológica (GLATZ; ASGARI; SCHMIDT, 2004; ASGARI; RIVERS, 2011), os quais estão diretamente associados à relação hospedeiro-microbita intestinal.

A disbiose observada na microbiota intestinal dos hospedeiros de *C. flavipes* estudados pode ter sido decorrente da ação direta e/ou indireta de alterações induzidas pelo parasitoide em processos fisiológicos do hospedeiro, como a imunossupressão hospedeira, principalmente pela inibição de fatores de transcrição NF- κ B das vias de sinalização Toll e IMD (BAE; KIM, 2009; BITRA; SUDERMAN; STRAND, 2012). A interrupção destas vias devido às alterações nos fatores NF- κ B, além de incapacitarem o sistema imunológico do hospedeiro infectado a desencadear a resposta de encapsulamento da prole do parasitoide, resulta também na redução da expressão de peptídeos com atividade antimicrobiana pelo hospedeiro (SHRESTHA; KIM; KIM, 2009), que poderiam influenciar o reconhecimento e a resposta do hospedeiro a simbioses intestinais (CHARROUX; ROYET, 2012). No entanto, ao aproximar-se do final do processo de parasitismo, alguns hospedeiros conseguem recuperar parte de sua capacidade imunológica, assim como demonstrado para *C. congregata* e *C. flavipes* (LAVINE; BECKAGE, 1996, MAHMOUD; DE LUNA-SANTILLANA; RODRÍGUEZ-PEREZ, 2011). Este padrão de alteração da resposta imunológica do hospedeiro parasitado ao final do período de desenvolvimento do parasitoide coincide com a menor diferença na microbiota intestinal de hospedeiros parasitados e não-parasitados ao final do desenvolvimento larval do parasitoide, assim como observado no nono dia em relação aos demais períodos avaliados.

Aspectos nutricionais também são de extrema importância na modulação da estrutura da microbiota intestinal e são alvo de processos de regulação do hospedeiro por parasitoides. O desenvolvimento adequado do parasitoide depende da eficiência da obtenção de alimento a partir de seu hospedeiro e a manipulação de aspectos relacionados à nutrição hospedeira são observados em diversos estudos (HARVEY; HARVEY; THOMPSON, 1995; CÔNSOLI; VINSON, 2004; PENNACCHIO; CACCIA; DIGILIO, 2014). Em *D. saccharalis*, foi constatado que o parasitoide *C. flavipes* induz a redução da ingestão de alimentos, o aumento

no tempo de retenção do alimento no intestino e alterações na atividade de enzimas como α -amilase, trealase e tripsina que, conseqüentemente, alteram a disponibilidade de nutrientes no intestino (ROSSI; SALVADOR; CÔNSOLI, 2014). Estas alterações também podem contribuir para as modificações ocorridas na microbiota intestinal hospedeira, pois a mesma é descrita como sendo moldada pela disponibilidade de nutrientes como substrato alimentar e a presença de enzimas digestivas (DILLON; DILLON, 2004; ENGEL; MORAN, 2013, YUN et al., 2014). Outros fatores ainda não observados em insetos, porém relatados como reguladores da microbiota intestinal em humanos, como, por exemplo, a exposição a fontes de estresse (BAILEY et al., 2011), são fatores que levam à modificação da estrutura da microbiota intestinal. Parasitoides induzem alterações significativas no balanço hormonal do hospedeiro (PFISTER-WILHELM; LANZREIN, 1996; LEE; KIM, 2004) e, sem dúvida, são causadores de estresse fisiológico. Todos estes fatores em conjunto podem explicar as alterações observadas na estrutura da microbiota intestinal dos hospedeiros analisados.

A disbiose causada na microbiota intestinal de hospedeiros parasitados por *C. flavipes* alterou o potencial de contribuição funcional da mesma, incluindo processos já reconhecidos como sendo papel da microbiota intestinal, como a defesa contra patógenos (AZAMBUJA; FEDER; GARCIA, 2003, AZAMBUJA; GARCIA; RATCLIFFE, 2005; CIRIMOTICH et al., 2011; BAHIA et al., 2014), a metabolização de compostos secundários de defesa da planta hospedeira (ADAMS et al., 2013), a produção de enzimas auxiliares no processo de digestão do alimento pelo hospedeiro (ANAND et al., 2010; KRISHNAN et al., 2014), e a produção e liberação de nutrientes (DOUGLAS, 2006; NIKOH et al., 2011), já que alterações da microbiota intestinal de organismos, incluindo insetos, levam a mudanças drásticas no metabolismo do organismo hospedeiro (SCHILDER; MARDEN, 2007; SOMMER; BÄCKHELD, 2013). Várias das modificações observadas, incluindo a potencial de regulação do metabolismo do hospedeiro, podem exercer papel benéfico direto e/ou indireto sobre o desenvolvimento do parasitoide. O aumento do potencial de biodegradação de xenobióticos, seja pela produção de enzimas voltadas à degradação de compostos anti-herbivoria, como limoneno, pineno e geraniol (HALLAHAN; WEST, 1995; THOSS; BYERS, 2006; IBRAHIM; KAINULAINEN; AFLATUNI, 2008) ou pelo maior potencial de produção de enzimas do citocromo P450, voltadas à degradação de uma grande diversidade de substratos (FEYEREISEN, 1999; ANZENBACHER; ANZENBACHEROVA, 2001), assim como o maior potencial de contribuição para a biossíntese de antibióticos pela ativação de várias vias de policetídios sintases (BANGERA; THOMASHOW, 1999), auxiliariam a produção de um

ambiente mais adequado ao desenvolvimento do inimigo natural, sem acréscimo da demanda de energia pelo inseto hospedeiro, favorecendo, assim, o desenvolvimento do parasitoide.

A microbiota intestinal identificada em associação a lagartas de *D. saccharalis* e *S. frugiperda* apresentou composição ao nível de Filo semelhante àquela de centenas de espécies de insetos pertencentes a 21 ordens taxonômicas, sendo Proteobacteria e Firmicutes os representantes dominantes na microbiota intestinal de insetos (Yun et al., 2014). As diferenças encontradas entre a microbiota intestinal de *D. saccharalis*, predominantemente representada por Proteobacteria, e a de *S. frugiperda*, predominantemente representada por Firmicutes, pode ser decorrente das diferenças relacionadas à filogenia, ao hábito alimentar e à diversidade de alimento utilizada por esses insetos, visto que esses fatores foram identificados entre os principais a influenciarem a composição da microbiota intestinal de insetos (Yun et al., 2014). Essa diferença na prevalência de Proteobacteria e Firmicutes na microbiota intestinal de *S. frugiperda* parece ocorrer naturalmente entre os diferentes representantes de Lepidoptera. Proteobacteria foi o grupo predominante na maioria dos representantes analisados de Lepidoptera, enquanto Firmicutes prevaleceram em cerca de 1/3 das espécies estudadas por Yun et al. (2014).

Pouco se conhece sobre o papel bactérias específicas da microbiota intestinal de insetos, principalmente aquela associadas a Lepidoptera, sendo difícil qualquer analogia a alterações específicas em determinados grupos de microrganismos. No caso de Lepidoptera, *Enterococcus* é uma exceção. *Enterococcus* é um gênero anaeróbio facultativo e dominante na microbiota intestinal de *S. frugiperda*, com mais da metade das sequências identificadas ao longo de todo o período avaliado. Em estudo anterior, pesquisadores demonstraram que *Enterococcus* também domina a microbiota intestinal de *S. littoralis*, inseto com o qual apresenta contribuição metabólica fundamental (SHAO et al., 2014). Esse simbionte foi responsável pela produção de peptídeos com atividade antimicrobiana e foi localizado aderido intimamente à camada mucosa do epitélio intestinal, semelhantemente a estrutura de um biofilme, fornecendo assim proteção adicional contra patógenos (SHAO et al., 2014). Curiosamente, *Enterococcus* foi significativamente favorecido pelo parasitismo de larvas de *S. frugiperda* por *C. flavipes* em todos os períodos avaliados na porção anterior do intestino, região de maior abundância do grupo.

6 CONCLUSÕES

- Proteobacteria predomina na microbiota intestinal de *D. saccharalis*, enquanto Firmicutes é o grupo predominante em *S. frugiperda*.
- A microbiota intestinal difere nas duas porções intestinais observadas, antero-mediana e posterior, tanto em *D. saccharalis*, hospedeiro permissivo, quanto em *S. frugiperda*, hospedeiro não-permissivo.
- O parasitismo por *C. flavipes* altera a diversidade e abundância da microbiota intestinal de *D. saccharalis*, hospedeiro permissivo, e de *S. frugiperda*, hospedeiro não-permissivo.
- As alterações na estrutura da microbiota intestinal de lagartas de *D. saccharalis* e *S. frugiperda* induzidas pelo parasitismo afetaram seu potencial de contribuição nutricional, enzimático, de defesa e de biodegradação ao hospedeiro.
- As secreções maternas de *Cotesia flavipes* induzem alterações na diversidade e abundância e no potencial de contribuição funcional da microbiota intestinal de *D. saccharalis*, hospedeiro permissivo, e de *S. frugiperda*, hospedeiro não-permissivo.

REFERÊNCIAS

- ABRAMS, P.A. The evolution of predator-prey interactions: theory and evidence. **Annual Review of Ecology and Systematics**, Palo Alto, v. 31, p. 79-105, 2000.
- ADAMO, S. How parasites alter the behavior of their insect hosts. In: BECKAGE, N. (Ed.). **Parasites and pathogens**. New York: Springer US, 1997. chap. 12, p. 231-245.
- ADAMS, A.S.; AYLWARD, F.O.; ADAMS, S.M.; ERBILGIN, N.; AUKEMA, B.H.; CURRIE, C.R.; SUEN, G.; RAFFA, K.F. Mountain pine beetles colonizing historical and naïve host trees are associated with a bacterial community highly enriched in genes contributing to terpene metabolism. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 79, n. 11, p. 3468-3475, 2013.
- ALI, M.R.; LIM, J.; KIM, Y. Transcriptome of a specialized extra-embryonic cell, teratocyte, and its host immunosuppressive role revealed by ex vivo RNA interference. **Insect molecular Biology**, Oxford, v. 24, n. 1, p. 13-28, 2015.
- ALI, M.R.; SEO, J.; LEE, D.; KIM, Y. Teratocyte-secreting proteins of an endoparasitoid wasp, *Cotesia plutellae*, prevent host metamorphosis by altering endocrine signals. **Comparative Biochemistry and Physiology. Part A, Molecular & Integrative Physiology**, New York, v. 166, n. 2, p. 251-262, 2013.
- ANAND, A.A.P.; VENNISON, S.J.; SANKAR, S.G.; PRABHU, D.I.G.; VASAN, P.T.; RAGHURAMAN, T.; GEOFFREY, C.J.; VENDAN, S.E. Isolation and characterization of bacteria from the gut of *Bombyx mori* that degrade cellulose, xylan, pectin and starch and their impact on digestion. **Journal of Insect Science**, Tucson, v. 10, p. 1-20, 2010.
- ANZENBACHER, P.; ANZENBACHEROVA, E. Cytochromes P450 and metabolism of xenobiotics. **Cellular and Molecular Life Sciences**, Basel, v. 58, n. 5/6, p. 737-747, 2001.
- ASGARI, S.; RIVERS, D.B. Venom proteins from endoparasitoid wasps and their role in host-parasite interactions. **Annual Review of Entomology**, Palo Alto, v. 56, p. 313-335, 2011.
- AZAMBUJA, P.; FEDER, D.; GARCIA, E.S. Isolation of *Serratia marcescens* in the midgut of *Rhodnius prolixus*: impact on the establishment of the parasite *Trypanosoma cruzi* in the vector. **Experimental parasitology**, New York, v. 107, n. 1/2, p. 89-96, 2003.
- AZAMBUJA, P.; GARCIA, E.S.; RATCLIFFE, N.A. Gut microbiota and parasite transmission by insect vectors. **Trends in Parasitology**, Oxford, v. 21, p. 568-572, 2005.
- BAE, S.; KIM, Y. I κ B genes encoded in *Cotesia plutellae* bracovirus suppress an antiviral response and enhance baculovirus pathogenicity against the diamondback moth, *Plutella xylostella*. **Journal of Invertebrate Pathology**, New York, v. 102, n. 1, p. 79-87, 2009.
- BAHIA, A.C.; DONG, Y.; BLUMBERG, B.J.; MLAMBO, G.; TRIPATHI, A.; BENMARZOUK-HIDALGO, O.J.; CHANDRA, R.; DIMOPOULOS, G. Exploring Anopheles gut bacteria for Plasmodium blocking activity. **Environmental Microbiology**, Washington, v. 16, n. 9, p. 2980-2994, 2014.

- BAILEY, M.T.; DOWD, S.E.; GALLEY, J.D.; HUFNAGLE, A.R.; ALLEN, R.G.; LYTE, M. Exposure to a social stressor alters the structure of the intestinal microbiota: implications for stressor-induced immunomodulation. **Brain, Behavior, and Immunity**, San Diego, v. 25, n. 3, p. 397-407, 2011.
- BALMAND, S.; LOHS, C.; AKSOY, S.; HEDDI, A. Tissue distribution and transmission routes for the tsetse fly endosymbionts. **Journal of Invertebrate Pathology**, New York, v. 112, suppl. 1, p. S116-S122, 3. 2013.
- BANGERA, M.G.; THOMASHOW, L.S. Identification and characterization of a gene cluster for synthesis of the polyketide antibiotic 2, 4-diacetylphloroglucinol from *Pseudomonas fluorescens* Q2-87. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 181, n. 10, p. 3155-3163, 1999.
- BATTAGLIA, D.; COLELLA, T.; LAURINO, S.; GROSSI, G.; SALVIA, R.; RIVIELLO, L.; GRIMALDI, A.; CONGIU, T.; DE EGUILEOR, M.; FALABELLA, P. .The effect of *Leptomastix dactylopii* parasitism and venom injection on host *Planococcus citri*. **Invertebrate Survival Journal**, Modena, v. 11, p. 273-285, 2014.
- BECKAGE, N.E.; GELMAN, D.B. Wasp parasitoid disruption of host development: Implications for new biologically based strategies for insect control. **Annual Review of Entomology**, Palo Alto, v. 49, p. 299-330, 2004.
- BECKAGE, N.E.; THOMPSON, S.N.; FEDERICI, B.A. **Parasites and pathogens of insects: parasites**. Waltham: Academic Press, 1993. 294 p.
- BITRA, K.; SUDERMAN, R.J.; STRAND, M.R. Polydnavirus Ank proteins bind NF- κ B homodimers and inhibit processing of *relish*. **PLoS Pathogens**, San Francisco, v. 8, n. 5, p. e1002722, 2012.
- BOURTZIS, K.; MILLER T. **Insect symbiosis**. Boca Raton: CRC Press, 2003. 368 p.
- BRAGG, L.; TYSON, G.W. Metagenomics using next-generation sequencing. In: IAN, L.; PEPPER, C.P.; GERBA, T.J.G. (Ed.). **Environmental microbiology**. Washington: Humana Press, 2014. p. 183-201.
- BREZNAK, J.A.; BRUNE, A. Role of microorganisms in the digestion of lignocellulose by termites. **Annual Review of Entomology**, Palo Alto, v. 39, n. 1, p. 453-487, 1994.
- BRODERICK, N.A.; LEMAITRE, B. Gut-associated microbes of *Drosophila melanogaster*. **Gut microbes**, Philadelphia, v. 3, n. 4, p. 307-321, 2012.
- BRODEUR, J.; BOIVIN, G. Functional ecology of immature parasitoids. **Annual Review of Entomology**, Palo Alto, v. 49, p. 27-49, 2004.
- BRUCKER, R.M.; BORDENSTEIN, S.R. The hologenomic basis of speciation: gut bacteria cause hybrid lethality in the genus *Nasonia*. **Science**, Washington, v. 341, n. 6146, p. 667-669, 2013.
- BURKE, G.R.; STRAND, M.R. Systematic analysis of a wasp parasitism arsenal. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 23, n. 4, p. 890-901, 2014.

CAPORASO, J.G.; BITTINGER, K.; BUSHMAN, F.D.; DESANTIS, T.Z.; ANDERSEN, G.L.; KNIGHT, R. PyNAST: a flexible tool for aligning sequences to a template alignment. **Bioinformatics**, Oxford, v. 26, n. 2, p. 266-267, 2010a.

CAPORASO, J.G.; KUCZYNSKI, J.; STOMBAUGH, J.; BITTINGER, K.; BUSHMAN, F.D.; COSTELLO, E.K.; FIERER, N.; PEÑA, A.G.; GOODRICH, J.K.; GORDON, J.I.; HUTTLEY, G.A.; KELLEY, S.T.; KNIGHTS, D.; KOENIG, J.E.; LEY, R.E.; LOZUPONE, C.A.; MCDONALD, D.; MUEGGE, B.D.; PIRRUNG, M.; REEDER, J.; SEVINSKY, J.R.; TURNBAUGH, P.J.; WALTERS, W.A.; WIDMANN, J.; YATSUNENKO, T.; ZANEVELD, J.; KNIGHT, R. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. **Nature Methods**, New York, v. 7, n. 5, p. 335-336, 2010b.

CHAPELLE, M.; GIRARD, P.A.; COUSSERANS, F.; VOLKOFF, N.A.; DUVIC, B. Lysozymes and lysozyme-like proteins from the fall armyworm, *Spodoptera frugiperda*. **Molecular Immunology**, Oxford, v. 47, n. 2/3, p. 261-269, 2009.

CHAPMAN, R.F. **The insects: structure and function**. Cambridge: Cambridge University Press, 1998. 959 p.

CHARROUX, B.; ROYET, J. Gut-microbiota interactions in non-mammals: what can we learn from *Drosophila*? **Seminars in Immunology**, Philadelphia, v. 24, n. 1, p. 17-24, 2012.

CHU, H.; MAZMANIAN, S.K. Innate immune recognition of the microbiota promotes host-microbial symbiosis. **Nature Immunology**, New York, v. 14, n. 7, p. 668-75, 2013.

CIRIMOTICH, C.M.; DONG, Y.; CLAYTON, A.M.; SANDIFORD, S.L.; SOUZA-NETO, J.A.; MULENGA, M.; DIMOPOULOS, G. Natural microbe-mediated refractoriness to *Plasmodium* infection in *Anopheles gambiae*. **Science**, Washington, v. 332, n. 6031, p. 855-858, 2011.

CLEMENTE, J.C.; URSELL, L.K.; PARFREY, L.W.; KNIGHT, R. The impact of the gut microbiota on human health: an integrative view. **Cell**, Cambridge, v. 148, n. 6, p. 1258-1270, 2012.

COLINET, D.; MATHÉ-HUBERT, H.; ALLEMAND, R.; GATTI, J.L.; POIRIÉ, M. Variability of venom components in immune suppressive parasitoid wasps: from a phylogenetic to a population approach. **Journal of Insect Physiology**, Oxford, v. 59, n. 2, p. 205-212, 2013.

COLINET, D.; DUBUFFET, A.; CAZES, D.; MOREAU, S.; DREZEN, J.M.; POIRIE, M. A serpin from the parasitoid wasp *Leptopilina boulardi* targets the *Drosophila* phenoloxidase cascade. **Developmental & Comparative Immunology**, Elmsford, v. 33, n. 5, p. 681-689, 2009.

CÔNSOLI, F.L.; VINSON, S.B. Wing morph development and reproduction of the ectoparasitoid *Melittobia digitata*: nutritional and hormonal effects. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, Amsterdam, v. 112, n. 1, p. 47-55, 2004.

_____. Parasitóides (Hymenoptera). In: PANIZZI, A.R.; PARRA, J.R.P. (Org.). **Bioecologia e nutrição de insetos: base para o manejo integrado de pragas**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2009. p. 837-873.

DAHLMAN, D.L. Evaluation of teratocyte functions: an overview. **Archives of Insect Biochemistry and Physiology**, New York, v. 13, n. 3/4, p. 159-166, 1990.

_____. Teratocytes and host/parasitoid interactions. **Biological Control**, Orlando, v. 1, n. 2, p. 118-126, 1991.

DAHLMAN, D.L.; VINSON, S.B. Trehalose and glucose levels in the hemolymph of *Heliothis virescens* parasitized by *Microplitis croceipes* or *Cardiochiles nigriceps*. **Comparative Biochemistry and Physiology. Part B, Biochemistry & Molecular Biology**, Oxford, v. 52, n. 4, p. 465-8, 1975.

DE BARY, A. **The phenomenon of symbiosis**. Strasbourg: Karl J. Trubner, 1879. 364 p.

DEDEINE, F.; VAVRE, F.; FLEURY, F.; LOPPIN, B.; HOCHBERG, M. E.; BOULÉTREAU, M. Removing symbiotic Wolbachia bacteria specifically inhibits oogenesis in a parasitic wasp. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, Washington, v. 98, n. 11, p. 6247-6252, 2001.

DESANTIS, T.Z.; HUGENHOLTZ, P.; LARSEN, N.; ROJAS, M; BRODIE, E.L.; KELLER, K.; HUBER, T.; DALEVI D.; HU, P.; ANDERSEN, G.L. Greengenes, a chimera-checked 16S rRNA gene database and workbench compatible with ARB. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 72, n. 7, p. 5069-5072, 2006.

DIGILIO, M. C.; ISIDORO, N.; TREMBLAY, E.; PENNACCHIO, F. Host castration by *Aphidius ervi* venom proteins. **Journal of Insect Physiology**, Oxford, v. 46, n. 6, p. 1041, 2000.

DILLON, R.J.; DILLON, V.M. The gut bacteria of insects: nonpathogenic interactions. **Annual Review of Entomology**, Palo Alto, v. 49, n. 1, p. 71-92, 2004.

DILLON, R.J.; VENNARD, C.T.; CHARNLEY, A.K. A note: gut bacteria produce components of a locust cohesion pheromone. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 92, n. 4, p.759-763, 2002.

DORÉMUS, T.; URBACH, S.; JOUAN, V.; COUSSERANS, F.; RAVALLEC, M.; DEMETTRE, E.; WAJNBERGD, E.; POULAINC, J.; AZÉMA-DOSSATC, C.; DARBOUXA, I.; ESCOUBASA, J.-M.; COLINET, D.; GATTID, J.-L.; POIRIÉD, M.; VOLKOFF, A.N. Venom gland extract is not required for successful parasitism in the polydnavirus-associated endoparasitoid *Hyposoter didymator* (Hym. Ichneumonidae) despite the presence of numerous novel and conserved venom proteins. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, Amsterdam, v. 43, n. 3, p. 292-307, 2013.

DOUGLAS, A.E. Nutritional interactions in insect-microbial symbioses: aphids and their symbiotic bacteria *Buchnera*. **Annual Review of Entomology**, Palo Alto, v. 43, n. 1, p. 17-37, 1998.

_____. Phloem-sap feeding by animals: problems and solutions. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 57, n.4, p. 747-754, 2006.

_____. The microbial dimension in insect nutritional ecology. **Functional Ecology**, Oxford, v. 23, n. 1, p. 38-47, 2009.

_____. Multiorganismal insects: diversity and function of resident microorganisms. **Annual Review of Entomology**, Palo Alto, v. 60, p. 17-34, 2015.

EICHLER, S.; SCHAUB, G.A. Development of symbionts in triatomine bugs and the effects of infections with trypanosomatids. **Experimental Parasitology**, New York, v. 100, n. 1, p. 17-27, 2002.

ENGEL, P.; MORAN, N.A. The gut microbiota of insects—diversity in structure and function. **FEMS Microbiology Reviews**, Oxford, v. 37, n. 5, p. 699-735, 2013.

FALABELLA, P.; RIVIELLO, L.; CACCIALUPI, P.; ROSSODIVITA, T.; VALENTEA, M.T.; STRADISA, M.L.; TRANFAGLIAA, A.; VARRICCHIOB, P.; GIGLIOTTIB, S.; GRAZIANIB, F.; MALVA, C.; PENNACCHIO, F. A gamma-glutamyl transpeptidase of *Aphidius ervi* venom induces apoptosis in the ovaries of host aphids. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, Amsterdam, v. 37 n. 5, p. 453, 2007.

FANG, Q.; WANG, L.; ZHU, J.; LI, Y.; SONG, Q.; STANLEY, D. W.; AKHTAR Z.; YE, G. Expression of immune-response genes in lepidopteran host is suppressed by venom from an endoparasitoid, *Pteromalus puparum*. **BMC Genomics**, London, v. 11, p. 484, 2010.

FELDHAAR, H.; GROSS, R. Immune reactions of insects on bacterial pathogens and mutualists. **Microbes and Infection**, Paris, v. 10, n. 9, p. 1082-1088, 2008.

_____. Insects as hosts for mutualistic bacteria. **International Journal of Medical Microbiology**, Jena, v. 299, n. 1, p. 1-8, 2009.

FERRANDON, D.; IMLER, J.L.; HETRU, C.; HOFFMANN, J.A. The Drosophila systemic immune response: sensing and signalling during bacterial and fungal infections. **Nature Review of Immunology**, London, v. 7, n. 11, p. 862-874, 2007.

FEYEREISEN, R. Insect P450 enzymes. **Annual Review of Entomology**, Palo Alto, v. 44, n. 1, p. 507-533, 1999.

FIRLEJ, A.; LUCAS, E.; CODERRE, D.; BOIVIN, G. Teratocytes growth pattern reflects host suitability in a host–parasitoid assemblage. **Physiological Entomology**, Oxford, v. 32, n. 2, p. 181-187, 2007.

FRENCH, J R.J.; TURNER, G.L.; BRADBURY, J.F. Nitrogen fixation by bacteria from the hindgut of termites. **Journal of General Microbiology**, London, v. 95, n. 2, p. 202-206, 1976.

GELMAN, D.B.; GERLING, D.; BLACKBURN, M.B.; HU, J.S. Host-parasite interactions between whiteflies and their parasitoids. **Archives of Insect Biochemistry and Physiology**, New York, v. 60, n. 4, p. 209-222, 2005.

GILBERT, S.F.; SAPP, J.; TAUBER, A.I. A symbiotic view of life: we have never been individuals. **The Quarterly Review of Biology**, Chicago, v. 87, n. 4, p. 325-341, 2012.

GLATZ, R.V.; ASGARI, S.; SCHMIDT, O. Evolution of polydnviruses as insect immune suppressors. **Trends in microbiology**, Cambridge, v. 12, n. 12, p. 545-554, 2004.

GODFRAY, H.C.J. Parasitoids. In: SIMON, A.L. (Ed.). **Encyclopedia of biodiversity**. 2nd ed. Waltham: Academic Press, 2001. p. 674-682.

GREENE, G.L.; LEPLA, N.C.; DICKERSON, W.A. Velvetbean caterpillar: a rearing procedure and artificial medium. **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v. 69, n. 4, p. 487-488, 1976.

GROSS, R.; VAVRE, F.; HEDDI, A.; HURST, G.D.; ZCHORI-FEIN, E.; BOURTZIS, K. Immunity and symbiosis. **Molecular Microbiology**, Berlin, v. 73, n. 5, p. 751-759, 2009.

GUERRERO, R.; MARGULIS, L.; BERLANGA, M. Symbiogenesis: the holobiont as a unit of evolution. **International Microbiology**, Barcelona, v. 16, n. 3, p. 133-143, 2013.

GUILLOT, F.S.; VINSON, S.B. Effect of parasitism by *Cardiochiles nigriceps* on food consumption and utilization by *Heliothis virescens*. **Journal of Insect Physiology**, Oxford, v. 19, n. 10, p. 2073-2082, 1973.

HALLAHAN, D.L.; WEST, J.M. Cytochrome P-450 in plant/insect interactions: geraniol 10-hydroxylase and the biosynthesis of iridoid monoterpenoids. **Drug metabolism and drug interactions**, London, v. 12, n. 3/4, p. 369-382, 1995.

HAMMER, T.J.; MCMILLAN, W.O.; FIERER, N. Metamorphosis of a butterfly-associated bacterial community. **PloS One**, San Francisco, v. 9, n. 1, p. e86995, 2014.

HAO, Z.; KASUMBA, I.; LEHANE, M.J.; GIBSON, W.C.; KWON, J.; AKSOY, S. Tsetse immune responses and trypanosome transmission: implications for the development of tsetse-based strategies to reduce trypanosomiasis. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, Washington, v. 98, n. 22, p. 12648-12653, 2001.

HARVEY, J.A.; HARVEY, I.F.; THOMPSON, D.J. The effect of host nutrition on growth and development of the parasitoid wasp *Venturia canescens*. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, Amsterdam v. 75, n. 3, p. 213-220, 1995.

HASELKORN, T.S. The *Spiroplasma* heritable bacterial endosymbiont of *Drosophila*. **Fly**, Austin, v. 4, n. 1, p. 80-87, Jan. 2010.

HOCHULI, A.; PFISTER-WILHELM, R.; LANZREIN, B. Analysis of endoparasitoid-released proteins and their effects on host development in the system *Chelonus inanitus* (Braconidae)-*Spodoptera littoralis* (Noctuidae). **Journal of Insect Physiology**, Oxford, v. 45, n. 9, p. 823-833, 1999.

HONGO, Y.; SHARMA, V.K.; PRAKASH, T.; NODA, S.; TOH, H.; TAYLOR, T.D.; KUDO, T.; SAKAKI, Y.; TOYODA, A.; HATTORI, M.; OHKUMA, M. Genome of an endosymbiont coupling N₂ fixation to cellulolysis within protist cells in termite gut. **Science**, New York, v. 322, n. 5904, p. 1108-1109, 2008.

IBRAHIM, M.A.; KAINULAINEN, P.; AFLATUNI, A. Insecticidal, repellent, antimicrobial activity and phytotoxicity of essential oils: with special reference to limonene and its suitability for control of insect pests. **Agricultural and Food Science**, Helsinki, v. 10, n. 3, p. 243-259, 2008.

ISHAK, H.D.; PLOWES, R.; SEN, R.; KELLNER, K.; MEYER, E.; ESTRADA, D.A.; DOWD, S.E.; MUELLER, U.G. Bacterial diversity in *Solenopsis invicta* and *Solenopsis geminata* ant colonies characterized by 16S amplicon 454 pyrosequencing. **Microbiology Ecology**, Amsterdam, v. 61, n. 4, p. 821-831, 2011.

JAKUBOWSKA, A.K.; VOGEL, H.; HERRERO, S. Increase in gut microbiota after immune suppression in baculovirus-infected larvae. **PLoS Pathogens**, San Francisco, v. 9, n. 5, p. e1003379, 2013.

KAESLIN, M.; PFISTER-WILHELM, R.; LANZREIN, B. Influence of the parasitoid *Chelonus inanitus* and its polydnavirus on host nutritional physiology and implications for parasitoid development. **Journal of Insect Physiology**, Oxford, v. 51, n. 12, p. 1330-1339, 2005.

KAHN, M.A.A.; VINSON, S.B.; MITLIN, N. Effect of the parasitoid, *Cardiochiles nigriceps*, on the nitrogen excretion of its host, *Heliothis virescens*. **Journal of Insect Physiology**, Oxford, v. 22, p. 51-56, 1976.

KANEHISA, M.; GOTO, S.; SATO, Y.; KAWASHIMA, M.; FURUMICHI, M.; TANABE, M. Data, information, knowledge and principle: back to metabolism in KEGG. **Nucleic Acids Research**, London, v. 42, n. D1, p. D199-D205, 2014.

KIKUCHI, Y.; HAYATSU, M.; HOSOKAWA, T.; NAGAYAMA, A.; TAGO, K.; FUKATSU, T. Symbiont-mediated insecticide resistance. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, Washington, v. 109, n. 22, p. 8618-8622, 2012.

KREMER, N.; VORONIN, D.; CHARIF, D.; MAVINGUI, P.; MOLLEREAU, B.; VAVRE, F. *Wolbachia* interferes with ferritin expression and iron metabolism in insects. **PLoS pathogens**, San Francisco, v. 5, n. 10, p. e1000630, 2009.

KRISHNAN, M.; BHARATHIRAJA, C.; PANDIARAJAN, J.; PRASANNA, V. A.; RAJENDHRAN, J.; GUNASEKARAN, P. Insect gut microbiome—An unexploited reserve for biotechnological application. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, Singapore, v. 4, suppl 1, S16, 2014

KROEMER, J.A.; WEBB, B.A. Polydnavirus genes and genomes: emerging gene families and new insights into polydnavirus replication. **Annual Review of Entomology**, Palo Alto, v. 49, n. 1, p. 431-456, 2003.

KOUNATIDIS, I.; LIGOXYGAKIS, P. *Drosophila* as a model system to unravel the layers of innate immunity to infection. **Open Biology**, London, v. 2, n. 5, p. 120075, 2012.

LANGILLE, M.G.; ZANEVELD, J.; CAPORASO, J.G.; MCDONALD, D.; KNIGHTS, D., REYES, J.A.; CLEMENTE, J.C.; BURKEPILE, D.E.; THURBER, R.L.V.; KNIGHT, R.; BEIKO, R.G.; HUTTENHOWER, C. Predictive functional profiling of microbial communities using 16S rRNA marker gene sequences. **Nature Biotechnology**, New York, v. 31, n. 9, p. 814-821, 2013.

LAVINE, M.D.; BECKAGE, N.E. Temporal pattern of parasitism-induced immunosuppression in *Manduca sexta* larvae parasitized by *Cotesia congregata*. **Journal of Insect Physiology**, Oxford, v. 42, n. 1, p. 41-51, 1996.

LEE, S.; KIM, Y. Juvenile hormone esterase of diamondback moth, *Plutella xylostella*, and parasitism of *Cotesia plutellae*. **Journal of Asia-Pacific Entomology**, Suwon, v. 7, n. 3, p. 283-287, 2004.

LEE, K.A.; KIM, S.H.; KIM, E.K.; HA, E.M.; YOU, H.; KIM, B.; KWON Y.; RYU J.H.; LEE W.J. Bacterial-derived uracil as a modulator of mucosal immunity and gut-microbe homeostasis in *Drosophila*. **Cell**, Cambridge, v. 153, n. 4, p. 797-811, 2013.

LEROY, P.D.; SABRI, A.; HEUSKIN, S.; THONART, P.; LOGNAY, G.; VERHEGGEN, F.J.; FRANCIS, F.; BROSTAU, Y.; FELTON, G.W.; HAUBRUGE, E. Microorganisms from aphid honeydew attract and enhance the efficacy of natural enemies. **Nature communications**, London, v. 2, p. 348, 2011.

LIBERSAT, F.; DELAGO, A.; GAL, R. Manipulation of host behavior by parasitic insects and insect parasites. **Annual Review Entomology**, Palo Alto, v. 54, p. 189-207. 2009.

LOPES, C.S. **Regulação do desenvolvimento e resposta imune de lagartas de *Diatraea saccharalis* (Fabricius) (Lepidoptera: Crambidae) por *Cotesia flavipes* (Cameron) (Hymenoptera: Braconidae)**. 2008. 72 p. Tese (Doutorado em Entomologia) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2008.

MAHMOUD, A.M.A.; DE LUNA-SANTILLANA, E.J.; RODRÍGUEZ-PÉREZ, M.A. Parasitism by the endoparasitoid, *Cotesia flavipes* induces cellular immunosuppression and enhances susceptibility of the sugar cane borer, *Diatraea saccharalis* to *Bacillus thuringiensis*. **Journal of Insect Science**, Tucson, v. 11, n. 119, p. 1-15, 2011.

MAHMOUD, A.M.A.; DE LUNA-SANTILLANA, E.J.; GUO, X.; REYES-VILLANUEVA, F.; RODRÍGUEZ-PÉREZ, M.A. Development of the braconid wasp *Cotesia flavipes* in two Crambids, *Diatraea saccharalis* and *Eoreuma loftini*: evidence of host developmental disruption. **Journal of Asia-Pacific Entomology**, Suwon, v. 15, n. 1, p. 63-68, 2012.

MARGULIS, L. **Symbiosis in cell evolution**. 2nd ed. New York: W.H. Freeman, 1993. 419 p.

MCFALL-NGAI, M.J. The importance of microbes in animal development: lessons from the squid-vibrio symbiosis. **Annual Review of Microbiology**, Palo Alto, v. 68, p. 177-194, 2014.

- MEISTER, S.; AGIANIAN, B.; TURLURE, F.; RELÓGIO, A.; MORLAIS, I.; KAFATOS, F.C.; CHRISTOPHIDES, G.K. *Anopheles gambiae* PGRPLC-mediated defense against bacteria modulates infections with malaria parasites. **PLoS Pathogens**, San Francisco, v. 5, n. 8, p. e1000542, 2009.
- MILLS, N. Parasitoids. In: VINCENT, H.R.; RING, T.C. (Ed.). **Encyclopedia of insects**. 2nd ed. San Diego: Academic Press, 2009. chap. 190, p. 748-751.
- MINDELL, D.P. Phylogenetic consequences of symbioses: Eukarya and Eubacteria are not monophyletic taxa. **Biosystems**, Amsterdam, v. 27, n. 1, p. 53-62, 1992.
- MORAN, NA. "Symbiosis (A primer)" **Current Biology**, Cambridge, v.16, p. R866, 2006.
- MORAN, N.A.; TELANG, A. Bacteriocyte-associated symbionts of insects. **BioScience**, Oxford, v. 48, n. 4, p. 295-304, 1998.
- MOYA, A.; PERETÓ, J.; GIL, R.; LATORRE, A. Learning how to live together: genomic insights into prokaryote-animal symbioses. **Nature Reviews Genetics**, London, v. 9, n. 3, p. 218-229, 2008.
- NAKAMATSU, Y.; TANAKA, T. The function of a trypsin-like enzyme in the saliva of *Euplectrus separatae* larvae. **Journal of Insect Physiology**, Oxford, v. 50, n. 9, p. 847-854, 2004.
- NALINI, M.; IBRAHIM, A.; HWANG, I.; KIM, Y. Altered actin polymerization of *Plutella xylostella* (L.) in response to ovarian calyx components of an endoparasitoid *Cotesia plutellae* (Kurdjumov). **Physiological Entomology**, Oxford, v. 34, n. 2, p. 110-118, 2009.
- NIKOH, N.; HOSOKAWA, T.; OSHIMA, K.; HATTORI, M.; FUKATSU, T. Reductive evolution of bacterial genome in insect gut environment. **Genome Biology and Evolution**, Oxford, v. 3, n.1 p. 702-714, 2011.
- OHKUMA, M.O.R.I.Y.A.; NODA, S.A.T.O.K.O.; USAMI, R.; HORIKOSHI, K.O.K.I.; KUDO, T.O.S.H.I.A.K.I. Diversity of nitrogen fixation genes in the symbiotic intestinal microflora of the termite *Reticulitermes speratus*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 62, n. 8, p. 2747-2752, 1996.
- OLIVER, K.M.; MORAN, N.A.; HUNTER, M.S. Variation in resistance to parasitism in aphids is due to symbionts not host genotype. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America of the USA**, Washington, v. 102, n. 36, p. 12795-12800, 2005.
- OLIVER, K.M.; DEGNAN, P.H.; BURKE, G.R.; MORAN, N.A. Facultative symbionts in aphids and the horizontal transfer of ecologically important traits. **Annual Review of Entomology**, Palo Alto, v. 55, p. 247-266, 2010.
- PARKS, D.H.; TYSON, G.W.; HUGENHOLTZ, P.; BEIKO, R.G. STAMP: statistical analysis of taxonomic and functional profiles. **Bioinformatics**, Oxford, v. 30, n. 21, p. 3123-3124, 2014.

PARMENTIER, E.; MICHEL, L. Boundary lines in symbiosis forms. **Symbiosis** Philadelphia, v. 60, n. 1, p. 1-5, 2013.

PARRA, J.R.P.; MIHSFELDT, L.H. Comparison of artificial diets for rearing the sugarcane borer. In: ANDERSON, T.E.; LEPPLA, N.C. (Ed.). **Advances in insect rearing for research & pest management**. San Francisco: Westview Press, 1992. p. 195-209.

PARRA, J.R.P. **Técnicas de criação de insetos para programas de controle biológico**. Piracicaba: FEALQ, 1999. 137 p.

PENNACCHIO, F.; STRAND, M.R. Evolution of developmental strategies in parasitic Hymenoptera. **Annual Review of Entomology**, Palo Alto, v. 51, n. 1, p. 233-258, 2005.

PENNACCHIO, F.; CACCIA, S.; DIGILIO, M. C. Host regulation and nutritional exploitation by parasitic wasps. **Current Opinion in Insect Science**, Amsterdam, v. 6, p. 74-79, 2014.

PFISTER-WILHELM, R.; LANZREIN, B. Precocious induction of metamorphosis in *Spodoptera littoralis* (Noctuidae) by the parasitic wasp *Chelonus inanitus* (Braconidae): identification of the parasitoid larva as the key regulatory element and the host corpora allata as the main targets. **Archives of Insect Biochemistry and Physiology**, New York, v. 32, n. 3/4, p. 511-525, 1996.

_____. Stage dependent influences of polydnviruses and the parasitoid larvae on host ecdysteroids. **Journal of Insect Physiology**, Oxford, v. 55, p. 707-715, 2009.

PRUISSERS, A.J.; FALABELLA, P.; EUM, J.H.; PENNACCHIO, F.; BROWN, M.R.; STRAND, M.R. Infection by a symbiotic polydnvirus induces wasting and inhibits metamorphosis of the moth *Pseudoplusia includens*. **Journal of Experimental Biology**, London, v. 212, n. 18, p. 2998-3006, 2009.

RICHARDS, E.H.; EDWARDS, J.P. Larvae of the ectoparasitic wasp, *Eulophus pennicornis*, release factors which adversely affect haemocytes of their host, *Lacanobia oleracea*. **Journal of Insect Physiology**, Oxford, v. 48, n. 9, p. 845-855, 2002a.

_____. Parasitism of *Lacanobia oleracea* (Lepidoptera) by the ectoparasitic wasp, *Eulophus pennicornis*, disrupts the cytoskeleton of host haemocytes and suppresses encapsulation in vivo. **Archives of insect Biochemistry and Physiology**, New York, v. 49, n. 2, p. 108-124, 2002b.

RICHARDS, E.H.; JONES, B.; BOWMAN, A. Salivary secretions from the honeybee mite, *Varroa destructor*: effects on insect haemocytes and preliminary biochemical characterization. **Parasitology**, London, v. 138, n. 5, p. 602-608, 2011.

RODRIGUEZ-PEREZ, M.A.; BECKAGE, N.E. [Co-evolutionary strategies of interaction between parasitoids and polydnviruses]. **Revista Latinoamericana de Microbiología**, México, v. 48, n. 1, p. 31-43, 2006.

ROSSI, G.D.; SALVADOR, G.; CÔNSOLI, F.L. the parasitoid, *Cotesia flavipes* (Cameron) (Hymenoptera: Braconidae), influences food consumption and utilization by larval *Diatraea saccharalis* (f.) (Lepidoptera: Crambidae). **Archives of Insect Biochemistry and Physiology**, New York, v. 87, n.2, p. 85-94, 2014.

RYU, J.H.; KIM, S.H.; LEE, H.Y.; BAI, J.Y.; NAM, Y.D.; BAE, J.W.; DONG, G.L.; SEUNG, C.S.; EUN-MI, H.; LEE, W.J. Innate immune homeostasis by the homeobox gene *caudal* and commensal-gut mutualism in *Drosophila*. **Science**, Washington, v. 319, n. 5864, p. 777-782, 2008.

RYU, J.-H.; HA, E.-M.; LEE, W.J. Innate immunity and gut-microbe mutualism in *Drosophila*. **Developmental & Comparative Immunology**, Elmsford, v. 34, n. 4, p. 369-376, 2010.

SCHILDER, R.J.; MARDEN, J.H. Metabolic syndrome in insects triggered by gut microbes. **Journal of Diabetes Science and Technology**, Foster, v. 1, n. 5, p. 794-796, 2007.

SHAO, Y.; ARIAS-CORDERO, E.; GUO, H.; BARTRAM, S.; BOLAND, W. In vivo Pyro-SIP assessing active gut microbiota of the cotton leafworm, *Spodoptera littoralis*. **PLoS One**, San Francisco, v. 9, n. 1, p. e85948, 2014.

SHARON, G.; SEGAL, D.; ZILBER-ROSENBERG, I.; ROSENBERG, E. Symbiotic bacteria are responsible for diet-induced mating preference in *Drosophila melanogaster*, providing support for the hologenome concept of evolution. **Gut Microbes**, Philadelphia, v. 2, n. 3, p. 190-192, 2001.

SHARON, G.; SEGAL, D.; RINGO, J.M.; HEFETZ, A.; ZILBER-ROSENBERG, I.; ROSENBERG, E. Commensal bacteria play a role in mating preference of *Drosophila melanogaster*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, Washington, v. 107, n. 46, p. 20051-20056, 2010.

SHRESTHA, S.; KIM, H.H.; KIM, Y. An inhibitor of NF- κ B encoded in *Cotesia plutella* bracovirus inhibits expression of antimicrobial peptides and enhances pathogenicity of *Bacillus thuringiensis*. **Journal of Asia-Pacific Entomology**, Suwon, v. 12, n. 4, p. 277-283, 2009.

SIMON, J.C.; BOUTIN, S.; TSUCHIDA, T.; KOGA, R.; LE GALLIC, J.F.; FRANTZ, A.; OUTREMAN, Y.; FUKATSU, T. Facultative symbiont infections affect aphid reproduction. **PLoS One**, San Francisco, v. 6, n. 7, p. e21831, 2011.

SINGH, S.; REESE, J.M.; CASANOVA-TORRES, Á.M.; GOODRICH-BLAIR, H.; FORST, S. Microbial population dynamics in the hemolymph of *Manduca sexta* infected with *Xenorhabdus nematophila* and the entomopathogenic nematode *Steinernema carpocapsae*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 80, n. 14, p. 4277-4285, 2014.

SMILANICH, A.M.; MASON, P.A.; SPRUNG, L.; CHASE, T.R.; SINGER, M.S. Complex effects of parasitoids on pharmacophagy and diet choice of a polyphagous caterpillar. **Oecologia**, New York, v. 165, n. 4, p. 995-1005, 2011.

SNYDER, A.K.; DEBERRY, J.W.; RUNYEN-JANECKY, L.; RIO, R.V. Nutrient provisioning facilitates homeostasis between tsetse fly (Diptera: Glossinidae) symbionts. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences**, London, v. 277, n. 1692, p. 238-239, 2010.

SOMMER, F.; BÄCKHED, F. The gut microbiota: masters of host development and physiology. **Nature Reviews Microbiology**, London, v. 11, n. 4, p. 227-238, 2013.

STOUTHAMER, R.; BREEUWER, J.A.J.; HURST, G.D.D. *Wolbachia pipientis*: microbial manipulator of arthropod reproduction. **Annual Review of Microbiology**, Palo Alto, v. 53, p. 71-102, 1999.

STRAND, M.R. Polydnviruses: abrogation of invertebrate immune systems. In: VAN REGENMORTEL, M.H.; MAHY, B.W. (Ed.). **Encyclopedia of virology**. 3rd ed. Oxford: Academic Press, 2008. p. 250-256.

_____. Teratocytes and their functions in parasitoids. **Current Opinion in Insect Science**, Amsterdam, v. 6, p. 68-73, 2014.

STRAND, M.R.; BURKE, G.R. Polydnvirus-wasp associations: evolution, genome organization, and function. **Current Opinion in Virology**, Amsterdam, v. 3, n. 5, p. 587-594, 2013.

STRAND, M.R.; PECH, L.L. Immunological basis for compatibility in parasitoid-host relationships. **Annual Review of Entomology**, Palo Alto, v. 40, p. 31-56, 1995.

STRAND, M.R.; MCKENZIE, D.I.; GRASSL, V.; DOVER, B.A.; AIKEN, J.M. Persistence and expression of *Microplitis demolitor* polydnvirus in *Pseudoplusia includens*. **The Journal of General Virology**, London, v. 73, n. 7, p. 1627-1635, 1992.

TAMBOLI, C.P.; NEUT, C.; DESREUMAUX, P.; COLOMBEL, J.F. Dysbiosis in inflammatory bowel disease. **Gut**, Bethesda, v. 53, n. 1, p. 1-4, 2004.

THOSS, V.; BYERS, J.A. Monoterpene chemodiversity of ponderosa pine in relation to herbivory and bark beetle colonization. **Chemoecology**, Stuttgart, v. 16, n. 1, p. 51-58, 2006.

VAN HOUTE, S.; ROS, V.I.; VAN OERS, M.M. Walking with insects: molecular mechanisms behind parasitic manipulation of host behaviour. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 22, n. 13, p. 3458-75, 2013.

VINSON, S.B.; IWANTSCH, G.F. Host regulation by insect parasitoids. **The Quarterly Review of Biology**, Chicago, v. 55, n. 2, p. 143-165, 1980.

WANG, J.; WU, Y.; YANG, G.; AKSOY, S. Interactions between mutualist *Wigglesworthia* and tsetse peptidoglycan recognition protein (PGRP-LB) influence trypanosome transmission. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, Washington, v. 106, n. 29, p. 12133-12138, 2009.

WEISS, B.; AKSOY, S. Microbiome influences on insect host vector competence. **Trends in Parasitology**, Oxford, v. 27, n. 11, p. 514-522, 2011.

WEISS, B.L.; WANG, J.; AKSOY, S. Tsetse immune system maturation requires the presence of obligate symbionts in larvae. **PLoS Biology**, San Francisco, v. 9, n. 5, p. e1000619, 2011.

XIE, J.; VILCHEZ, I.; MATEOS, M. *Spiroplasma* bacteria enhance survival of *Drosophila hydei* attacked by the parasitic wasp *Leptopilina heterotoma*. **PLoS One**, San Francisco, v. 5, n. 8, p. e12149, 2010.

YUN, J.H.; ROH, S.W.; WHON, T.W.; JUNG, M.J.; KIM, M.S.; PARK, D.S.; YOONB, C.; NAMA, Y.-D.; KIMA, Y.-J.; CHOIA, J.-H.; KIMA, J.-Y.; SHINA, N.-R.; KIMD, S.-H.; LEE, W.-J.; BAE, J.W. Insect gut bacterial diversity determined by environmental habitat, diet, developmental stage, and phylogeny of host. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 80, n. 17, p. 5254-5264, 2014.

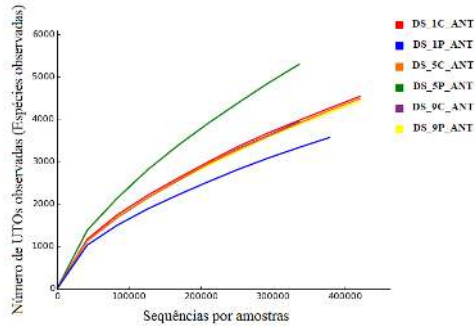
ZIENTZ, E.; DANDEKAR, T.; GROSS, R. Metabolic interdependence of obligate intracellular bacteria and their insect hosts. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, Washington, v. 68, n. 4, p. 745-770, 2004.

ANEXOS

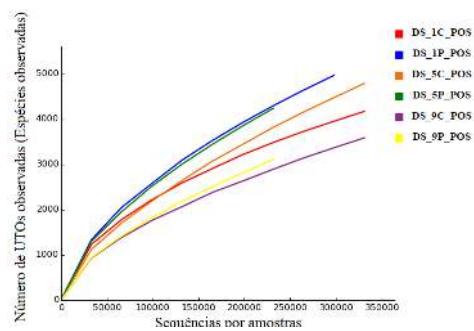
Diatraea saccharalis

Anexo A - Curvas de rarefação com base no número total de sequências e número total de UTOs (97% de similaridade) obtidas pela análise metagenômica da microbiota associada às regiões **a** antero-mediana (ANT) e **b** posterior (POS) do intestino de lagartas de *Diatraea saccharalis* parasitadas (P) ou não (C) por *Cotesia flavipes*, em diferentes períodos após o parasitismo (1, 5 e 9 dias)

A

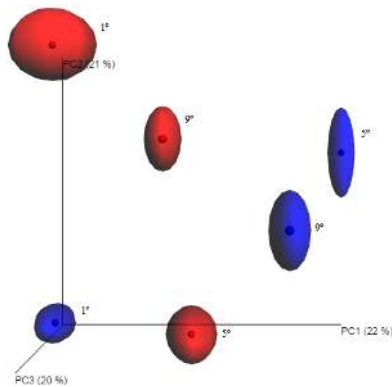


B

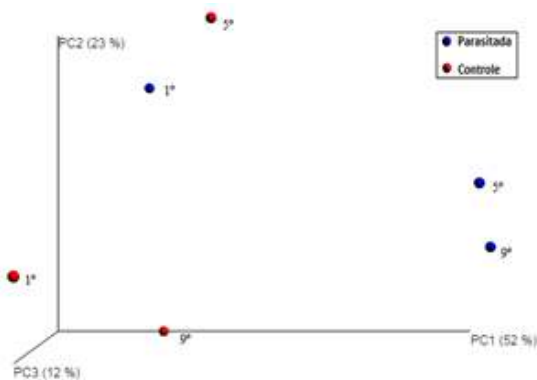


Anexo B - Análise de coordenadas principais (PCoA) da diversidade beta da microbiota pertencente à região antero-mediana do intestino de *Diatraea saccharalis* conduzida pelo método de Jackknife. Análises **a** não-ponderada e **b** ponderada do conjunto de dados

A

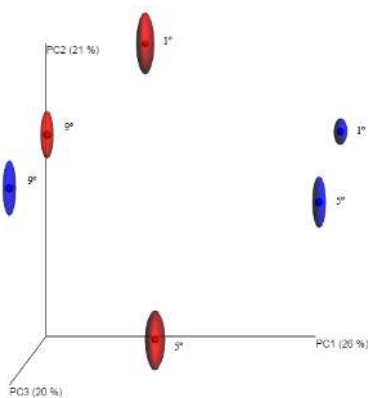


B

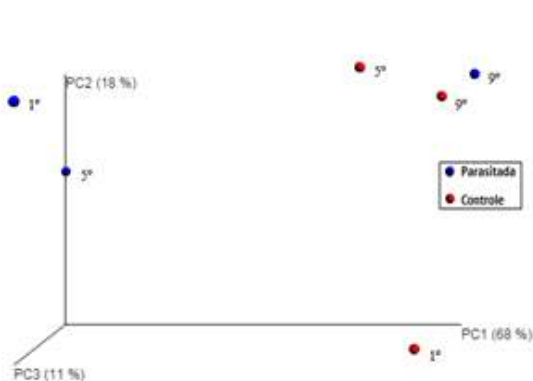


Anexo C - Análise de coordenadas principais (PCoA) da diversidade beta da microbiota pertencente à região posterior do intestino de *Diatraea saccharalis* conduzida pelo método de Jackknife. Análises **a** não-ponderada e **b** ponderada do conjunto de dados

A

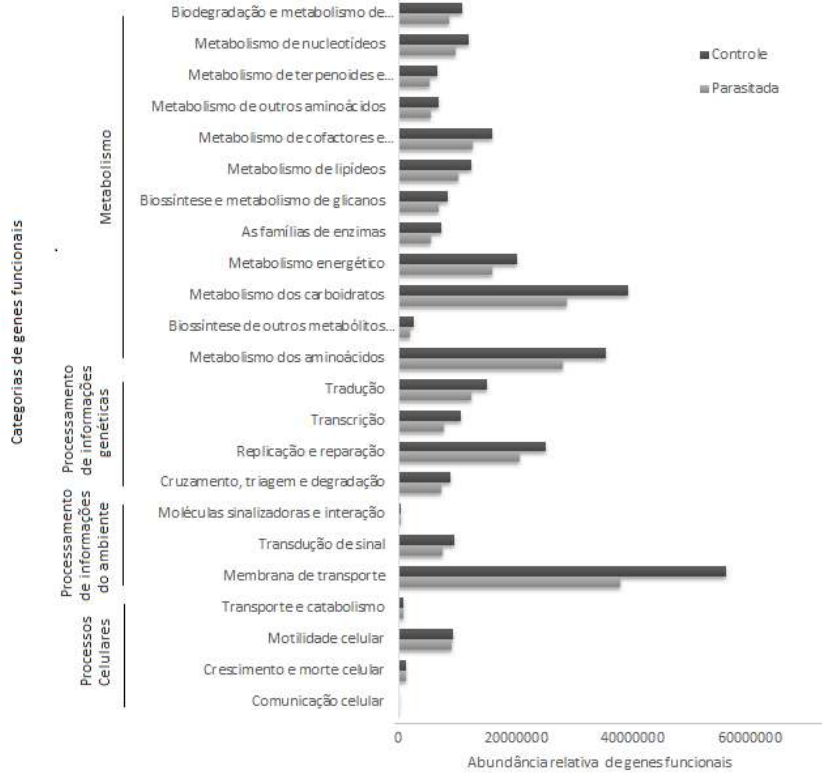


B

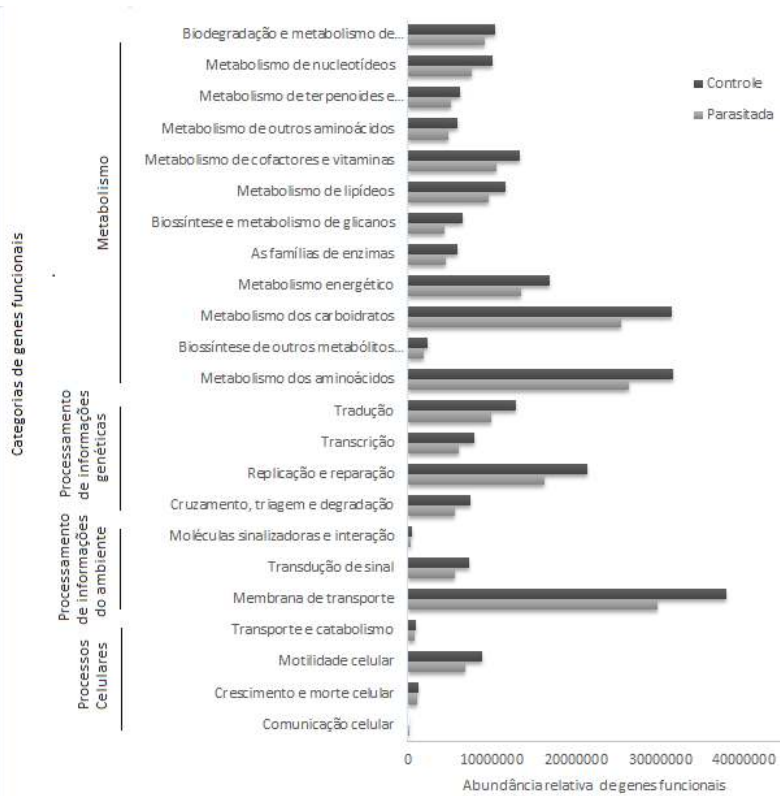


Anexo D - Abundância relativa de genes funcionais na microbiota intestinal de *Diatraea saccharalis*, parasitada ou não por *Cotesia flavipes* das regiões **a** antero-mediano e **b** posterior do intestino

A

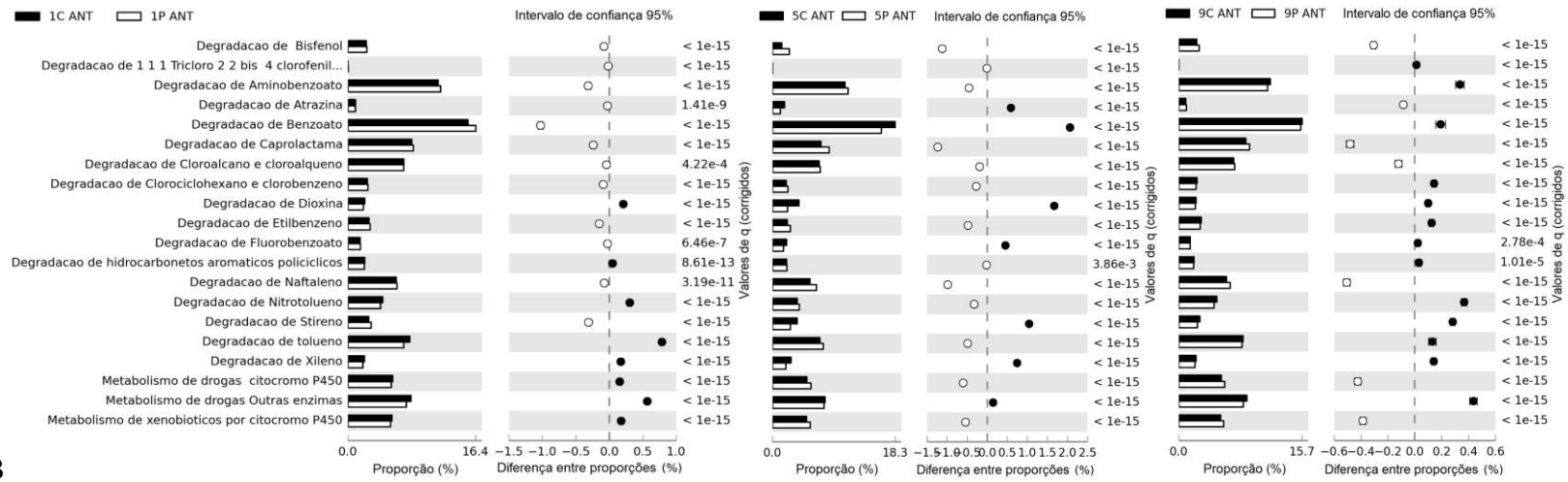


B

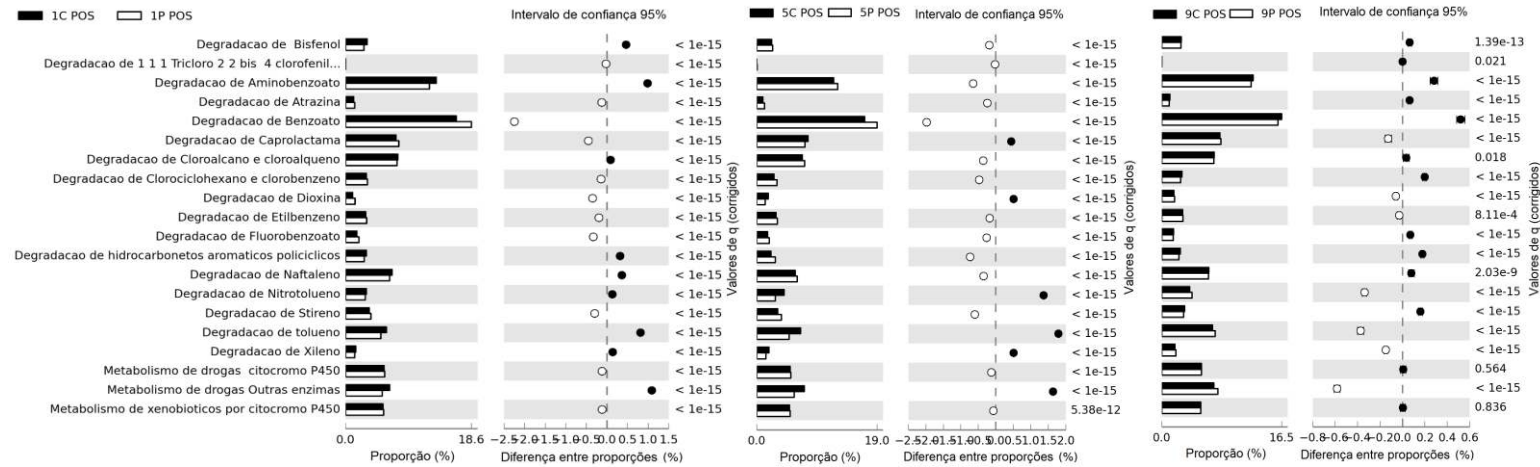


Anexo E - Abundância relativa de genes funcionais da microbiota intestinal de *Diatraea saccharalis* relacionados à degradação, associada às regiões *a* antero-mediana e *b* posterior do intestino de lagartas parasitadas (P) ou não (C) por *Cotesia flavipes*, em diferentes períodos de desenvolvimento (1, 5 e 9 dias após parasitismo –DAP)

A

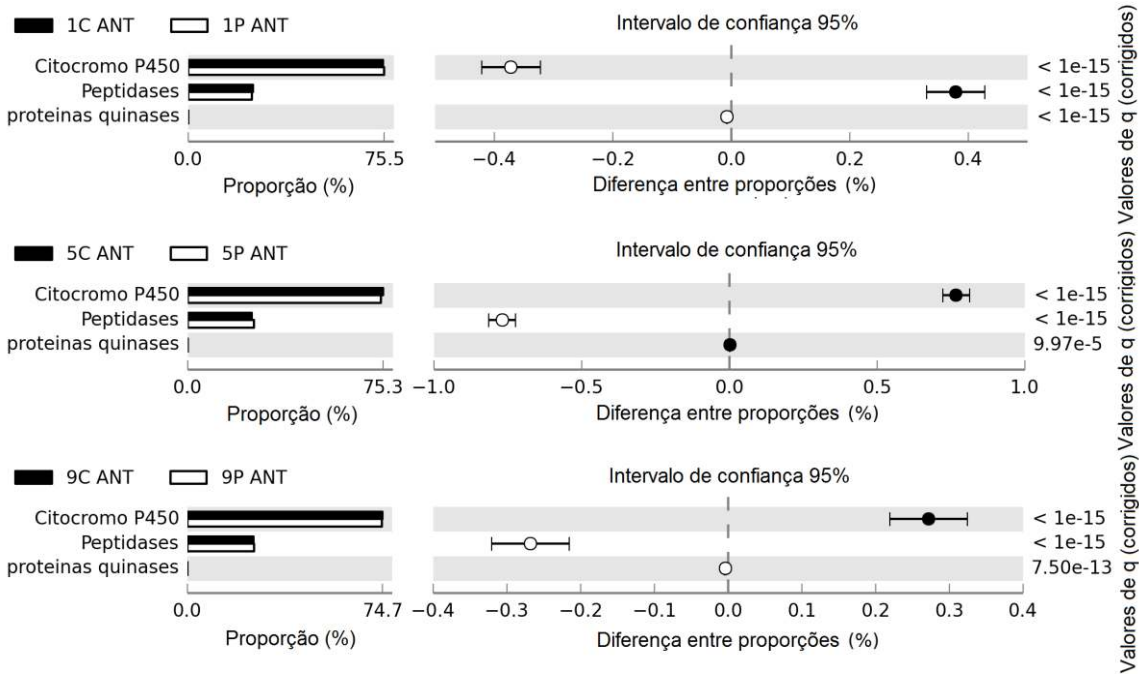


B

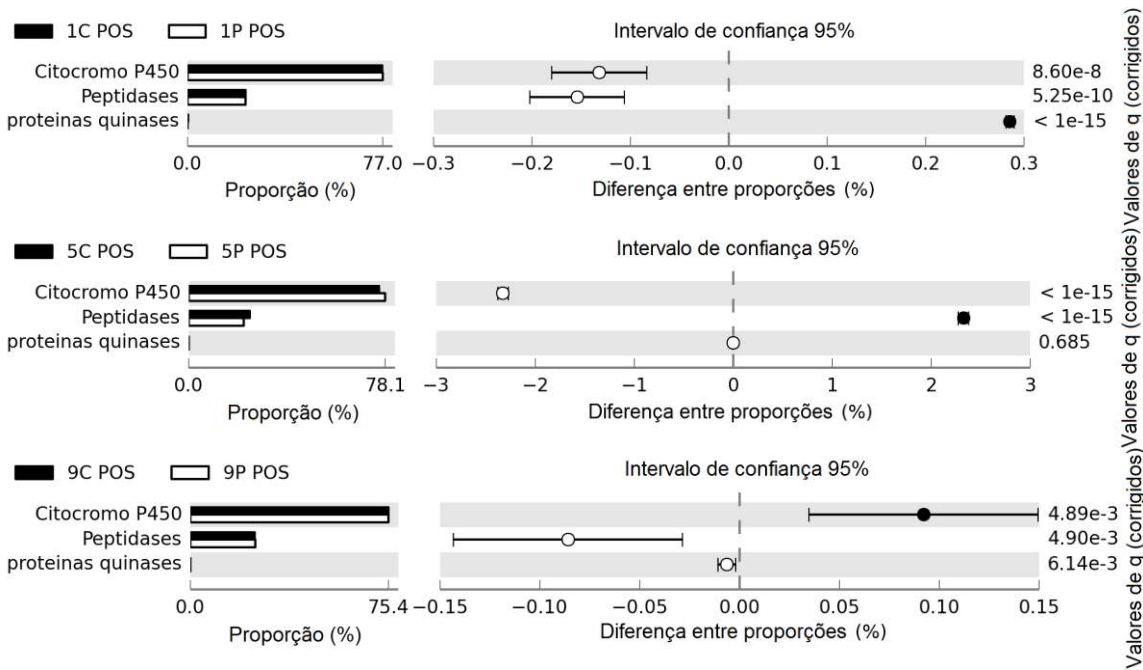


Anexo F - Abundância relativa de genes funcionais da microbiota intestinal de *Diatraea saccharalis* relacionados à produção de enzimas, associada às regiões **a** antero-mediana e **b** posterior do intestino de lagartas parasitadas (P) ou não (C) por *Cotesia flavipes*, em diferentes períodos de desenvolvimento (1, 5 e 9 dias após parasitismo – DAP)

A

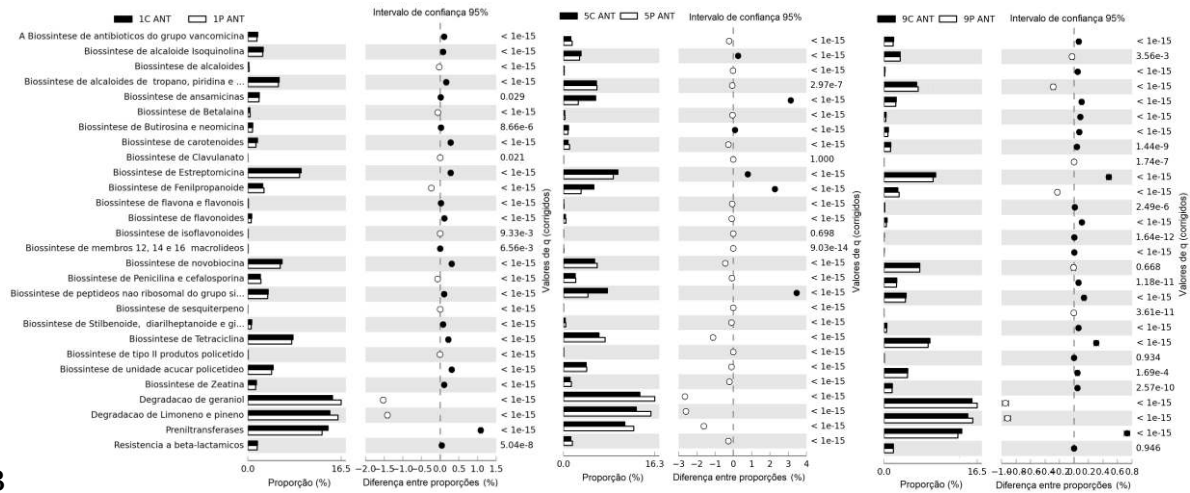


B

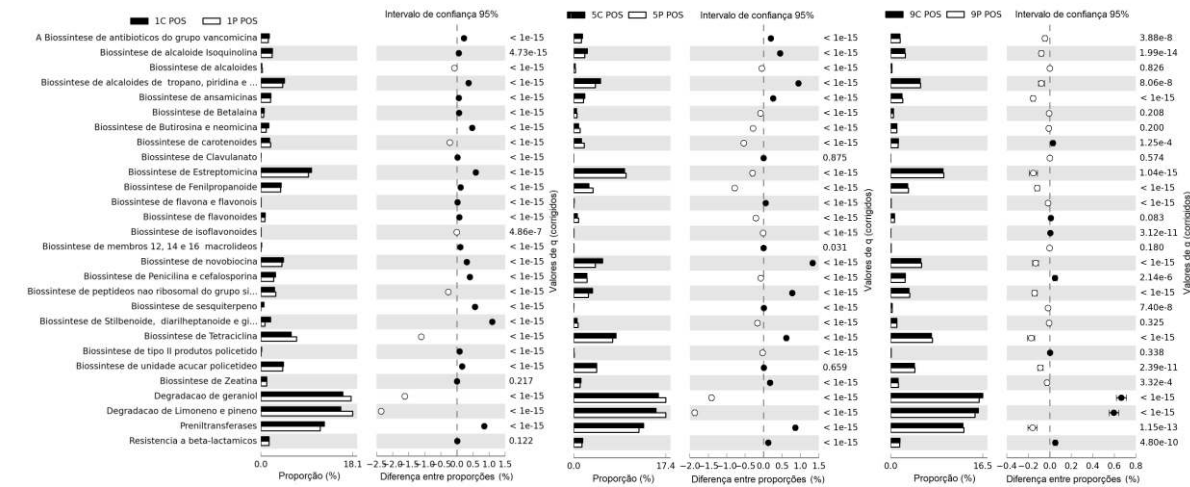


Anexo G - Abundância relativa de genes funcionais da microbiota intestinal de *Diatraea saccharalis* relacionados à defesa, associada às regiões **a** antero-mediana e **b** posterior do intestino de lagartas parasitadas (P) ou não (C) por *Cotesia flavipes*, em diferentes períodos de desenvolvimento (1, 5 e 9 dias após parasitismo –DAP)

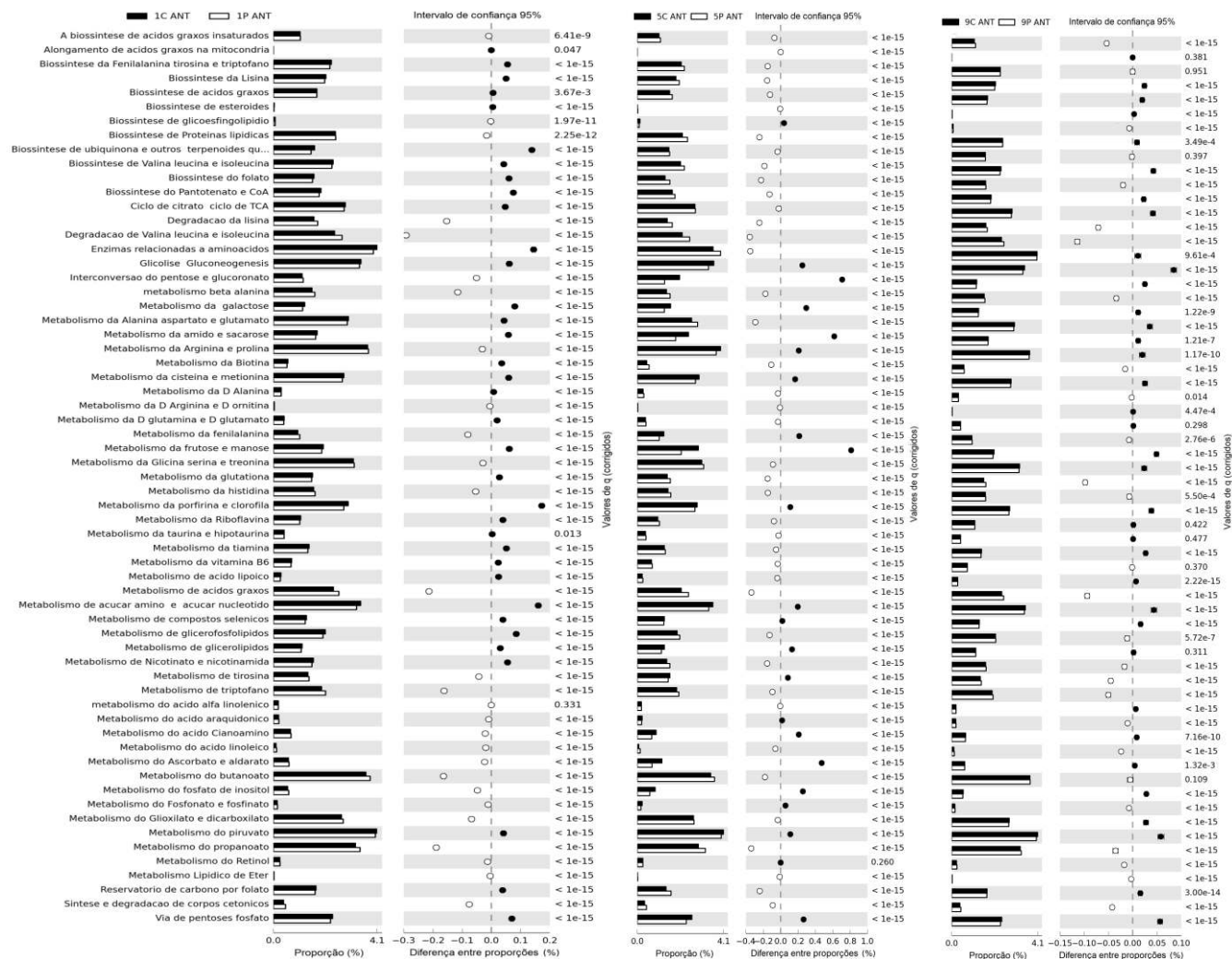
A



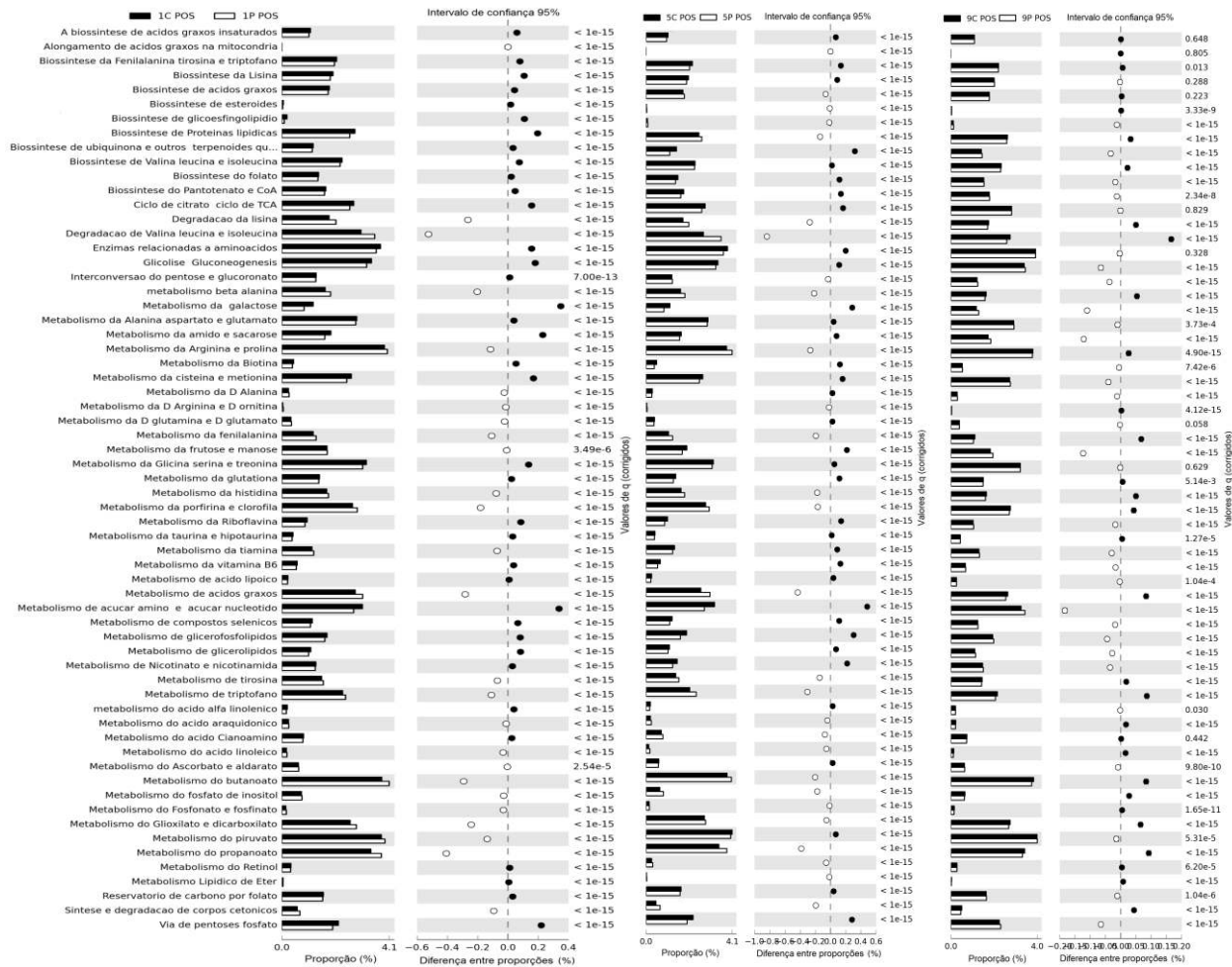
B



Anexo H - Abundância relativa de genes funcionais da microbiota intestinal de *Diatraea saccharalis* relacionados à nutrição, associada à região antero-mediana do intestino de lagartas parasitadas (P) ou não (C) por *Cotesia flavipes*, em diferentes períodos de desenvolvimento (1, 5 e 9 dias após parasitismo –DAP)

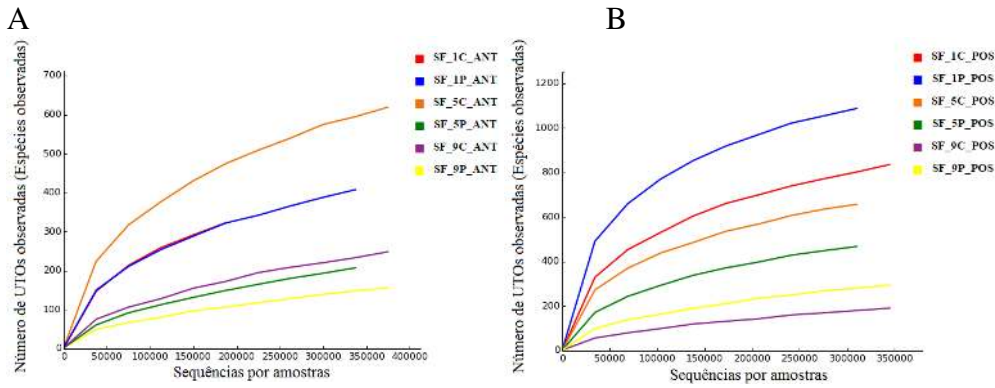


Anexo I - Abundância relativa de genes funcionais da microbiota intestinal de *Diatraea saccharalis* relacionados à nutrição, associada à região posterior do intestino de lagartas parasitadas (P) ou não (C) por *Cotesia flavipes*, em diferentes períodos de desenvolvimento (1, 5 e 9 dias após parasitismo –DAP

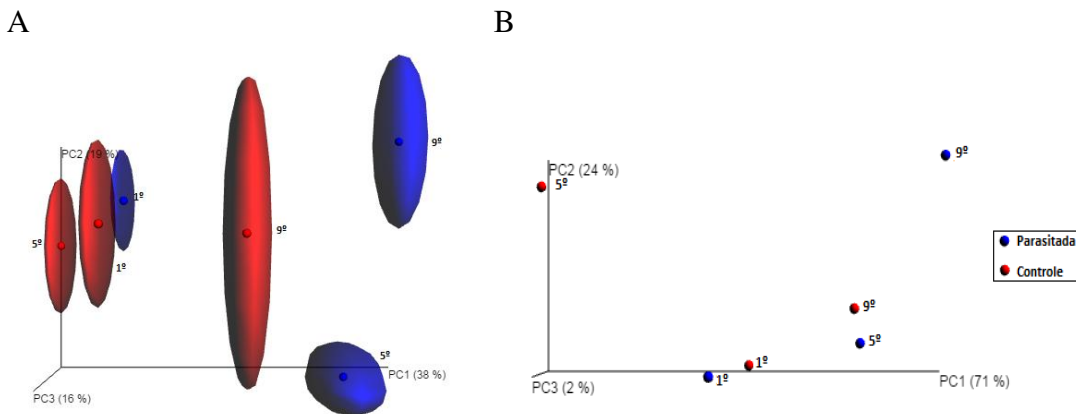


Spodoptera frugiperda

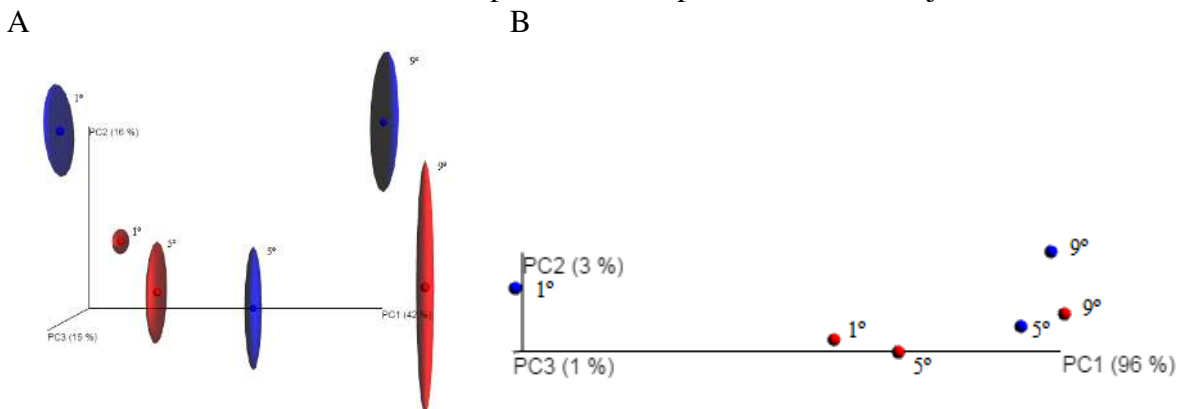
Anexo J - Curvas de rarefação com base no número total de sequências e número total de UTOs (97% de similaridade) obtidas pela análise metagenômica da microbiota associada às regiões antero-mediana **a** e posterior **b** do intestino de lagartas de *Spodoptera frugiperda* parasitadas (P) ou não (C) por *Cotesia flavipes*, em diferentes períodos de tempo após o parasitismo (1, 5 e 9 dias)



Anexo K - Análise de coordenadas principais (PCoA) da diversidade beta pertencente a região antero-mediana do intestino de *Spodoptera frugiperda* conduzida pelo método de Jackknife. Análises não-ponderada **a** e ponderada **b** do conjunto de dados

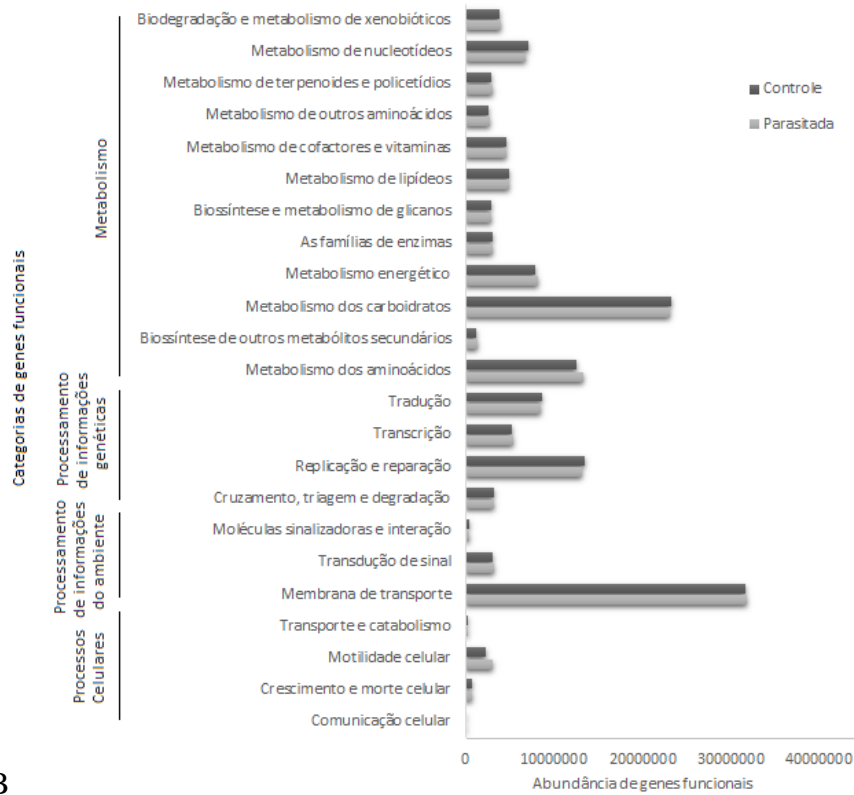


Anexo L - Análise de coordenadas principais (PCoA) da diversidade beta pertencente a região posterior do intestino de *Spodoptera frugiperda* conduzida pelo método de Jackknife. Análises não-ponderada **a** e ponderada **b** do conjunto de dados

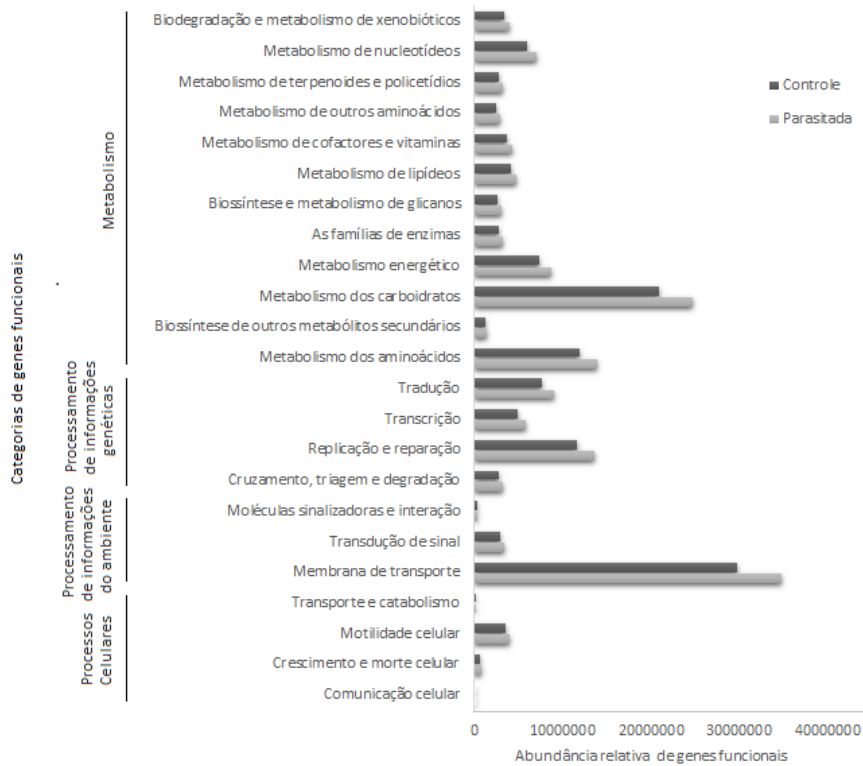


Anexo M - Abundância relativa de genes funcionais da microbiota intestinal de *Spodoptera frugiperda* em diferentes categorias. **a** Região antero-mediano do intestino **b** Região posterior do intestino

A

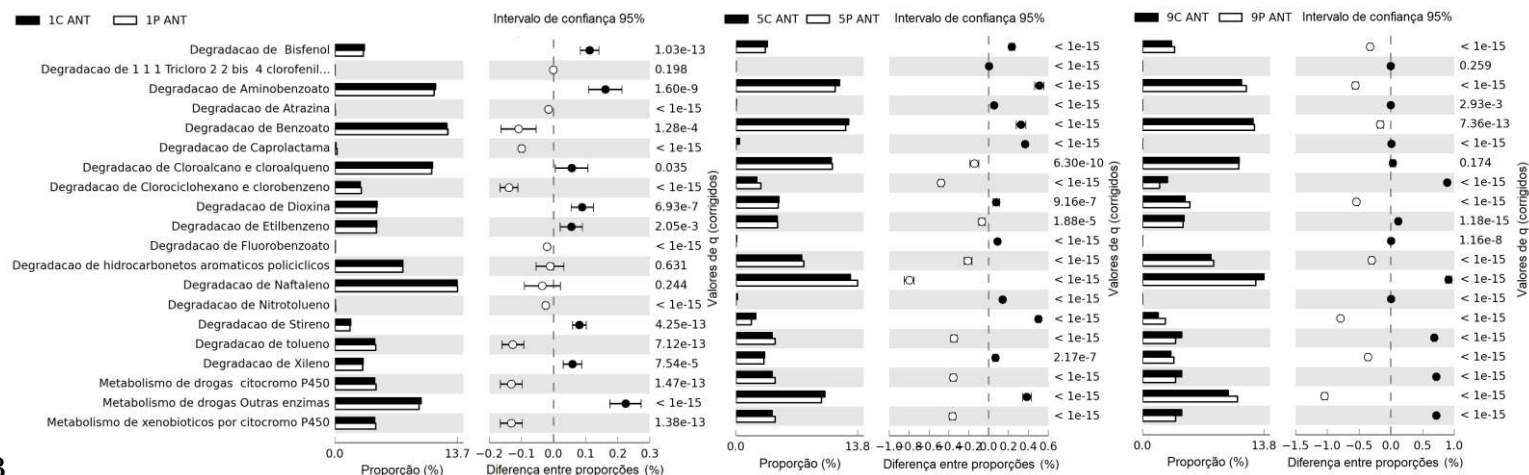


B

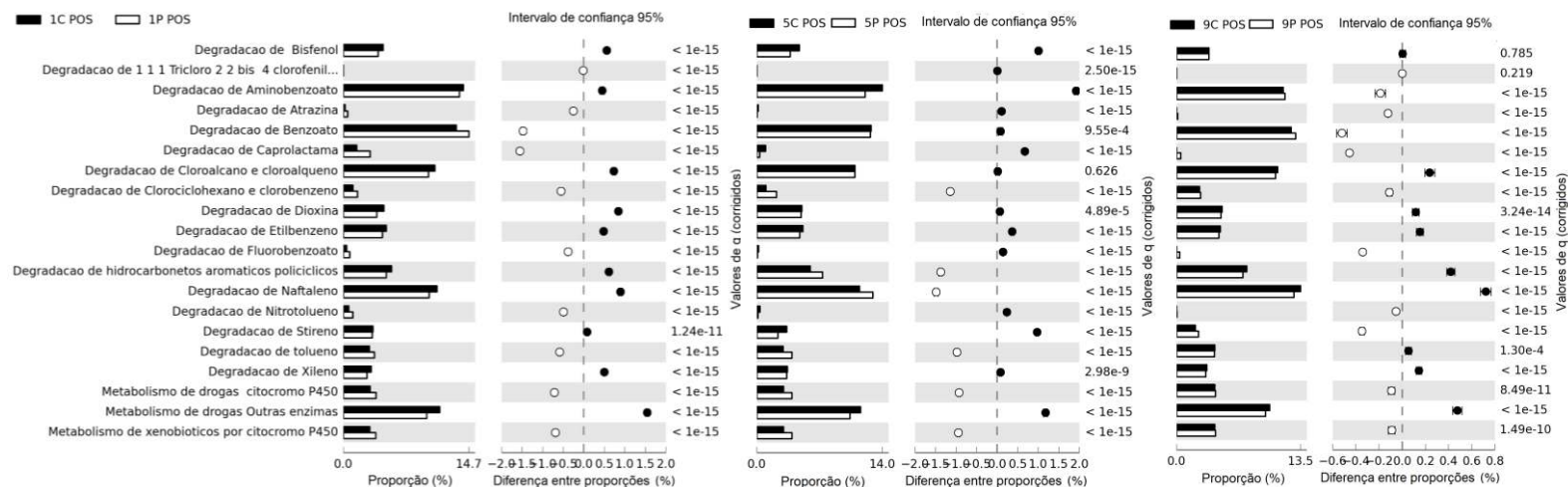


Anexo N - Abundância relativa de genes funcionais da microbiota intestinal de *Spodoptera frugiperda* relacionados à degradação, associada às regiões **a** antero-mediana e **b** posterior do intestino de lagartas parasitadas (P) ou não (C) por *Cotesia flavipes*, em diferentes períodos de desenvolvimento (1, 5 e 9 dias após parasitismo –DAP)

A

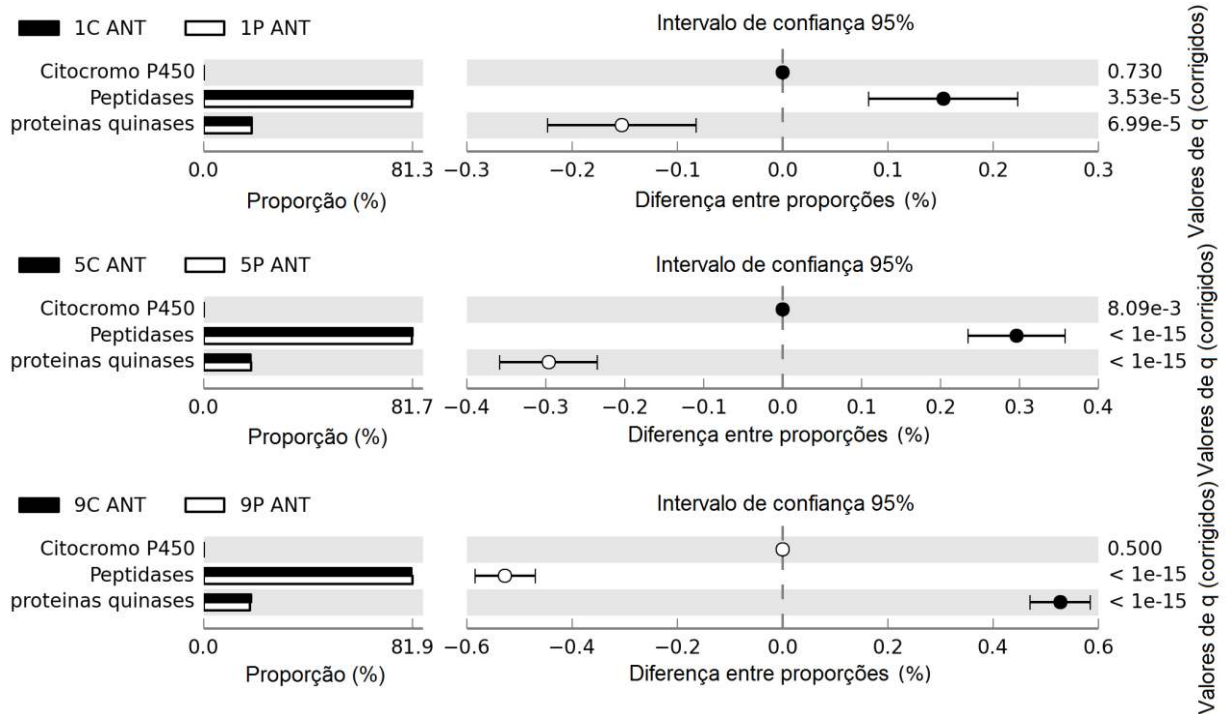


B

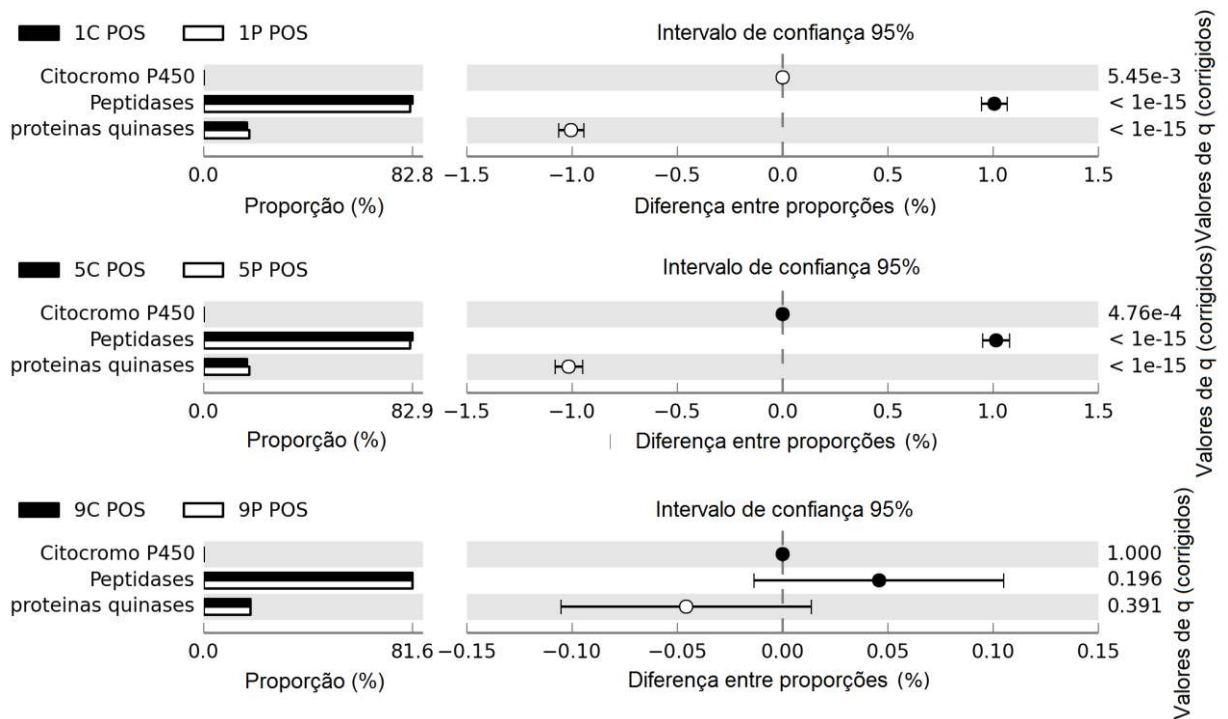


Anexo O - Abundância relativa de genes funcionais da microbiota intestinal de *Spodoptera frugiperda* relacionados à enzimas, associada às regiões **a** antero-mediana e **b** posterior do intestino de lagartas parasitadas (P) ou não (C) por *Cotesia flavipes*, em diferentes períodos de desenvolvimento (1, 5 e 9 dias após parasitismo –DAP)

A

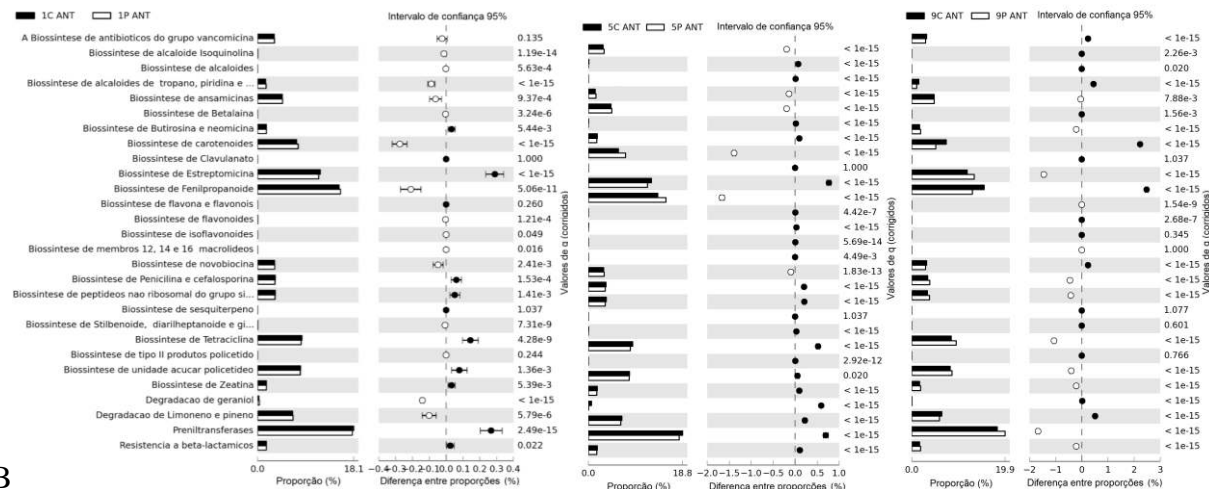


B

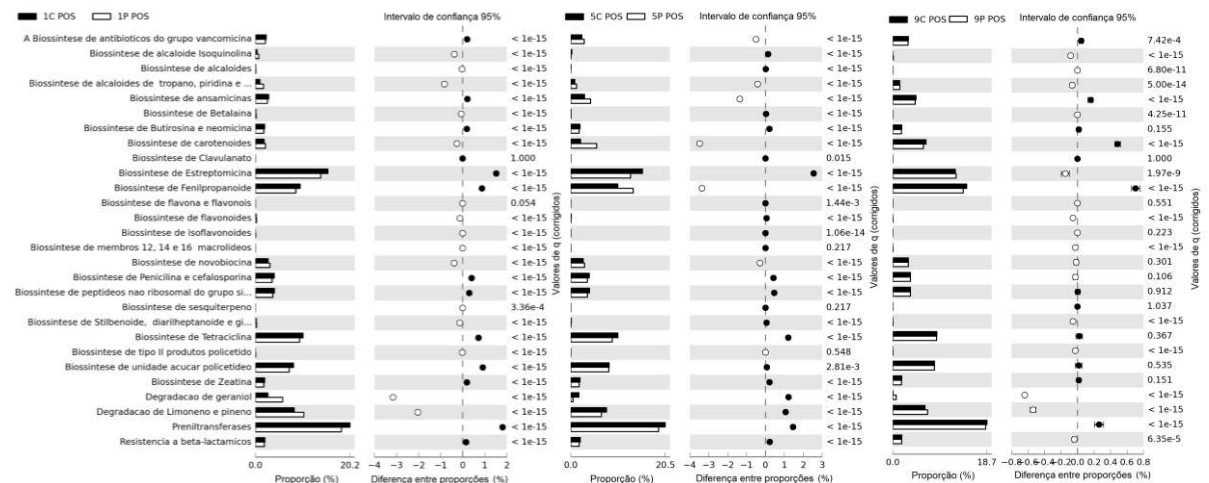


Anexo P - Abundância relativa de genes funcionais da microbiota intestinal de *Spodoptera frugiperda* relacionados à defesa, associada às regiões *a* antero-mediana e *b* posterior do intestino de lagartas parasitadas (P) ou não (C) por *Cotesia flavipes*, em diferentes períodos de desenvolvimento (1, 5 e 9 dias após parasitismo –DAP)

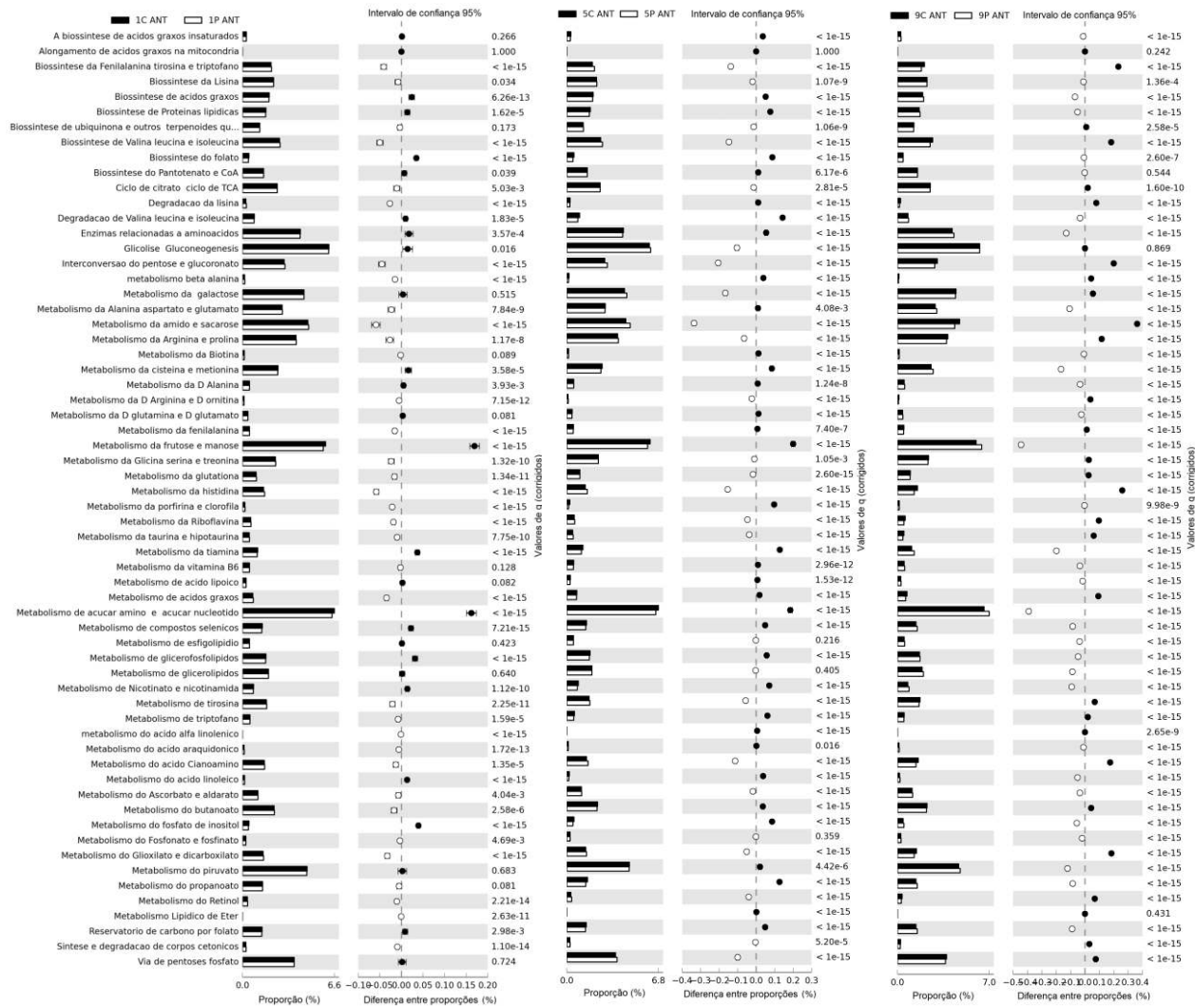
A



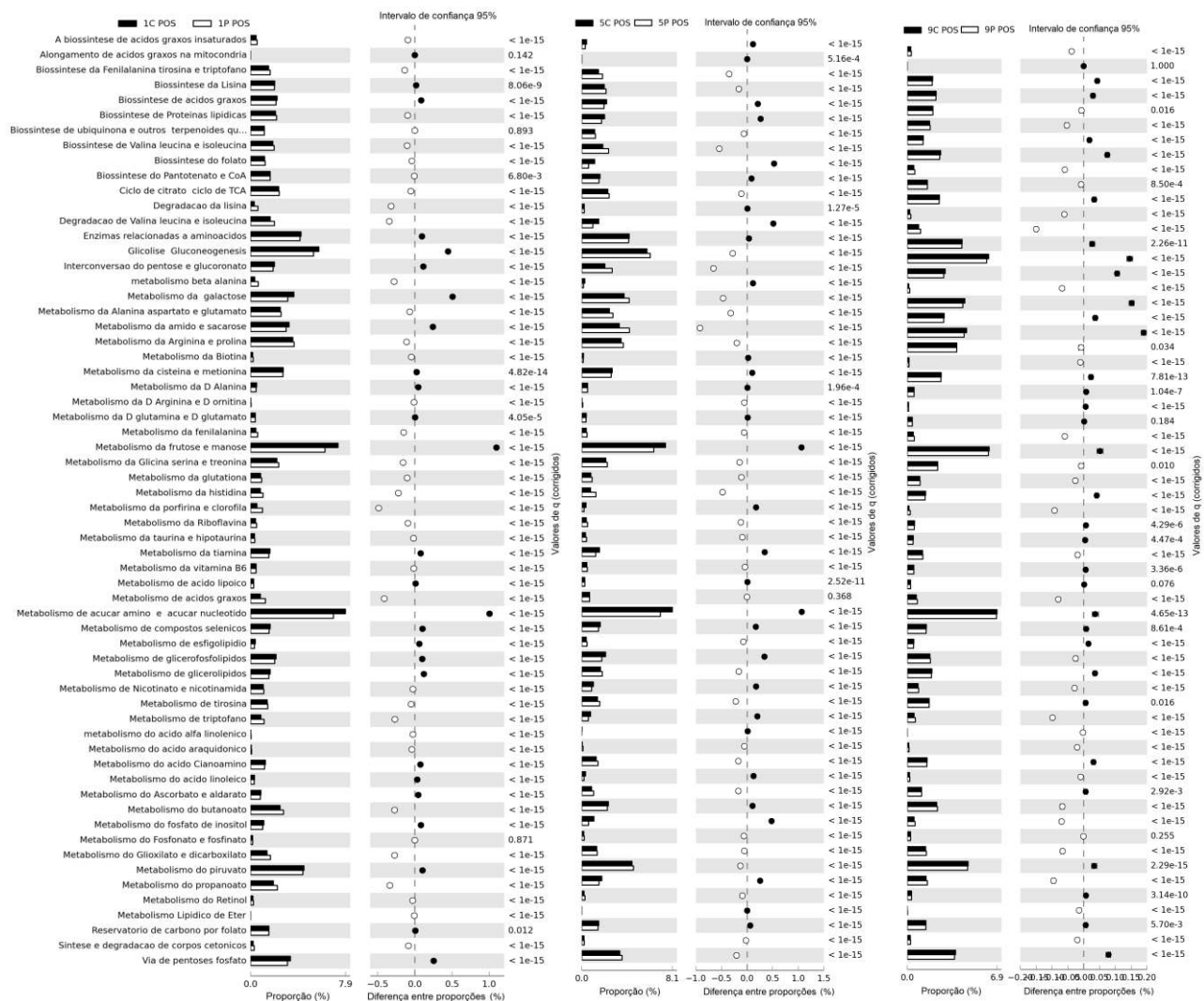
B



Anexo Q - Abundância relativa de genes funcionais da microbiota intestinal de *Spodoptera frugiperda* relacionados à nutrição, associada à região antero-mediana do intestino de lagartas parasitadas (P) ou não (C) por *Cotesia flavipes*, em diferentes períodos de desenvolvimento (1, 5 e 9 dias após parasitismo –DAP)

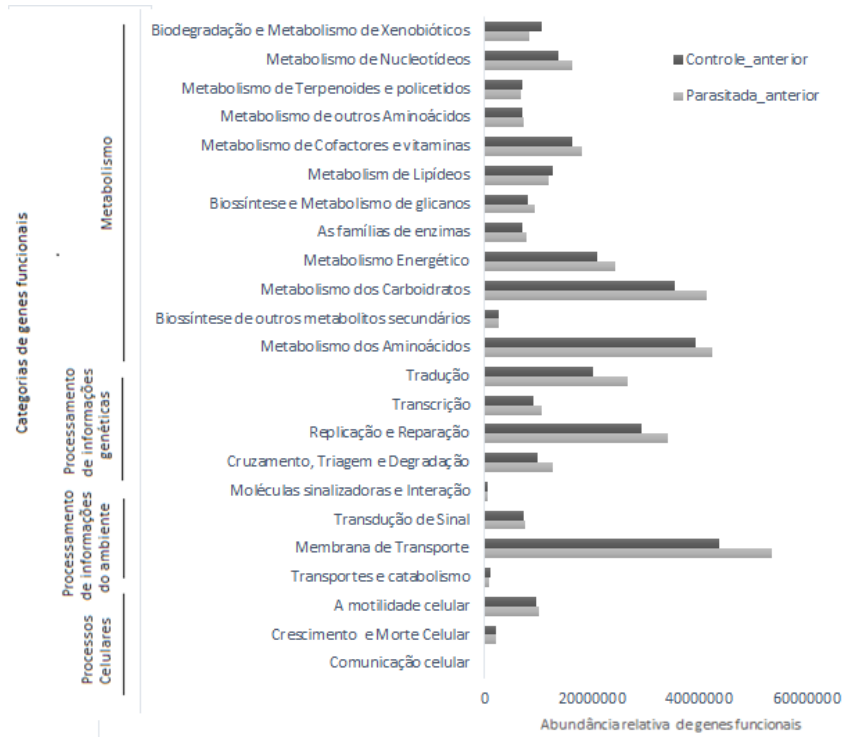


Anexo R - Abundância relativa de genes funcionais da microbiota intestinal de *Spodoptera frugiperda* relacionados à nutrição, associada à região posterior do intestino de lagartas parasitadas (P) ou não (C) por *Cotesia flavipes*, em diferentes períodos de desenvolvimento (1, 5 e 9 dias após parasitismo –DAP)

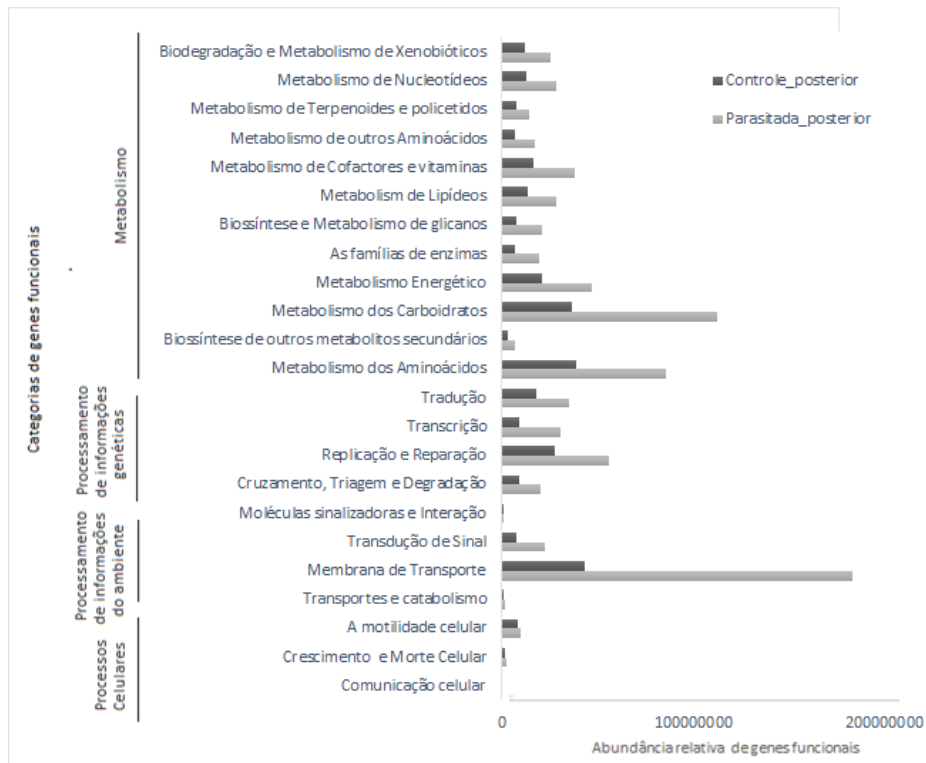


Anexo S - Abundância relativa de genes funcionais na microbiota intestinal de *Spodoptera frugiperda* parasitada ou não por *Cotesia flavipes* irradiada. **a** Região antero-mediana do intestino **b** Região posterior do intestino

A

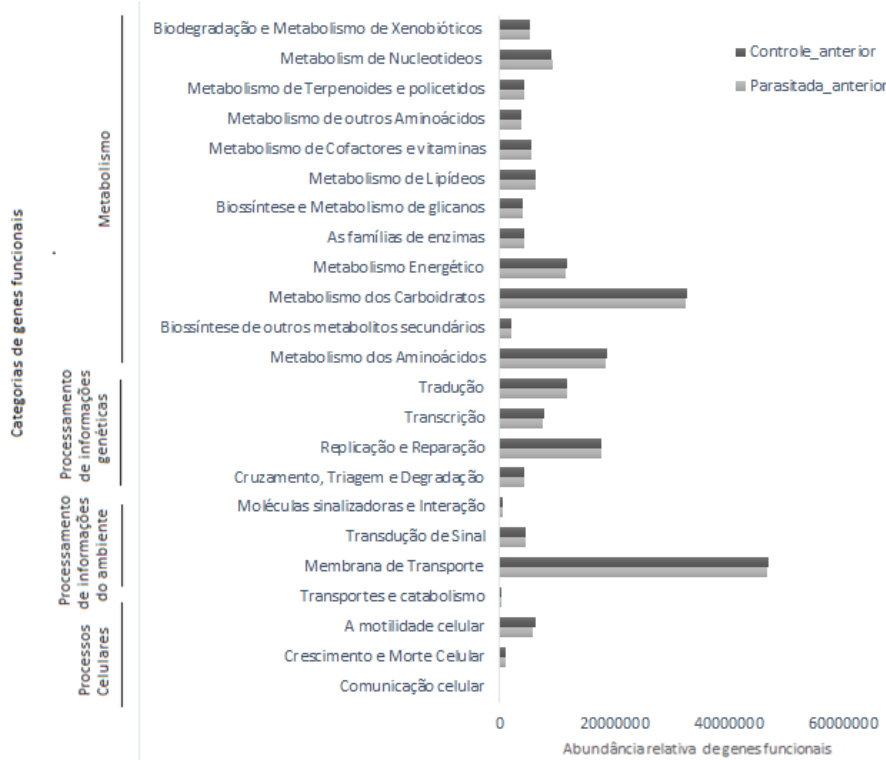


B



Anexo T - Abundância relativa de genes funcionais na microbiota intestinal de *Spodoptera frugiperda*, parasitada ou não por *Cotesia flavipes* irradiada. **a** Região antero-mediano do intestino **b** Região posterior do intestino

A



B

