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

**Análise transcricional da interação *Cotesia flavipes* Cameron
(Hymenoptera: Braconidae) – *Diatraea saccharalis* (F.) (Lepidoptera:
Crambidae) e exploração de fatores de virulência associados ao
parasitismo na transgenia de plantas**

Bruna Laís Merlin

Tese apresentada para obtenção do título de Doutora em
Ciências. Área de concentração: Entomologia

**Piracicaba
2018**

Bruna Laís Merlin
Bacharel e Licenciada em Ciências Biológicas

Análise transcricional da interação *Cotesia flavipes* Cameron (Hymenoptera: Braconidae) – *Diatraea saccharalis* (F.) (Lepidoptera: Crambidae) e exploração de fatores de virulência associados ao parasitismo na transgenia de plantas

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

Tese apresentada para obtenção do título de Doutora em Ciências. Área de concentração: Entomologia

Piracicaba
2018

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

Merlin, Bruna Laís

Análise transcricional da interação *Cotesia flavipes* Cameron (Hymenoptera: Braconidae) – *Diatraea saccharalis* (F.) (Lepidoptera: Crambidae) e exploração de fatores de virulência associados ao parasitismo na transgenia de plantas / Bruna Laís Merlin. - - Piracicaba, 2018.

142 p.

Tese (Doutorado) - - USP / Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz".

1. Bracovirus 2. Exploração Biotecnológica 3. Regulação hospedeira 4. Transgenia I. Título

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Salete e Sérgio, e ao Bruno, meu irmão, que viveram intensamente esses quatro anos de doutorado comigo, entendendo ausências, encurtando distâncias e me fazendo sempre feliz.

AGRADECIMENTOS

A Deus, que das formas mais simples, mesmo longe dos muros da igreja, sempre me permite um dia a mais para continuar.

Aos meus pais e meu irmão, que são o que eu tenho de mais valioso no mundo.

À Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” (ESALQ), por ser mais que a universidade onde optei por me graduar bióloga, mestre e doutora. Os dias nesse campus com certeza são únicos, por abrigar tantos caminhos bonitos aos olhos e tantas histórias boas para contar.

Ao Programa de Pós-Graduação em Entomologia da ESALQ, pela oportunidade e disponibilização de boas aulas, palestras, experiências de extensão e profissionais. Estendo meus agradecimentos aos funcionários do Departamento de Entomologia, que sempre foram muito atenciosos, com menção especial a Neide, do Laboratório de Biologia de Insetos, e a Marcele, que desde que chegou ao laboratório tornou nossos dias mais inspiradores e alegres.

Ao prof. Dr. Fernando L. Cônsoli, pelo incentivo e desafio que me proporcionou nesses últimos quatro anos, sempre me mantendo entusiasmada.

Ao prof. Dr. Lázaro E. P. Peres e à equipe do Laboratório de Controle Hormonal do Desenvolvimento Vegetal da ESALQ, em especial à pós-doutoranda Lilian Ellen Pino, por toda a ajuda e os ensinamentos durante a transformação de plantas.

Ao doutorando Fábio Prativiera, do Programa de Pós-Graduação em Estatística e Experimentação Agrônômica da ESALQ, pelas discussões estatísticas.

Aos amigos do Laboratório de Interações em Insetos, que fazem dos meus dias muito mais alegres e dos meus cafés, mais doces. São muitos os que já não compartilham do dia-a-dia do laboratório, mas todos fazem parte das minhas recordações felizes. Seria injusta mencionar apenas os atuais ou esquecer-me de alguém!

Há muitos amigos que compartilharam bons momentos comigo, mas alguns são especiais o tempo todo. Aos queridos amigos de Biosfera, pelas noites divertidas; a Tarsila, por ser minha melhor prima-amiga desde a infância, a Xili, por não desistir de mim mesmo morando do outro lado do mundo, ao Edoardo, que faz com que os dias sempre comecem alegres, ao Rogério, que compartilha comigo todas as etapas de pós-graduação e já faz parte da minha família, e a Aline P., que é a melhor amiga que eu poderia “herdar” da pós-graduação, que compartilha comigo as histórias mais malucas e as mais sensatas que eu poderia viver. Gratidão imensa por vocês terem permanecido!

À CAPES, pela concessão da bolsa.

A todos que, de alguma forma, mesmo que pequena, me ajudaram na realização desse trabalho.

RESUMO

Análise transcricional da interação *Cotesia flavipes* Cameron (Hymenoptera: Braconidae) – *Diatraea saccharalis* (F.) (Lepidoptera: Crambidae) e exploração de fatores de virulência associados ao parasitismo na transgenia de plantas

Ao longo do processo evolutivo, parasitoides desenvolveram inúmeras estratégias para a colonização de seus hospedeiros, resultando em mecanismos específicos de regulação. Endoparasitoides cenobiontes depositam seus ovos no hospedeiro e manipulam sua fisiologia e suas repostas imunológicas, a fim de tornar o hospedeiro um ambiente seguro e nutricionalmente adequado para o desenvolvimento do imaturo. A associação de parasitoides das famílias Braconidae e Ichneumonidae com vírus da família Polydnaviridae e sua injeção no hospedeiro configuram-se como um dos principais mecanismos de regulação utilizados durante o parasitismo, devido sua ação sobre a expressão de genes do hospedeiro. O conjunto diverso de fatores maternos e larvais apresentados por parasitoides pode apresentar potencial biotecnológico no controle de pragas, que busca por novos nichos de exploração. Apesar disso, a especificidade das interações hospedeiro – parasitoide limita a exploração de eventos que utilizam tais fatores de virulência, baseada na necessidade de táticas que apresentem ação sobre maior número de espécies-praga. Dessa forma, a presente tese teve por objetivo identificar fatores de virulência expressos durante a interação *Cotesia flavipes* Cameron (Hymenoptera: Braconidae) – *Diatraea saccharalis* (F.) (Lepidoptera: Crambidae), buscando a identificação de fatores com potencial biotecnológico, e identificar vias metabólicas do hospedeiro alvos de regulação, buscando por genes-alvos de controle. Além disso, essa tese buscou avaliar o potencial biotecnológico de um fator de virulência (CfHTIF) pertencente ao vírus simbiote de *C. flavipes* e de um fator de virulência larval (TnQuit) expresso por teratócitos associados a *Toxoneuron nigriceps* (Viereck) (Hymenoptera: Braconidae) contra hospedeiros incomuns. O parasitismo e a injeção de fatores maternos por *C. flavipes* resultou na regulação de inúmeras vias metabólicas de *D. saccharalis*, principalmente relacionadas ao controle do sistema endócrino e do sistema imunológico e identificou a expressão de genes virais e larvais associados a *C. flavipes*. Plantas transformadas com o fator de virulência TnQuit apresentaram efeitos na sobrevivência e no desenvolvimento dos hospedeiros não-permissivos de hábito mastigador, *Chrysodeixis includens* (Walker) (Lepidoptera: Noctuidae), *Spodoptera albula* (Walker) (Lepidoptera: Noctuidae) e *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae), minador, *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae), e sugador, *Bemisia tabaci* (Gennadius) (Hemiptera: Aleyrodidae), enquanto que o gene viral CfHTIF interferiu nas eficiências de conversão do alimento ingerido e digerido de *S. albula*, mas não de *S. frugiperda*.

Palavras-chave: Bracovírus; Exploração biotecnológica; Regulação hospedeira; Transgenia

ABSTRACT

Transcriptional analysis of the interaction *Cotesia flavipes* Cameron (Hymenoptera: Braconidae) – *Diatraea saccharalis* (F.) (Lepidoptera: Crambidae) and the exploration of virulence factors associated with parasitization in plant transgenesis

Parasitoids developed many strategies for colonization of their hosts during the evolution of associations with their hosts, which resulted in the development of specific mechanisms of host regulation. Koinobiont endoparasitoids deposit their eggs into the host and manipulate the host's physiology and immune responses in order to turn the host a safe and nutritionally suitable environment for parasitoid immature development. The association of parasitoids belonging to Braconidae and Ichneumonidae with virus of the family Polydnaviridae, which are injected in the host, constitutes one of the main mechanisms of regulation used during the parasitization due to viral regulation of the host gene expression. The diverse set of maternal and larval-derived factors produced by parasitoids may have biotechnological potential for pest control. Nevertheless, the specificity of the host – parasitoid interactions are thought to limit the exploration of events that use such virulence factors, as a consequence on the need of successful tactics for a large number of pest species. Thus, we aimed to identify the virulence factors expressed during the interaction *Cotesia flavipes* Cameron (Hymenoptera: Braconidae) - *Diatraea saccharalis* (F.) (Lepidoptera: Crambidae) to identify factors with biotechnological potential and to identify targets of regulation that could aid on the development of additional control tactics. In addition, we evaluated the biotechnological potential of a virulence factor (*CfHTIF*) belonging to the symbiont virus of *C. flavipes* and a larval virulence factor (*TnQuit*) expressed by teratocytes associated to *Toxoneuron nigriceps* (Viereck) (Hymenoptera: Braconidae) against non-host species. Parasitization and pseudoparasitization of *D. saccharalis* larvae by *C. flavipes* resulted in the regulation of several metabolic pathways, particularly those related to the endocrine and immune systems. We also characterized the transcriptome of *C. flavipes* and of associated bracovirus in parasitized and pseudoparasitized hosts. Plants transformed with the *TnQuit* virulence factor affected survival and development of the non-permissive hosts *Chrysodeixis includens* (Walker) (Lepidoptera: Noctuidae), *Spodoptera albula* (Walker) (Lepidoptera: Noctuidae) and *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae), *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae) and the number of developing adults of *Bemisia tabaci* (Gennadius) (Hemiptera: Aleyrodidae). *CfHTIF*-transgenic plants affected the efficiency of conversion of the digested and ingested food of *S. albula* larvae, but not of *S. frugiperda* larvae.

Keywords: Biotechnology exploration; Bracovirus; Host regulation; Transgenesis

1. INTRODUÇÃO

A diversificação do comportamento parasítico foi intensa na ordem Hymenoptera, levando ao desenvolvimento de parasitoides, que utilizam inúmeras estratégias para a colonização de seus hospedeiros com eficiência (Burke and Strand, 2014). Entre as estratégias de utilização do hospedeiro, espécies cenobiontes desenvolveram fatores maternos e larvais que as auxiliam na manutenção e na manipulação da fisiologia do seu hospedeiro vivo, para que o ambiente parasitado seja seguro e adequado nutricionalmente ao desenvolvimento parasitoide (Pennacchio et al., 2014; Schmidt, 2006). Para isso, parasitoides utilizam de fatores maternos e larvais em um processo denominado de regulação hospedeira (Vinson and Iwantsch, 1980).

A utilização de moléculas bioativas por parasitoides resultou na evolução de respostas hospedeiras mais eficientes contra esse ataque (Burke and Strand, 2014). Nessa corrida coevolutiva, parasitoides, por sua vez, desenvolveram novos mecanismos de regulação, que se tornaram cada vez mais específicos, culminando na diminuição da diversidade de hospedeiros atacados com sucesso por cada espécie, já que o desenvolvimento de fatores específicos pode adicionar custos adaptativos bastante elevados (Burke and Strand, 2014; Cui et al., 2000; Drezen et al., 2017).

Dentre os fatores maternos, parasitoides podem injetar em seus hospedeiros juntamente com os ovos, proteínas ovarianas, veneno e partículas virais (Asgari and Rivers, 2011; Beckage and Gelman, 2004; Webb et al., 2006). Parasitoides também podem liberar fatores larvais, como as células denominadas de teratócitos, as quais se originam pela dissociação da membrana serosa no processo de eclosão do embrião (Dahlman, 1991; Strand, 2014). Os teratócitos liberados por parasitoides das famílias Braconidae, Platygasteridae e Scelionidae podem expressar genes envolvidos na regulação hormonal do hospedeiro, assim como produzir peptídeos antimicrobianos (Ali et al., 2013; Gao et al., 2016). O veneno, bastante importante para parasitoides idiobiontes, que paralisam seus hospedeiros, apresenta funções diferentes nos parasitoides cenobiontes (Colinet et al., 2013; Poirié et al., 2014). Em *Hyposoter didymator* (Thunberg) (Hymenoptera: Ichneumonidae), sua injeção não interfere no sucesso do parasitismo (Dorémus et al., 2013), enquanto que para espécies do gênero *Cotesia* (Hymenoptera: Braconidae), a presença de veneno tem ação sinérgica às partículas virais (Yu et al., 2007; Zhang et al., 2004).

As partículas virais estão presentes em parasitoides das famílias Braconidae e Ichneumonidae e são agrupadas na família Polydnaviridae, apresentando DNA dupla fita polidisperso (Dupuy et al., 2006). Os polidnavírus (PDVs) estão integrados ao genoma do

parasitoide e são transmitidos verticalmente entre as gerações (Drezen et al., 2003). A replicação dos PDVs ocorre apenas em células do cálice do ovário de fêmeas do parasitoide, onde também são encapsidados e liberados para o lúmen do ovário para injeção no hospedeiro (Drezen et al., 2003, 2014). Quando injetados no hospedeiro pelo parasitoide no momento da oviposição, as partículas de PDVs invadem as células dos diferentes tecidos do hospedeiro parasitado para expressar seus genes e produzir moléculas bioativas contra o hospedeiro, o que resulta na regulação das vias metabólicas e das respostas imunológicas do hospedeiro para favorecer o parasitoide.

Embora na mesma família, os vírus que estão associados a Braconidae e a Ichneumonidae não apresentam ancestralidade comum, constituindo um exemplo de evolução convergente, pois desenvolveram características semelhantes, como a duplicação de genes importantes para o parasitismo e a formação de famílias multigênicas (Clavijo et al., 2011; Serbielle et al., 2012). Genes já estudados que pertencem às famílias multigênicas podem manipular vias do sistema endócrino, causando retardo no desenvolvimento do hospedeiro (Falabella et al., 2006; Ignesti et al., 2018), alterar a organização celular de hemócitos e impedir que as células de defesa atuem no processo de encapsulação (Nalini and Kim, 2009; Pruijssers and Strand, 2007), e regular a disponibilidade e o armazenamento de carboidratos e proteínas para seu próprio consumo (Kim and Kim, 2016; Thompson, 2001).

A regulação hospedeira tão específica leva à ineficiência de parasitoides contra hospedeiros não-permissivos e observa-se menor expressão de genes virais nesses hospedeiros (Bitra et al., 2016; Dorémus et al., 2014). Porém, quando moléculas biotivas são isoladas e são avaliadas contra hospedeiros incomuns, a ação é observada (Kim et al., 2016). A baixa eficiência das partículas virais em invadir células de hospedeiros não-permissivos pode estar relacionada ao insucesso do parasitoide em colonizar tais hospedeiros.

O conjunto de genes virais e larvais que apresentam ação na regulação hospedeira desperta atenção para o potencial de exploração biotecnológica, já que a prospecção de novas moléculas bioativas para o controle de pragas é uma necessidade, devido ao número limitado de toxinas de *Bacillus thuringiensis* que ainda pode ser explorado através de transgenia e ao surgimento de populações de insetos-alvo resistentes (Blanco et al., 2016; Farias et al., 2016; Prado et al., 2014). Dessa forma, conhecer os genes parasitoides expressos durante as interações hospedeiro – parasitoide, assim como os genes hospedeiros que são alvos de regulação, pode auxiliar no entendimento das interações, e pode ser bastante promissor para a prospecção de novas tecnologias, eficientes até mesmo contra hospedeiros incomuns ao parasitoide.

Referências

- Ali, M. R., Seo, J., Lee, D., and Kim, Y. (2013). Teratocyte-secreting proteins of an endoparasitoid wasp, *Cotesia plutellae*, prevent host metamorphosis by altering endocrine signals. *Comp. Biochem. Physiol. - A Mol. Integr. Physiol.* 166, 251–262. doi:10.1016/j.cbpa.2013.06.028.
- Asgari, S., and Rivers, D. B. (2011). Venom proteins from endoparasitoid wasps and their role in host-parasite interactions. *Annu. Rev. Entomol.* 56, 313–335. doi:10.1146/annurev-ento-120709-144849.
- Beckage, N. E., and Gelman, D. B. (2004). Wasp parasitoid disruption of host development: implications for new biologically based strategies for insect control. *Annu. Rev. Entomol.* 49, 299–330. doi:10.1146/annurev.ento.49.061802.123324.
- Bitra, K., Burke, G. R., and Strand, M. R. (2016). Permissiveness of lepidopteran hosts is linked to differential expression of bracovirus genes. *Virology* 492, 259–272. doi:10.1016/j.virol.2016.02.023.
- Blanco, C. A., Chiaravalle, W., Dalla-Rizza, M., Farias, J. R., García-Degano, M. F., Gastaminza, G., et al. (2016). Current situation of pests targeted by *Bt* crops in Latin America. *Curr. Opin. Insect Sci.* 15, 131–138. doi:10.1016/j.cois.2016.04.012.
- Burke, G. R., and Strand, M. R. (2014). Systematic analysis of a wasp parasitism arsenal. *Mol. Ecol.* 23, 890–901. doi:10.1111/mec.12648.
- Clavijo, G., Dorémus, T., Ravallec, M., Mannucci, M. A., Jouan, V., Volkoff, A. N., et al. (2011). Multigenic families in ichnovirus: A tissue and host specificity study through expression analysis of vankyrins from *Hyposoter didymator* ichnovirus. *PLoS One* 6. doi:10.1371/journal.pone.0027522.
- Colinet, D., Mathé-Hubert, H., Allemand, R., Gatti, J. L., and Poirié, M. (2013). Variability of venom components in immune suppressive parasitoid wasps: From a phylogenetic to a population approach. *J. Insect Physiol.* 59, 205–212. doi:10.1016/j.jinsphys.2012.10.013.
- Cui, L., Soldevila, A. I., and Webb, B. A. (2000). Relationships between polydnavirus gene expression and host range of the parasitoid wasp *Campoletis sonorensis*. *J. Insect Physiol.* 46, 1397–1407. doi:10.1016/S0022-1910(00)00059-7.
- Dahlman, D. L. (1991). Teratocytes and host/parasitoid interactions. *Biol. Control* 1, 118–126. doi:10.1016/1049-9644(91)90110-L.
- Dorémus, T., Cousserans, F., Gyapay, G., Jouan, V., Milano, P., Wajnberg, E., et al. (2014). Extensive transcription analysis of the *Hyposoter didymator* ichnovirus genome in permissive and non-permissive lepidopteran host species. *PLoS One* 9. doi:10.1371/journal.pone.0104072.
- Dorémus, T., Urbach, S., Jouan, V., Cousserans, F., Ravallec, M., Demetere, E., et al. (2013). 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 Biochem. Mol. Biol.* 43, 292–307. doi:10.1016/j.ibmb.2012.12.010.

- Drezen, J. M., Chevignon, G., Louis, F., and Huguet, E. (2014). Origin and evolution of symbiotic viruses associated with parasitoid wasps. *Curr. Opin. Insect Sci.* 6, 35–43. doi:10.1016/j.cois.2014.09.008.
- Drezen, J. M., Leobold, M., Bézier, A., Huguet, E., Volkoff, A. N., and Herniou, E. A. (2017). Endogenous viruses of parasitic wasps: variations on a common theme. *Curr. Opin. Virol.* 25, 41–48. doi:10.1016/j.coviro.2017.07.002.
- Drezen, J. M., Provost, B., Espagne, E., Cattolico, L., Dupuy, C., Poirié, M., et al. (2003). Polydnavirus genome: Integrated vs. free virus. *J. Insect Physiol.* 49, 407–417. doi:10.1016/S0022-1910(03)00058-1.
- Dupuy, C., Huguet, E., and Drezen, J. M. (2006). Unfolding the evolutionary story of polydnaviruses. *Virus Res.* 117, 81–89. doi:10.1016/j.virusres.2006.01.001.
- Falabella, P., Caccialupi, P., Varricchio, P., Malva, C., and Pennacchio, F. (2006). Protein tyrosine phosphatases of *Toxoneuron nigriceps* Bracovirus as potential disrupters of host prothoracic gland function. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 61, 157–169.
- Farias, J. R., Andow, D. A., Horikoshi, R. J., Sorgatto, R. J., dos Santos, A. C., and Omoto, C. (2016). Dominance of Cry1F resistance in *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) on TC1507 *Bt* maize in Brazil. *Pest Manag. Sci.* 72, 974–979. doi:10.1002/ps.4077.
- Gao, F., Gu, Q., Pan, J., Wang, Z., Yin, C., Li, F., et al. (2016). *Cotesia vestalis* teratocytes express a diversity of genes and exhibit novel immune functions in parasitism. *Sci. Rep.* 6, 26967. doi:10.1038/srep26967.
- Ignesti, M., Ferrara, R., Romani, P., Valzania, L., Serafini, G., Pennacchio, F., et al. (2018). A polydnavirus-encoded ANK protein has a negative impact on steroidogenesis and development. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 95, 26–32. doi:10.1016/j.ibmb.2018.03.003.
- Kim, E., and Kim, Y. (2016). Translational control of host gene expression by a Cys-motif protein encoded in a bracovirus. *PLoS One* 11, 1–22. doi:10.1371/journal.pone.0161661.
- Kim, E., Kim, Y., Yeam, I., and Kim, Y. (2016). Transgenic expression of a viral Cystatin gene *CpBV-CST1* in tobacco confers insect resistance. *Environ. Entomol.* 45, 1322–1331. doi:10.1093/ee/nvw105.
- Nalini, M., and Kim, Y. (2009). Transient expression of a polydnaviral gene, *CpBV15β*, induces immune and developmental alterations of the diamondback moth, *Plutella xylostella*. *J. Invertebr. Pathol.* 100, 22–28. doi:10.1016/j.jip.2008.09.008.
- Pennacchio, F., Caccia, S., and Digilio, M. C. (2014). Host regulation and nutritional exploitation by parasitic wasps. *Curr. Opin. Insect Sci.* 6, 74–79. doi:10.1016/j.cois.2014.09.018.
- Poirié, M., Colinet, D., and Gatti, J.-L. (2014). Insights into function and evolution of parasitoid wasp venoms. *Curr. Opin. Insect Sci.* 6, 52–60. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.cois.2014.10.004.
- Prado, J. R., Segers, G., Voelker, T., Carson, D., Dobert, R., Phillips, J., et al. (2014). Genetically engineered crops: From idea to product. *Annu. Rev. Plant Biol.* 65, 769–790. doi:10.1146/annurev-arplant-050213-040039.
- Pruijssers, A. J., and Strand, M. R. (2007). PTP-H2 and PTP-H3 from *Microplitis demolitor* Bracovirus localize to focal adhesions and are antiphagocytic in insect immune cells. *J. Virol.* 81, 1209–1219. doi:10.1128/JVI.02189-06.

- Schmidt, O. (2006). At the core of parasitoid - host interactions. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 61, 107–109.
- Serbielle, C., Dupas, S., Perdereau, E., Héricourt, F., Dupuy, C., Huguet, E., et al. (2012). Evolutionary mechanisms driving the evolution of a large polydnavirus gene family coding for protein tyrosine phosphatases. *BMC Evol. Biol.* 12. doi:10.1186/1471-2148-12-253.
- Strand, M. R. (2014). Teratocytes and their functions in parasitoids. *Curr. Opin. Insect Sci.* 6, 68–73. doi:10.1016/j.cois.2014.09.005.
- Thompson, S. N. (2001). Parasitism enhances the induction of glucogenesis by the insect, *Manduca sexta* L. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 33, 163–173. doi:10.1016/S1357-2725(00)00079-0.
- Vinson, S. B., and Iwantsch, G. F. (1980). Host regulation by insect parasitoids. *Quartely Rev. Biol.* 55, 143–165.
- Webb, B. A., Strand, M. R., Dickey, S. E., Beck, M. H., Hilgarth, R. S., Barney, W. E., et al. (2006). Polydnavirus genomes reflect their dual roles as mutualists and pathogens. *Virology* 347, 160–174. doi:10.1016/j.virol.2005.11.010.
- Yu, R. xian, Chen, Y. F., Chen, X. xin, Huang, F., Lou, Y. gen, and Liu, S. sheng (2007). Effects of venom/calyx fluid from the endoparasitic wasp *Cotesia plutellae* on the hemocytes of its host *Plutella xylostella* in vitro. *J. Insect Physiol.* 53, 22–29. doi:10.1016/j.jinsphys.2006.09.011.
- Zhang, G., Schmidt, O., and Asgari, S. (2004). A novel venom peptide from an endoparasitoid wasp is required for expression of polydnavirus genes in host hemocytes. *J. Biol. Chem.* 279, 41580–41585. doi:10.1074/jbc.M406865200.

2. ALÉM DA ESPECIFICIDADE DA REGULAÇÃO HOSPEDEIRA: A EXPLORAÇÃO BIOTECNOLÓGICA DA QUITOLECTINA DE *TOXONEURON NIGRICEPS* (VIERECK) (HYMENOPTERA: BRACONIDAE) NO CONTROLE DE ESPÉCIES NÃO-PERMISSIVAS

Resumo

A demanda mundial por alimento em 2100 será 70% maior que a atual, o que exigirá o aumento da produtividade agrícola, com responsabilidades social e ambiental. A busca por novos nichos de exploração biotecnológica a serem utilizadas no campo é, portanto, imprescindível. Apesar da demonstração da eficiência de eventos de transgenia baseados na interação hospedeiro – parasitoide no controle de pragas-alvo, a aplicação prática dos eventos baseada nos mecanismos de regulação hospedeira esbarra na especificidade predita de moléculas bioativas. Assim, o objetivo desse capítulo foi explorar o potencial da quitolectina (*TnQuit*) produzida por teratócitos de *Toxoneuron nigriceps* (Viereck) (Hymenoptera: Braconidae) como evento de transgenia aos hospedeiros não-permissivos *Chrysodeixis includens* (Walker) (Lepidoptera: Noctuidae), *Spodoptera albula* (Walker) (Lepidoptera: Noctuidae), *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae), *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae) e *Bemisia tabaci* (Gennadius) (Hemiptera: Aleyrodidae). Após obtenção de tomateiro Micro-Tom transgênicos e seleção de indivíduos homozigotos, cada evento obtido foi sujeito a análise de qPCR para verificação da expressão do gene *TnQuit*. As pragas-alvo foram submetidas a estudos comparados de biologia em plantas modificadas ou não, sendo os dados obtidos comparados pelo teste *t*-Student ($p < 0,05$) e análise de sobrevivência, utilizando o programa R®. Os ensaios realizados com lagartas de 3º ínstar de *C. includens*, *S. albula* e *S. frugiperda* indicaram aumento da mortalidade e menor probabilidade de progressão do desenvolvimento em plantas geneticamente modificadas. Os índices nutricionais de *S. frugiperda* também foram alterados. Os ensaios com *T. absoluta* indicaram menor viabilidade larval e redução no peso de pupas machos que se desenvolveram sobre plantas transgênicas. O número de adultos de *B. tabaci* foi reduzido por um dos eventos transgênicos. Os eventos de transgenia obtidos apresentaram níveis variados de expressão do gene *TnQuit*, que foram condizentes com os efeitos observados sobre os insetos-praga avaliados. Os efeitos de *TnQuit* obtidos sobre hospedeiros não-permissivos demonstram o potencial de utilização das toxinas produzidas no processo de regulação hospedeira como fonte de novos eventos de transgenia.

Palavras-chave: Biotecnologia; Interação hospedeiro – parasitoide; Manejo sustentável de pragas; Transgenia

Abstract

The world demand for food in 2100 will be 70% higher than the current one, and will require an increase in agricultural production with social and environmental responsibilities. Thus, the search for new niches for biotechnological exploration for the development of new technologies is essential. Despite the efficiency of transgenic events based on host – parasitoid interactions to control target pests, the practical application of events based on mechanisms of host regulation is questioned due to the predicted specificity of bioactive molecules parasitoids produce. Thus, the objective of this chapter was to explore the potential of the chitolectin

(*TnQuit*) produced by the teratocytes of *Toxoneuron nigriceps* (Viereck) (Hymenoptera: Braconidae) as a transgenic event to control the non-permissive hosts *Chrysodeixis includens* (Walker) (Lepidoptera: Noctuidae), *Spodoptera albula* (Walker) (Lepidoptera: Noctuidae), *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae), *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae) and *Bemisia tabaci* (Gennadius) (Hemiptera: Aleyrodidae). After transformation of Micro-Tom tomatoes and selection of homozygous plants, each event was submitted to real time PCR analysis to verify the expression of the *TnQuit* gene. The target pests were submitted to biological comparative studies in transgenic and non-transgenic plants. Data were compared by Student *t*-test ($p < 0.05$) and survival analysis using the R® program. Bioassays carried out with 3rd instar of *C. includens*, *S. albula* and *S. frugiperda* resulted in increased mortality and lower probability of larvae to continue to grow in genetically modified plants. The nutritional indices of *S. frugiperda* were also altered. Data on *T. absoluta* indicated a lower larval viability and reduction in weight of the male pupae on transgenic plants. The number of adults of *B. tabaci* obtained on one of the transgenic events was reduced. The expression of *TnQuit* gene was quite variable in the transgenic events obtained and *TnQuit* expression levels were consistent with the observed effects on the pest insects evaluated. The effects of *TnQuit* on non-permissive hosts demonstrate the potential of using the toxins produced in the host regulation process as a source of new transgenic events.

Keywords: Biotechnology; Host – parasitoid interactions; Sustainable pest management; Transgenesis

3. REGULAÇÃO DO TRANSCRITOMA LARVAL DE *DIATRAEA SACCHARALIS* (F.) (LEPIDOPTERA: CRAMBIDAE) POR FATORES MATERNOS E LARVAIS ASSOCIADOS AO PARASITOIDE *COTESIA FLAVIPES* CAMERON (HYMENOPTERA: BRACONIDAE)

Resumo

Endoparasitoides cenobiontes depositam seus ovos em seus hospedeiros e regulam a fisiologia hospedeira durante seu desenvolvimento para seu próprio benefício, através da utilização de fatores maternos e larvais. Os mecanismos que os parasitoides podem utilizar para subjugar seus hospedeiros interferem diretamente na expressão gênica do hospedeiro. A ampla variedade de tecidos e vias metabólicas que podem ser manipuladas durante o parasitismo dificulta nosso total conhecimento sobre a regulação hospedeira durante o desenvolvimento do parasitoide. Técnicas de sequenciamento de nova geração e transcriptoma *de novo* são ferramentas que possibilitam a exploração de questões amplas, incluindo organismos não-modelos. No presente capítulo, nós utilizamos a plataforma Illumina© para a montagem de um transcriptoma *de novo* de referência da broca-da-cana *Diatraea saccharalis* (F.) (Lepidoptera: Crambidae) e investigamos o processo de regulação da expressão gênica pelo parasitoide *Cotesia flavipes* Cameron (Hymenoptera: Braconidae). O sequenciamento resultou em 174.809.358 leituras que foram processadas e utilizadas para a montagem de 144.116 transcritos. Desse total, 44.325 transcritos foram putativamente identificados como genes de Lepidoptera e representaram grande parte das vias metabólicas descritas para outras espécies de Lepidoptera. A comparação da expressão gênica do hospedeiro entre lagartas não-parasitadas e parasitadas resultou na superexpressão de 1.432 transcritos de *D. saccharalis* durante o parasitismo por *C. flavipes*, enquanto 1.027 transcritos foram inibidos. Análises de expressão gênica também foram realizadas para comparar a expressão gênica do hospedeiro em lagartas não-parasitadas e pseudoparasitadas, levando à identificação de 1.253 transcritos superexpressos e 972 inibidos durante o pseudoparasitismo. A análise de expressão gênica diferencial demonstrou que *C. flavipes* regulou diversas vias metabólicas, como a via de transdução de sinais do Ca^{+2} , a glicólise/gluconeogênese, o metabolismo de quitina, a biossíntese e a degradação de hormônios e o sistema imunológico, permitindo a identificação da regulação de genes importantes para o metabolismo e o desenvolvimento de *D. saccharalis*.

Palavras-chave: Broca da cana-de-açúcar; Expressão gênica; Fisiologia de insetos; Regulação hospedeira

Abstract

Koinobiont endoparasitoids lay their eggs into their hosts and regulate their physiology during their growth and development to their own benefit using an artillery of molecules from maternal, immature and/or derived tissues. The arsenal of tools parasitic wasps can have available to subdue their hosts directly interfere with the host transcription activity. The broad range of tissues and pathways parasitic wasps interfere with are limited by our general understanding on the host regulation process during parasitoid development. Next generation sequencing and *de novo* transcriptome are suitable approaches for broad questioning, including that on non-model organisms. In the present chapter, we used the Illumina sequencing technology to assemble a *de novo* reference transcriptome of the sugarcane borer *Diatraea*

saccharalis (F.) (Lepidoptera: Crambidae) and investigated the process of regulation of gene expression by the larval endoparasitoid *Cotesia flavipes* Cameron (Hymenoptera: Braconidae). We obtained 174,809,358 reads that were trimmed and assembled into 144,116 transcripts. 44,325 of them were putatively identified as lepidopteran-derived genes and represented a substantial number of well described pathways. Comparative transcriptomic analysis of non-parasitized and parasitized larvae identified 1,432 transcripts of *D. saccharalis* that were up-regulated under parasitization by *C. flavipes*, while a set of 1,027 transcripts were down-regulated. Comparative transcriptomic analysis of non-parasitized and pseudoparasitized larvae led to the identification of 1,253 up-regulated transcripts and 972 down-regulated transcripts in larvae of *D. saccharalis*. Analysis of the differentially expressed transcripts demonstrated *C. flavipes* regulated several pathways, such as the Ca^{+2} transduction signaling pathway, glycolysis/gluconeogenesis, chitin metabolism, hormone biosynthesis and degradation, and the immune system, allowing the identification of key target genes involved with the metabolism and development of *D. saccharalis*.

Keywords: Gene expression; Host regulation; Insect physiology; Sugarcane borer

4. TRANSCRITOMA DE *COTESIA FLAVIPES* CAMERON (HYMENOPTERA: BRACONIDAE) E DE SEU VÍRUS DE POLI-DNA DISPERSO DURANTE O DESENVOLVIMENTO NO HOSPEDEIRO *DIATRAEA SACCHARALIS* (F.) (LEPIDOPTERA: CRAMBIDAE)

Resumo

Ao longo da evolução, parasitoides desenvolveram estratégias para a colonização do hospedeiro, como a simbiose mutualística com vírus de DNA dupla fita polidisperso, pertencentes à família Polydnviridae, e a dissociação de teratócitos de seus tecidos embrionários durante seu desenvolvimento. A expressão de fatores de virulência dos PDVs ocorre apenas em seu hospedeiro secundário, onde causam as alterações fisiológicas necessárias ao sucesso do parasitismo, assim como teratócitos e outras secreções larvais ainda pouco estudadas. Assim, esse capítulo teve como objetivo a montagem de um transcrito *de novo* de *Cotesia flavipes* Cameron (Hymenoptera: Braconidae) durante seu desenvolvimento larval e a análise da expressão de genes do bracovírus associado ao parasitoide durante o parasitismo de *Diatraea saccharalis* (F.) (Lepidoptera: Crambidae). Após montagem de 21.186 sequências homólogas à Hymenoptera, identificamos a presença de 286 transcritos virais, principalmente pertencentes à família multigênica *ptp* – proteínas tirosina fosfatases. A contagem de leituras utilizando-se o transcrito *de novo* também resultou na expressão de 30 transcritos, em sua maioria identificadas como proteínas putativas, de forma exclusiva durante o parasitismo, enquanto que a utilização do genoma parcial de *C. flavipes* resultou na identificação de três genes anotados exclusivos ao parasitismo. O parasitoide também apresentou alta expressão de genes durante seu desenvolvimento em lagartas de *D. saccharalis*. Enzimas digestivas, como lipases, trealases e tripsinas foram as mais representadas e podem apresentar papel importante na interação hospedeiro – parasitoide. Enzimas relacionadas às vias hormonais também foram expressas. Os resultados obtidos podem ser seguidos por estudos mais detalhados dos processos fisiológicos da interação *C. flavipes* – *D. saccharalis* e do próprio funcionamento larval do inimigo natural.

Palavras-chave: Análise funcional; Organismos não-modelo; Parasitismo; Polidnavírus; Regulação hospedeira

Abstract

Parasitoids developed a number of strategies for host colonization during evolution, such as the mutualistic symbiosis with polydisperse double-stranded DNA viruses belonging to the Polydnviridae family, and the dissociation of teratocytes upon larval eclosion. The expression of virulence PDV genes occurs only in the secondary host, where PDVs cause the necessary physiological changes to secure the successful host parasitization. Teratocytes and other larval secretions may be important to parasitoid development, but they are not well studied. Furthermore, little is known on parasitoid gene expression during parasitoid development. Thus, this chapter aimed to assemble a *de novo* transcriptome of *Cotesia flavipes* Cameron (Hymenoptera: Braconidae) during their larval development and to carry an analysis of the gene expression of the associated bracovirus during the parasitization of *Diatraea saccharalis* (F.) (Lepidoptera: Crambidae). After the assembly and annotation of 21,186 transcripts homologous or related to Hymenoptera, we identified the presence of 286 viral

transcripts, mainly belonging to the multigenic family *ptp* - protein tyrosine phosphatase. Reads counts against the *de novo* transcriptome resulted in expression of 30 transcripts, mostly identified as putative proteins, while reads counting against the draft genome of *C. flavipes* resulted in the identification of three genes unique to parasitism. Parasitoid gene expression was quite high while developing in *D. saccharalis* parasitized larvae. Digestive enzymes such as lipases, trehalases and trypsins were the most represented in the transcriptome of *C. flavipes*, and such enzymes may play an important role during host – parasitoid interactions. Enzymes belonging to the pathways of hormone synthesis were also identified. Our data on the transcription profile of *C. flavipes* while developing within the host *D. saccharalis*, and the molecular characterization of this non-model organism will certainly allow the development of further studies on the larval development of *C. flavipes* and on the physiological process of the *C. flavipes* - *D. saccharalis* interactions.

Keywords: Functional analysis; Host regulation; Non-model organisms; Parasitism; Polydnavirus

5. O FATOR DE INIBIÇÃO DA TRADUÇÃO HOSPEDEIRA (CFHTIF) DO BRACOVÍRUS ASSOCIADO A *COTESIA FLAVIPES* CAMERON (HYMENOPTERA: BRACONIDAE) COMO EVENTO DE TRANSGENIA PARA O CONTROLE DE HOSPEDEIROS NÃO-PERMISSIVOS

Resumo

O desenvolvimento de tecnologias empregadas em Programas de Manejo de Pragas concentrou sua atenção, nas últimas décadas, para a transgenia de plantas, utilizando, principalmente, genes *cry*, isolados de linhagens da bactéria *Bacillus thuringiensis*. O uso de plantas transgênicas *Bt*, porém, pode ser limitado devido ao número de genes que ainda podem ser explorados e à viabilidade dos eventos já utilizados, cuja vida útil tem sido cada vez menor. A limitação no número de genes *Bt* e a evolução da resistência de insetos motiva a ampliação de estudos em outros sistemas e tecnologias, como a busca por novos eventos no processo de regulação hospedeira das interações hospedeiro – parasitoide. Dessa forma, esse capítulo teve por objetivo utilizar o gene “*host translation inhibitory factor III*” do bracovírus associado a *Cotesia flavipes* Cameron (Hymenoptera: Braconidae) como evento de transgenia em tomateiro, para avaliar o seu efeito como evento transgênico na sobrevivência e no desenvolvimento larval e utilização do alimento pelos hospedeiros não-permissivos *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) e *Spodoptera albula* (Walker) (Lepidoptera: Noctuidae). Após obtenção de tomateiro Micro-Tom transgênico e seleção de indivíduos homozigotos, lagartas de *S. albula* e *S. frugiperda* foram submetidas a estudos de biologia comparada em plantas transgênicas e controle, sendo os dados obtidos comparados pelo teste *t*-Student ($p < 0,05$) e análise de sobrevivência, utilizando o programa R®. Os eventos transgênicos com o gene *CfHTIF* testados não apresentaram efeitos sobre a sobrevivência e o tempo de desenvolvimento de lagartas de *S. frugiperda*, mas influenciaram o tempo de desenvolvimento de lagartas de *S. albula*. Entretanto, a utilização do alimento por *S. albula* e *S. frugiperda* foi alterada em plantas transformadas com *CfHTIF*. Lagartas de terceiro ínstar de *S. frugiperda* que se alimentaram em plantas transgênicas ganharam mais peso, ingeriram maior quantidade de alimento e apresentaram taxa de consumo relativo (RCR) superior àquele de lagartas que se alimentaram em plantas controle. Lagartas de terceiro ínstar de *S. albula* apresentam redução significativa nas eficiências de conversão do alimento digerido (ECD) e ingerido (ECI) quando se alimentando em plantas transgênicas, demonstrando um efeito negativo em potencial sobre essa espécie.

Palavras-chave: Interação hospedeiro – parasitoide; Manejo sustentável de pragas; Polidnavírus; Transgenia

Abstract

The development of tactics for Pest Management Programs has focused on the use of transgenic plants, mainly those using *cry* genes from the entomopathogenic bacterium *Bacillus thuringiensis*. However, the use of *Bt*-plants is limited due to the number of effective *cry* genes available and the evolution of insect resistance. Such pitfalls motivate the search for and development of studies using other systems and technologies, such as the exploration of the process of host regulation from host – parasitoid interactions as a source of new transgenic events. Thus, this chapter aimed to evaluate the potential of the bracoviral gene *host translation inhibitory factor III* associated to *Cotesia flavipes* Cameron (Hymenoptera: Braconidae) as a

transgenic event in tomato plants to evaluate the potential use of this gene to affect the survival and development of the non-permissive hosts *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) and *Spodoptera albula* (Walker) (Lepidoptera: Noctuidae). After transformation Micro-Tom tomato plants (CfHTIF-plants) and selection of homozygous events of transformation, larvae of *S. albula* and *S. frugiperda* were submitted to biological comparative studies in CfHTIF-plants and non-transgenic plants. Data were compared using Student *t*-test ($p < 0.05$) and survival analysis. All statistical procedures were done using the R® program. No differences in larval survival and development of observed to *S. albula* and *S. frugiperda* were detected when comparing CfHTIF-plants and non-transgenic plants. However, food utilization by *S. albula* and *S. frugiperda* was altered on CfHTIF-plants. Third instar of *S. frugiperda* larvae feeding on CfHTIF-plants gained more weight, ingested more food and presented a higher relative consumption rate (RCR) than the larvae fed on control plants. But third instar of *S. albula* presented reduced efficiency of conversion of the digested (ECD) and ingested (ECI) food when feeding on transgenic plants, demonstrating a potential negative effect on this species.

Keywords: Host – parasitoid interactions; Polydnavirus; Sustainable pest management; Transgenesis