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

**A interação *Wolbachia* - *Trichogramma galloi* Zucchi, 1988 (Hymenoptera:
Trichogrammatidae)**

Amanda Rodrigues de Souza

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

**Piracicaba
2011**

Amanda Rodrigues de Souza
Engenheiro Agrônomo

**A interação *Wolbachia* - *Trichogramma galloi* Zucchi, 1988 (Hymenoptera:
Trichogrammatidae)**

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

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

Piracicaba
2011

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

Souza, Amanda Rodrigues de
A interação *Wolbachia* - *Trichogramma galloi* Zucchi, 1988 (Hymenoptera:
Trichogrammatidae) / Amanda Rodrigues de Souza. - - Piracicaba, 2011.
63 p. : il.

Dissertação (Mestrado) - - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", 2011.

1. Bactérias 2. Brocas (Insetos nocivos) 3. Cana-de-açúcar 4. Controle biológico
5. Hymenoptera 6. Insetos parasitóides 7. Simbiose I. Título

CDD 595.79
S729i

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

*"É melhor tentar e falhar,
que preocupar-se e ver a vida passar;
é melhor tentar, ainda que em vão,
que sentar-se fazendo nada até o final.*

*Eu prefiro na chuva caminhar,
que em dias tristes em casa me esconder.
prefiro ser feliz, embora louco,
que em conformidade viver ..."*

Martin Luther King

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus por ter me dado força e paciência em mais uma caminhada;

Ao Prof. Dr. Fernando Luis Cònsoli pela orientação, ensinamentos e sugestões;

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPQ) por ter concedido a bolsa de estudos;

À Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” pela estrutura disponibilizada para o desenvolvimento do trabalho;

Aos professores do Departamento de Entomologia e Acarologia, ESALQ/USP, pelos ensinamentos e competência; e aos servidores, em especial à Regina Moraes, Marta Colletti, Carolina Jorge, e ao Carlos Judice e Carlos Castilho, pela prontidão em ajudar;

Ao Centro de Tecnologia Canavieira (CTC) pela parceria e, em especial, ao Engenheiro Agrônomo Luiz Carlos de Almeida, que teve colaboração fundamental para a realização deste trabalho, e à técnica Sueli Aparecida, pelo fornecimento de material;

Ao Rafael Moral pelo auxílio nas análises estatísticas e discussões;

Aos colegas e usuários do Laboratório de Interações em Insetos, Aline Peruchi, Luís Gustavo Almeida, Fábio Dossi, Priscila Fortes, Simone Prado, Tiago Zucchi, Karina Lucas Silva-Brandão, Fernanda Muller, Felipe Domingues, Danielle Thomazzoni, Amanda Oliveira, Gustavo Torelli e Helen Breyer, agradeço a todos pelos momentos de descontração. Agradecimentos especiais à Aline Guidolin e ao Guilherme Rossi pelo auxílio nos procedimentos práticos e pelas discussões diante das dificuldades encontradas nesse trabalho;

A todos do Laboratório de Taxonomia de Insetos, Prof. Dr. Roberto Zucchi, Prof. Dr. Sinval Silveira Neto e, em especial, a Gleidyane Novais pelo apoio e ajuda;

Ao pessoal do Laboratório de Biologia de Insetos, em especial, Leandro Delalibera, Lucila Wadt e a técnica Neide pelo fornecimento de material biológico para desenvolvimento dos experimentos;

À Profa. Dra Ranyse Querino pela amizade, presteza e constante apoio na minha formação acadêmica;

Aos meus familiares pelo apoio e aos meus amigos Ingrid Dourado, Rodrigo Diniz e Márcia Franco que, mesmo distantes, me incentivaram;

À minha família Piracicabana, cujos membros sempre estiveram presentes nessa etapa. À Daniela Pinheiro pelo incentivo e sugestões, e principalmente, à Jaci Mendes pela força e ajuda constante na longa convivência com os insetinhos e ao Marcos Cunha pelo apoio e paciência. Agradeço, em especial, a vocês três, pela amizade e pelos momentos de muitas alegrias compartilhados durante nossa convivência.

SUMÁRIO

RESUMO	9
ABSTRACT	11
LISTA DE TABELAS.....	13
1 INTRODUÇÃO.....	15
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	17
2.1 Simbiontes em insetos	17
2.2 <i>Wolbachia</i>	19
2.3 Efeitos no hospedeiro induzidos por <i>Wolbachia</i>	21
2.3.1 Feminização de machos.....	21
2.3.2 Morte de machos	22
2.3.3 Incompatibilidade citoplasmática	22
2.3.4 Partenogênese telítica	23
2.4 Infecção de <i>Trichogramma</i> por <i>Wolbachia</i>	24
3 MATERIAL E MÉTODOS	29
3.1 Detecção de infecções naturais de <i>Wolbachia</i> em <i>Trichogramma galloi</i>	29
3.2 Análises moleculares	29
3.2.1 Extração de DNA genômico	29
3.2.2 Detecção de <i>Wolbachia</i>	30
3.2.3 Clonagem	30
3.2.4 Caracterização da linhagem de <i>Wolbachia</i>	31
3.3 Produção de isolinhagens aposimbiontes	32
3.4 Cruzamentos biológicos entre indivíduos infectados e livres de <i>Wolbachia</i>	32
3.5 Avaliação da interação <i>Wolbachia</i> – <i>Trichogramma galloi</i>	33
3.6 Efeito da associação com <i>Wolbachia</i> na resposta de <i>T. galloi</i> ao estresse térmico	33
3.6.1 Efeito da duração do estresse térmico na sobrevivência e longevidade de fêmeas	33
3.6.2 Efeito do estresse térmico na aptidão reprodutiva.....	34
3.7 Análises estatísticas	34
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	37
4.1 Detecção de infecções naturais de <i>Wolbachia</i> em <i>Trichogramma galloi</i>	37

4.2 Cruzamentos biológicos entre indivíduos infectados e livres de <i>Wolbachia</i>	37
4.3 Avaliação da infecção por <i>Wolbachia</i> na aptidão biológica de <i>Trichogramma galloi</i>	39
4.4 Efeito da associação com <i>Wolbachia</i> na resposta de <i>T. galloi</i> ao estresse térmico	41
4.4.1 Efeito da duração do estresse térmico na sobrevivência e longevidade de fêmeas.....	41
4.4.2 Efeito do estresse térmico na aptidão reprodutiva.....	43
5 CONCLUSÕES	47
REFERÊNCIAS	49

RESUMO

A interação *Wolbachia* - *Trichogramma galloi* Zucchi, 1988 (Hymenoptera: Trichogrammatidae)

Wolbachia é uma α -Proteobacteria transmitida transovarianamente, comum a diversas espécies de insetos. Este simbiote é conhecido pela habilidade em explorar os sistemas reprodutivos de seus hospedeiros, induzindo alterações no modo de reprodução dos mesmos, como a indução de incompatibilidade citoplasmática, telitoquia, feminização e morte de machos, favorecendo, assim, sua própria disseminação na população hospedeira. Em Hymenoptera e outros insetos haplodiplóides, machos haplóides são produzidos a partir de ovos não-fecundados; porém, quando infectados por linhagem de *Wolbachia* indutora de telitoquia, produzem apenas fêmeas. Os parasitoides de ovos do gênero *Trichogramma* são muito utilizados no controle biológico aplicado e são comumente associados a *Wolbachia*. No Brasil, *Trichogramma galloi* Zucchi, 1988 (Hymenoptera: Trichogrammatidae) se destaca como o principal parasitoide de ovos de *Diatraea saccharalis* (Fabr., 1794) (Lepidoptera: Crambidae), sendo inúmeras as iniciativas para a sua utilização em programas de controle biológico aplicado desta praga. Dada a importância destes inimigos naturais no combate aos insetos-praga e aos efeitos na reprodução e aptidão biológica induzidos pela associação com *Wolbachia*, este estudo investigou a interação *Wolbachia* – *T. galloi* (Hymenoptera: Trichogrammatidae) que, até o momento, era desconhecida. A ocorrência de *Wolbachia* associada a *T. galloi* foi avaliada em amostragens de duas populações naturais deste inimigo natural, Iracemápolis e Lençóis Paulista. Posturas coletadas de ambas populações indicaram a ocorrência de 15% e 33% de fêmeas infectadas por *Wolbachia*, respectivamente, em Iracemápolis e Lençóis Paulista. A emergência de machos em ambas populações indica para o fato de que a infecção não estava fixada na população. Isolinhagens irmãs de *T. galloi* da população de Lençóis Paulista, contendo (W^+) ou não (W^-) *Wolbachia*, foram estabelecidas em laboratório após tratamento com antibiótico para se verificar a relação existente nesta associação. A relação de simbiose estabelecida foi verificada após avaliação de inúmeros parâmetros biológicos e da resistência das isolinhagens ao estresse térmico. A análise comparativa indicou que a eliminação de *Wolbachia* influenciou a longevidade de adultos e o número de parasitoides depositados por ovo do hospedeiro, mas não foi observado efeito na fecundidade ou razão sexual. Fêmeas W^+ e fêmeas W^- reduziram a longevidade com o aumento da exposição ao choque térmico, mas, fêmeas W^+ foram menos longevas do que W^- . A fecundidade também foi afetada pela exposição prolongada (6 h), independente da infecção.

Palavras-chave: Simbiote; Aptidão biológica; Parasitoides de ovos; *Diatraea saccharalis*; Controle biológico

ABSTRACT

The interaction of *Wolbachia* - *Trichogramma galloi* Zucchi, 1988 (Hymenoptera: Trichogrammatidae)

Wolbachia is a common α -proteobacterium in insects, which is transmitted transovarially. This symbiont is known for its ability to explore the reproductive system of their hosts through several alterations that lead to cytoplasmic incompatibility, thelytoky, feminization and death of males, to favour its own spread in the host population. In Hymenoptera and other haplodiploid insects, males are produced from non-fertilized eggs, but when infected by a strain of *Wolbachia* that induces thelytoky, only females will be produced. *Trichogramma* are egg parasitoids that are widely used in augmentative biological control and are commonly associated with *Wolbachia*. In Brazil, *Trichogramma galloi* Zucchi, 1988 (Hymenoptera: Trichogrammatidae) stands out as the main parasitoid of eggs of *Diatraea saccharalis* (Fabr., 1794) (Lepidoptera: Crambidae), and a number of initiatives for their use in applied biological control programs of this pest. The importance of *T. galloi* as a natural enemy of *D. saccharalis* and the alterations *Wolbachia* may induce on the reproduction and fitness of their hosts, require for studies on the association *Wolbachia* - *T. galloi*. The association of *Wolbachia* with *T. galloi* was evaluated in two samples of natural populations of *D. saccharalis*, one from Iracemápolis and another from Lençóis Paulista. Egg masses collected from both populations indicated the occurrence of 15% and 33% of females infected by *Wolbachia*, respectively, from Iracemápolis and Lençóis Paulista. However, the emergence of males from both populations indicated the infection was not fixed. *Wolbachia*-infected (W^+) or *Wolbachia*-cured (W^-) sister lines of *T. galloi* were produced from specimens from the population of Lençóis Paulista to carry further on this association. Comparative biological studies and the sensitivity to short-term heat stress between W^+ and W^- sister lines was assessed to check for the effects of *Wolbachia* on *T. galloi*. Biological comparative analysis indicated that the elimination of *Wolbachia* enhanced adult longevity and the number of parasitoids developing per host egg, but no effect on life time fecundity or sex ratio was observed. W^+ and W^- females had a decreased longevity as the exposure to the heat shock increased, but W^+ females lived much shorter than the W^- ones. Females fecundity was also affected by the prolonged (6 h) exposure to a high temperature, regardless their infection status.

Keywords: Symbionts; Fitness; Egg parasitoids; *Diatraea saccharalis*; Biological control

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Fecundidade (nº de ovos/fêmea), fertilidade e razão sexual (Média ± EP) obtidos de cruzamentos de indivíduos de <i>Trichogramma galloi</i> infectados (W ⁺) e não-infectados (W ⁻) por <i>Wolbachia</i> (25±1°C; 60±10% UR; fotofase de 14h).....	38
Tabela 2 -	Parâmetros biológicos (Média ± EP) de <i>Trichogramma galloi</i> infectados (W ⁺) e não-infectados (W ⁻) por <i>Wolbachia</i> criados em ovos de <i>Diatraea saccharalis</i> (25±1°C; 60±10% UR; fotofase de 14h).....	40
Tabela 3 -	Sobrevivência inicial (%) (Média ± EP) de fêmeas de <i>Trichogramma galloi</i> , infectadas (W ⁺) e não-infectadas (W ⁻) por <i>Wolbachia</i> , após estresse térmico a 36°C por diferentes períodos e posteriormente mantidas em condições controladas (25±1°C; 60±10% UR; fotofase de 14h).....	41
Tabela 4 -	Longevidade (Média ± EP) de fêmeas de <i>Trichogramma galloi</i> , infectadas (W ⁺) e não-infectadas (W ⁻) por <i>Wolbachia</i> , após estresse térmico a 36°C por diferentes períodos e posteriormente mantidas em condições controladas (25±1°C; 60±10% UR; fotofase de 14h).....	42
Tabela 5 -	Longevidade (Média ± EP) de fêmeas de <i>Trichogramma galloi</i> infectadas (W ⁺) e não-infectadas (W ⁻) por <i>Wolbachia</i> criadas em ovos de <i>Diatraea saccharalis</i> (25±1°C; 60±10% UR; fotofase de 14h) após estresse térmico a 36°C por 2 h e 6 h.....	44
Tabela 6 -	Fecundidade (nº de ovos/fêmea) (Média ± EP) por fêmeas de <i>Trichogramma galloi</i> infectadas e não-infectadas por <i>Wolbachia</i> criadas em ovos de <i>Diatraea saccharalis</i> (25±1°C; 60±10% UR; fotofase de 14h) após estresse térmico a 36°C por 2h e 6h.....	44

1 INTRODUÇÃO

Bactérias do gênero *Wolbachia* são microrganismos intracelulares presentes em inúmeras espécies de invertebrados, especialmente artrópodes (WERREN, 1997), as quais podem ser transmitidas vertical ou horizontalmente (WERREN; O'NEILL, 1997). Estudos com base na variação dos genes 16S rDNA, *ftsZ* e *wsp* permitiram a divisão do gênero *Wolbachia* em supergrupos, designados à medida que novos hospedeiros eram descobertos (O'NEILL et al., 1992; WERREN; ZHANG; GUO, 1995; ZHOU; RUSSET; O'NEILL, 1998). Contudo, novas ferramentas foram estabelecidas, como a técnica de tipagem pelo sequenciamento de múltiplos locos ("Multilocus Sequence Typing" - MLST), a qual utiliza cinco genes, além do gene *wsp*, para caracterizar as linhagens de *Wolbachia*, obtendo maior precisão na identificação, além de fornecer dados para novos estudos (BALDO et al., 2006). Assim, *Wolbachia* é hoje distribuída em 11 supergrupos distintos, nomeados de A–K (ROS et al., 2009).

Wolbachia é o microrganismo mais importante associado à modulação da determinação sexual em insetos. Além de manipular o processo reprodutivo, essa bactéria também pode influenciar diversos parâmetros biológicos, resultando em alterações relevantes na aptidão biológica de seus hospedeiros (MIN; BENZER, 1997; DOBSON et al., 2002; FRY, PALMER; RAND, 2004; HARCUMBE; HOFFMANN, 2004). Porém, o efeito desse simbiote na aptidão do hospedeiro é dependente da composição genética do mesmo e da linhagem de *Wolbachia* associada (REYNOLDS; THOMSON; HOFFMANN, 2003; DEAN, 2006). *Wolbachia* também pode influenciar a relação de seu hospedeiro com outros níveis tróficos, afetando o metabolismo de ferro (KREMER et al., 2009), a capacidade do mesmo a responder a patógenos (RELMAN, 2008; MOREIRA et al., 2009; KAMBRIS et al., 2009, BIAN et al., 2010) e a localizar hospedeiros (PENG et al., 2008). A interação desse simbiote com seus hospedeiros ainda pode influenciar a resistência dos mesmos a diferentes fontes de estresse, como temperatura e pesticidas (MONTLLOR et al., 2002; BERTICAT et al., 2002). Em casos em que a relação de simbiose *Wolbachia* – hospedeiro se aproxima do mutualismo, essa bactéria pode se tornar essencial para garantir a produção de ovos ou o crescimento e desenvolvimento normais de seus hospedeiros (DEDEINE et al., 2001; STEVENS et al., 2001; HOSOKAWA et al., 2010).

A manipulação do processo reprodutivo é vista pela expressão de um dos fenótipos induzidos no hospedeiro devido à sua associação com *Wolbachia*, como a telitoquia, a

feminização de machos, a morte de machos ou a incompatibilidade citoplasmática (WERREN, 1997).

A telitoquia é comum em himenópteros, dentre os quais se destacam os parasitoides de ovos *Trichogramma*. Estes parasitoides são os agentes de controle biológico mais utilizados no combate de insetos-praga, principalmente Lepidoptera (PARRA; ZUCCHI, 2004). No Brasil, *Trichogramma galloi* Zucchi, 1988 (Hymenoptera: Trichogrammatidae) se destaca como o principal parasitoide de ovos de *Diatraea saccharalis* (Fabr., 1794) (Lepidoptera: Crambidae), uma das mais importantes pragas da cultura canavieira (ZUCCHI; MONTEIRO 1997; BOTELHO 1997; LIMA FILHO, LIMA, 2001), sendo, hoje, utilizado em programas de controle biológico desta praga em cerca de 300 mil hectares (PARRA; ZUCCHI, 2008).

A interação parasitoide-simbiontes tem sido investigada em várias associações, muitas delas envolvendo *Trichogramma* (STOUTHAMER et al., 1990; PINTO; STOUTHAMER, 1994; STOUTHAMER, 1997; ALMEIDA; LENTEREN; STOUTHAMER, 2010). Entretanto, a relação *T. galloi* - *Wolbachia* é completamente desconhecida. Assim, dados os efeitos conhecidos de *Wolbachia* na biologia de seus hospedeiros, os quais podem ser benéficos (GIRIN; BOULETREAU, 1995; STOLK; STOUTHAMER, 1996; HARIRI et al., 1998; VAVRE et al., 1999) ou prejudiciais (HOFFMANN et al., 1990; STOUTHAMER; LUCK, 1993; STOUTHAMER et al., 1994; HORJUS; STOUTHAMER, 1995), e a importância desse parasitoide de ovos no controle biológico de *D. saccharalis*, este trabalho visa identificar a relação de simbiose estabelecida na interação *T. galloi* - *Wolbachia*, verificando i) a ocorrência de infecções em populações naturais; ii) o efeito da eliminação do simbiote na aptidão biológica do parasitoide e iii) a tolerância do hospedeiro ao estresse térmico. Estes estudos permitirão verificar se a associação *T. galloi* – *Wolbachia* resulta em uma interação neutra, benéfica ou prejudicial ao inimigo natural, o que poderia direcionar o processo de seleção de linhagens infectadas do parasitoide para sua utilização em programas de controle biológico, pois, a utilização linhagens telítocas de *Trichogramma* beneficiaria o processo de produção massal desses inimigos naturais, dada a redução nos custos de produção (STOUTHAMER, 1993).

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Simbiontes em insetos

Entre os seres vivos ocorrem diversas associações, sendo que entre os artrópodes, a associação de simbiontes a insetos permitiu a estes invertebrados a diversificação de seus hábitos alimentares e a exploração de fontes nutricionais restritas quanto à presença e abundância de nutrientes essenciais, o que contribui para seu sucesso adaptativo. Com isso, insetos se associaram a fungos, leveduras, protistas e/ou bactérias, os quais apresentam hábito extra (interna ou externamente ao hospedeiro) ou endocelular, estabelecendo relações de simbiose das mais diversificadas (TANAKA; KAYA, 1993; BOURTZIS; MILLER, 2003). Essas associações, quando estabelecidas, não são necessariamente estáticas (WEEKS et al., 2007), podendo ser do tipo mutualismo, comensalismo, competição ou parasitismo (KLEPZIG et al., 2009).

Estudos realizados com insetos mostram que os simbiontes estão envolvidos com vários processos fisiológicos do hospedeiro. Dentre os benefícios resultantes ao hospedeiro da associação a simbiontes, encontram-se a proteção contra inimigos naturais (OLIVER et al., 2003), tolerância ao estresse térmico, pesticidas (MONTLLOR et al., 2002; BERTICAT et al., 2002), especialização hospedeiro-planta (TSUCHIDA et al., 2004), compensação da perda de endossimbiontes primários (KOGA et al., 2003), e interferência na reprodução (ENGELSTADTER et al., 2008), o qual parece ser o efeito mais investigado, pois têm consequências na dinâmica populacional dos hospedeiros.

Os simbiontes podem ser transmitidos via vertical ou horizontal (KORB; AANEN, 2003). Dependendo da história evolutiva com o hospedeiro, os simbiontes se dividem em dois grupos: primários/obrigatórios e secundários/facultativos, e podem estar localizados desde o espaço extracelular do intestino até o citoplasma de células especializadas do hospedeiro (THAO; BAUMANN, 2004).

Os simbiontes primários estão, geralmente, restritos ao citoplasma de um tipo celular chamado bacteriócito (THAO; BAUMANN, 2004). Esses microrganismos são transmitidos maternalmente, e essa associação é necessária tanto ao inseto quanto ao simbionte (DOUGLAS, 1989). No processo de evolução dessa relação de mutualismo, ocorreu a redução do genoma dos simbiontes, fenômeno comum às bactérias obrigatoriamente associadas a eucariotos

(BAUMANN, 2005). Neste contexto, pode-se citar a interação de mutualismo entre *Buchnera* e os afídeos. Essa bactéria é transmitida para o embrião durante a maturação do aparelho reprodutor feminino, sendo a responsável pelo fornecimento de aminoácidos essenciais ao hospedeiro, os quais se encontram em quantidade reduzida no floema das plantas utilizadas como fonte de alimento pelo inseto. Em troca, o simbiote obtém aminoácidos não-essenciais via seu hospedeiro (BAUMANN et al., 1995).

Os simbioses secundários não são restritos aos bacteriócitos, podendo ser de vida livre ou se distribuir por diversos tipos de células hospedeiras, e não são obrigatórios ao desenvolvimento e reprodução do hospedeiro. Estes simbioses podem influenciar diversos aspectos biológicos, por exemplo, podendo estar relacionado à resistência a fungos e inimigos naturais (SCARBOROUGH et al., 2005; OLIVER et al., 2003). Porém, a função de grande parte dos simbioses secundários conhecidos é obscura. Entretanto, sabe-se que estes simbioses não efetuam funções essenciais para a sobrevivência de seus hospedeiros (BAUMANN, 2005).

Dentre as associações entre os seres vivos e microrganismos, as bactérias têm sido reconhecidas como importantes componentes da biologia de artrópodes, pois, além de relações de mutualismo, várias outras bactérias adquiridas são conhecidas por atuarem como parasitas reprodutivos ou como simbioses secundários (DURON et al., 2008).

O interesse pelos microrganismos que manipulam a reprodução do hospedeiro tem crescido consideravelmente. Neste contexto, pode-se citar o endossimbiote *Wolbachia*. Essa bactéria tem-se destacado devido à sua ampla distribuição e impacto na ecologia, evolução e biologia reprodutiva de seus hospedeiros (STOUTHAMER, BREEUWER; HURST, 1999; WERREN, 1997). Outra bactéria que tem recebido atenção é *Cardinium*, a qual é encontrada em menor frequência que *Wolbachia* (WEEKS; VELTEN; STOUTHAMER, 2003). Estas são apenas duas de muitas bactérias que atuam como parasitas reprodutivos que vem sendo investigadas.

O fato dos simbioses serem tema de várias pesquisas, aliado à modernização das técnicas moleculares e estudos filogenéticos, está contribuindo para a expansão dos conhecimentos sobre as associações de simbiose. No entanto, ainda são necessários estudos no sentido de estabelecer com precisão as funções desempenhadas por esses microrganismos no ambiente hospedeiro.

2.2 *Wolbachia*

Wolbachia é uma α -Proteobacteria pertencente à Ordem Rickettsiales. Em 2001, Dumler e colaboradores propuseram a reorganização dos membros pertencentes à Ordem Rickettsiales, incluindo o gênero *Wolbachia* na Família Anaplasmataceae. São bactérias Gram-negativas, intracelulares obrigatórias, cujas características morfológicas são a presença de membrana celular envolta pela parede celular, circundadas por uma terceira membrana provinda da membrana celular do hospedeiro, e grande número de ribossomos (VORONIN et al., 2004). Foi detectada pela primeira vez em 1924, por Hertig e Wolbach, em células do tecido reprodutivo do mosquito *Culex pipiens*, causando incompatibilidade citoplasmática, sendo, posteriormente, denominada *Wolbachia pipientis* em homenagem a um de seus descobridores (YEN; BARR, 1971).

As bactérias do gênero *Wolbachia* podem ser herdadas maternalmente (transmissão vertical), ou podem ser transmitidas entre táxons (transmissão horizontal) (BRAIG et al., 1994; BOUCHON et al., 1998; CORDAUX et al., 2001). O modo vertical consiste na transferência da bactéria por meio da fêmea infectada para sua progênie. Entretanto, a habilidade de *Wolbachia* invadir populações hospedeiras não explica o alto número de espécies infectadas. Sendo assim, a ampla distribuição dessa bactéria em artrópodes pode ser explicada pela ocorrência da transmissão horizontal, a qual parece ocorrer frequentemente, podendo ser exemplificada pela sua transmissão de *Drosophila simulans* (hospedeiro) a *Leptopillina boulandi* (parasitoide) (WERREN; O'NEILL, 1997; HEATH et al., 1999).

Estudos filogenéticos iniciais baseados na variação de nucleotídeos dos genes 16S do rDNA, *ftsZ* e *wsp*, dividiram o clado *Wolbachia* em supergrupos (O'NEILL et al., 1992; WERREN; ZHANG; GUO, 1995; ZHOU; RUSSET; O'NEILL, 1998), sendo proposto em 2002, os supergrupos E e F, totalizando seis supergrupos descobertos (LO et al., 2002). Contudo, novas técnicas moleculares foram desenvolvidas, tal como a tipagem pela sequência de múltiplos locos ("Multilocus Sequence Typing" - MLST), a qual utiliza cinco genes (*coxA*, *fbpA*, *hcpA*, *gatB* e *ftsZ*). A combinação dos alelos para cada um dos cinco locos estudados produz uma identificação específica (ST) da linhagem de *Wolbachia* presente (BALDO et al., 2006). Dessa forma, o avanço de ferramentas moleculares possibilitou a definição de novos supergrupos e linhagens, elevando o número de supergrupos desse clado para 11 (denominados A–K) (ROS et al., 2009).

Com o desenvolvimento da tipagem por MLST foi possível a caracterização mais precisa das linhagens de *Wolbachia* e o desenvolvimento de novos estudos (BALDO et al., 2007). Contudo, as análises filogenéticas mantêm que os supergrupos dessa bactéria pertencem a um grupo monofilético, sendo os supergrupos C e D comumente encontrados em nematóides (BAZZOCHI et al., 2000), enquanto que os outros grupos estão distribuídos entre os artrópodes, com os supergrupos A e B, sendo os mais comuns em insetos (WERREN et al., 2008).

A diversidade de supergrupos e linhagens encontradas com os estudos moleculares não são surpreendentes, visto que essa bactéria causa uma ampla variedade de fenótipos, é distribuída em diferentes filos e encontra-se tanto em tecidos reprodutivos, quanto em tecidos somáticos de seus hospedeiros (WERREN, 1997; DOBSON et al., 1999). Em alguns casos, a infecção de tecidos não-reprodutivos, como o nervoso e o muscular, podem causar sérias anormalidades, além de reduzir drasticamente o tempo de vida de adultos (MIN; BENZER, 1997).

Estudos comprovaram que *Wolbachia* infecta praticamente todos os grupos em Arthropoda (WERREN et al., 1995) e algumas espécies em Nematoda (BANDI et al., 1998; TAYLOR; HOERAUF, 1999). Existem registros de infecção de 17% a 76% de espécies em Insecta (JEYAPRAKASH; HOY, 2000; PLANTARD et al., 1999; WENSELEERS et al., 1998; WERREN et al., 1995; WERREN; WINDSOR, 2000), e de 61% em Crustacea, mais especificamente em Oniscidea (BOUCHON et al., 2008) e Chelicerata (BREEUWER; JACOBS, 1996; GOTOH et al., 2003; ROWLEY et al., 2004). Esta diversidade de hospedeiros revela a capacidade de adaptação de *Wolbachia* a diferentes organismos (RIGAUD, 1999).

A proporção de espécies infectadas por *Wolbachia* varia substancialmente entre as pesquisas. Hilgenboecker e colaboradores (2008) estimaram que 66% das espécies de insetos possuem *Wolbachia*, sendo Diptera (WERREN; JAENIKE, 1995) e Hymenoptera (vespas e formigas) (WENSELEERS et al., 1998), os mais frequentemente infectados.

A prevalência das infecções de *Wolbachia* na maioria dos insetos está associada à sua capacidade de manipular a reprodução e a razão sexual de seus hospedeiros, caracterizando-a como parasita reprodutivo. Além de alterar a biologia de seus hospedeiros, este simbiote secundário pode influenciar a nutrição, locomoção e, em alguns casos, beneficiar a competição interespecífica (BROWNLIE et al., 2007). *Wolbachia* pode induzir vários fenótipos em insetos, dependendo da linhagem da bactéria e do genótipo do hospedeiro (HARRIS et al., 2010).

2.3 Efeitos no hospedeiro induzidos por *Wolbachia*

Como visto anteriormente, *Wolbachia* é encontrada em íntima associação com tecidos do hospedeiro, sendo transmitida maternalmente para a prole. Essa bactéria utiliza como estratégia de disseminação a produção de fêmeas, distorcendo a razão sexual da prole em favor das mesmas. Entretanto, a presença de um grande número de bactérias infectando as células hospedeiras, germinativas e/ou somáticas, implica na existência de custo fisiológico aos hospedeiros (STOUTHAMER et al., 1999), embora pouco se conheça sobre os efeitos diretos de *Wolbachia* na aptidão biológica dos hospedeiros.

Sabe-se que as associações de microrganismos a insetos podem ou não exercer efeito sobre o hospedeiro. No caso de *Wolbachia*, esta bactéria interfere no processo reprodutivo por expressar um ou mais dos seguintes efeitos: feminização (ROUSSET et al., 1992), morte de machos (HURST et al., 1999), incompatibilidade citoplasmática (YEN; BARR, 1971) e indução de telitoquia (ROUSSET et al., 1992; STOUTHAMER et al., 1993). Pode, ainda, influenciar a fecundidade e fertilidade (MIN; BENZER, 1997; DOBSON; RATTANADECHAKUL, 2001), aumentar o sucesso de acasalamento por meio de competição de esperma (WADE; CHANG, 1995), causar a completa dependência para produção de ovos em seus hospedeiros (DEDEINE et al., 2001; STEVENS et al., 2001) e o desenvolvimento normal do hospedeiro (HOSOKAWA et al., 2010), resistência à estresse (MONTLLOR et al., 2002; BERTICAT et al., 2002) e combate a patógenos (RELMAN, 2008; MOREIRA et al., 2009; KAMBRIS et al., 2009; BIAN et al., 2010).

2.3.1 Feminização de machos

A feminização de machos ocorre via supressão das glândulas androgênicas, tornando machos geneticamente determinados em fêmeas funcionais (WERREN, 1997). A feminização de machos era restrita a alguns crustáceos (RIGAUD, 1997), mas já há relatos de sua ocorrência também em insetos, como os lepidópteros *Ostrinia furnacalis* (KAGEYAMA et al., 2002) e *Ostrinia scapularis* (Lepidoptera: Crambidae) (KAGEYAMA et al., 2003), e a cigarrinha *Zyginidia pullula* (Hemiptera: Cicadellidae) (NEGRI et al., 2006).

2.3.2 Morte de machos

A morte de machos caracteriza-se pela indução da morte de embriões machos, reduzindo à metade a fertilidade de fêmeas infectadas em comparação às fêmeas não-infectadas (DYER; JAENIKE, 2004; HORNETT et al., 2006). Assim, a infecção de machos induz a sua morte antes de atingirem a fase adulta, favorecendo a dispersão de *Wolbachia* (JAENIKE, 2007), dado o maior número de fêmeas resultantes (DYSON; HURST, 2004), e de alterar a competição (JIGGINS et al., 2000) e aumentar a sobrevivência de fêmeas irmãs (HURST; MAJERUS, 1993). Exemplos de morte de machos causado por *Wolbachia* foram observados em besouros (HURST et al., 1999; FIALHO; STEVENS, 2000), borboletas (HURST et al., 1999; DYSON et al., 2002) e moscas-das-frutas (HURST et al., 2000; DYER; JAENIKE, 2004).

2.3.3 Incompatibilidade citoplasmática

Acredita ser o mais conhecido fenótipo induzido por *Wolbachia*. A incompatibilidade citoplasmática (IC) em insetos pode ser direcional ou bidirecional. Na IC direcional, apenas um dos sexos (o masculino) está infectado. Já na bidirecional, ambos os sexos estão infectados, mas a IC será expressa devido à ocorrência de linhagens incompatíveis infectando o macho e a fêmea. Como IC causa a morte do embrião, as fêmeas infectadas, que estão protegidas de IC direcional, terão vantagem reprodutiva sobre fêmeas não-infectadas, visto que podem cruzar tanto com machos infectados como com machos não-infectados, permitindo a rápida dispersão da infecção pela população hospedeira e, possivelmente, a sua fixação (WEEKS et al., 2007).

Embora o mecanismo exato da IC ainda não esteja elucidado, sabe-se que há diferença para espécies diplóides e haplodiplóides. Em espécies diplóides, IC é expressa pela mortalidade dos embriões; porém, o mecanismo como isto ocorre ainda não é claro. Contudo, observações sugerem que *Wolbachia* modifica os componentes nucleares do esperma durante a espermatogênese (PRESGRAVES, 2000), ação denominada de modificação de *Wolbachia* (função *mod*) (WERREN, 1997). Essa modificação impede que todos os cromossomos paternos entrem na anáfase durante a primeira divisão mitótica, ocasionando falhas no desenvolvimento do zigoto, a menos que a mesma linhagem ou linhagem compatível de *Wolbachia* esteja presente no ovo e exerça a função de resgate (função *resc*). Quando a fêmea não tem esta função, a modificação do macho resulta em letalidade embrionária (ZABALOU et al., 2008).

Em espécies haplodiplóides são encontradas duas formas de incompatibilidade citoplasmática: mortalidade de fêmeas e conversão de machos. No primeiro tipo, a progênie resultante de ovos fertilizados morre. Assim, somente os ovos não-fertilizados darão origem a adultos, os quais serão exclusivamente machos. No segundo caso, os cromossomos paternos herdados são destruídos, resultando no desenvolvimento de machos haplóides a partir de ovos fertilizados. A conversão de embriões em machos reduz a razão sexual da população, mas não elimina as, visto que nesta situação ovos fertilizados originarão machos e fêmeas.

Essa modificação da expressão do fenótipo IC pelos genes nucleares do hospedeiro pode ser observada em mosquitos (RASGON, 2009; SINKINS et al., 2005) e moscas (HURST et al., 2000). Em populações de *Leptopilina heterotoma* infectadas por *Wolbachia* indutora de incompatibilidade citoplasmática, por exemplo, foi observada a redução da fecundidade, atividade locomotora e a sobrevivência de adultos (FLEURY et al., 2000). Ainda, machos infectados por *Wolbachia* IC produzem poucos espermatozóides e são menos férteis do que machos não-infectados (SNOOK et al., 2000).

Estudos propuseram que esse efeito induzido por *Wolbachia* pode ser utilizado como estratégia de controle populacional, como no caso de mosquitos, por meio da liberação de machos infectados na natureza para que eles cruzem com fêmeas não-infectadas, o que reduziria o número de indivíduos, levando, assim, à supressão ou diminuição da população de vetores de importância médica (STOUTHAMER et al., 1999; DEAN; DOBSON, 2004).

2.3.4 Partenogênese telítica

Linhagens de *Wolbachia* indutoras de partenogênese telítica são restritas a espécies haplodiplóides, comuns em Hymenoptera (WERREN et al., 2008), incluindo vários parasitoides (STOUTHAMER, 1997). Estudos detalhados sobre esse fenótipo foram realizados, particularmente, com os parasitoides de ovos do gênero *Trichogramma* (STOUTHAMER et al., 1990; PINTO; STOUTHAMER, 1994; STOUTHAMER, 1997).

O interesse dos pesquisadores por *Wolbachia* se dá devido à complexidade de interações em que estão envolvidas e às diversas funções que exercem sobre seus hospedeiros. A manipulação da reprodução por essa bactéria parece ser um dos efeitos mais investigados. Porém, é crescente o número de informações que aponta para uma participação muito mais específica desse simbionte em vários outros processos do hospedeiro, como a suplementação nutricional

(KREMER et al., 2009; HOSOKAWA et al., 2010), a resposta olfativa (PENG et al., 2008), a inibição da apoptose de células nutrízes, permitindo, assim, a maturação dos oócitos (PANNEBAKKER et al., 2007), a influência no custo adaptativo da resistência do hospedeiro a inseticidas (DURON et al., 2006), a proteção antiviral em *Drosophila* (HEDGES et al., 2008; TEIXEIRA et al., 2008), a inibição da replicação viral, disseminação e transmissão de DENV em *Aedes aegypti*, sendo que estes efeitos estariam associados à resposta imune do inseto na presença de *Wolbachia* (BIAN et al., 2010). Além de influenciar os processos fisiológicos mencionados anteriormente, também há a possibilidade de que *Wolbachia* participe na indução de variabilidade genética no hospedeiro a partir da transferência de seus genes. Esta característica é vista como uma possível fonte a ser explorada no desenvolvimento de estratégias alternativas de controle de inseto-praga, sendo *Wolbachia* utilizada como vetor para produção de transgênicos (KLASSON et al., 2009).

2.4 Infecção de *Trichogramma* por *Wolbachia*

Os himenópteros usualmente se reproduzem por haplodiploidia. A forma mais comum de reprodução por haplodiploidia é a partenogênese arrenótoca. Neste caso, os machos são originados de óvulos não-fertilizados (haplóides), enquanto a telitoquia se refere ao desenvolvimento de fêmeas a partir de óvulos não-fecundados. Na deuterotoquia, ambos os sexos podem ser formados a partir de óvulos não-fecundados (PARRA et al., 2002).

Infecções por bactérias do gênero *Wolbachia* podem induzir reprodução por telitoquia em muitos himenópteros (STOUTHAMER et al., 1993). Esta bactéria manipula o comportamento do cromossomo em óvulos infectados não-fertilizados, acarretando a duplicação do número de cromossomos por meio do processo chamado de duplicação de gameta (STOUTHAMER; KAZMER, 1994). Essa duplicação de gameta resulta em completa homozigose das fêmeas resultantes. Fêmeas infectadas por *Wolbachia* indutoras de telitoquia produzem progênie fêmea a partir de óvulos não-fertilizados, enquanto que os óvulos de fêmeas não-infectadas originarão machos. Consequentemente, a telitoquia pode persistir indefinidamente na ausência de machos (STOUTHAMER, 1997). Na maioria dos casos conhecidos de infecção de *Wolbachia* indutora de telitoquia, cerca de 99% da população é formada por fêmeas infectadas, e muitos desses casos são completamente partenogenéticos. É esperado que essa linhagem de *Wolbachia* se disperse pela população hospedeira, levando à perda da reprodução sexual, desde que a bactéria seja

transmitida, e que as fêmeas infectadas produzam mais descendentes do que as fêmeas não-infectadas (STOUTHAMER, 1997).

Dentre os himenópteros, os parasitoides de ovos do gênero *Trichogramma* são os mais utilizados nos programas de controle biológico dada à sua eficiência no combate aos insetos-praga. Atualmente são conhecidas 210 espécies de *Trichogramma* no mundo (PINTO, 2006), com um grande número de características estudadas nos testes de controle de qualidade com intuito de aumentar o desempenho dos inimigos naturais nos programas de controle (VAN LENTEREN et al., 2003).

Outro aspecto desses parasitoides que necessita de conhecimento detalhado é a sua interação com *Wolbachia*. As investigações dessa associação são com intuito de esclarecer o papel que *Wolbachia* desempenha no hospedeiro, visto os efeitos nocivos ao hospedeiro possivelmente associados à sua ocorrência (STOUTHAMER et al., 1994, 1999; HOFFMANN et al., 1990; STOUTHAMER; LUCK, 1993; HORJUS; STOUTHAMER, 1995), mesmo que algumas das associações *Wolbachia-Trichogramma* tenham se mostrado inócuas (STOUTHAMER et al., 1994; HOFFMANN et al., 1996) ou resultado em efeitos positivos aos hospedeiros (GIRIN; BOULETREAU, 1995; WADE; CHANG, 1995; STOLK; STOUTHAMER, 1996; VAVRE et al., 1999).

Estudos filogenéticos baseados no gene 16S rDNA definiram *Wolbachia* como um grupo monofilético (O'NEILL et al., 1992; BANDI et al., 1998; LO et al., 2007). A associação dessa bactéria com *Trichogramma* forma um grupo monofilético pertencente ao supergrupo B de *Wolbachia* (WERREN et al., 1995; STOUTHAMER et al., 1993). Segundo alguns autores, comparações de filogenias moleculares de 20 espécies/linhagens de *Trichogramma* partenogenéticas e seu simbionte *Wolbachia* sugerem a ocorrência de transmissão horizontal da bactéria (SCHILTHUIZEN; STOUTHAMER, 1997), embora a transmissão vertical ocorra mais frequentemente.

A transferência horizontal de *Wolbachia* pode ocorrer quando diferentes espécies compartilham o mesmo ovo hospedeiro, podendo resultar em múltiplas infecções. Um exemplo de transmissão horizontal natural desse simbionte foi encontrado entre indivíduos do parasitoide *Trichogramma kaykai* (HUIGENS et al., 2000).

Estudos de infecção de *Trichogramma* por *Wolbachia* identificaram dois tipos de modificações: telitoquia (STOUTHAMER; LUCK, 1993; STOUTHAMER et al., 1994) e

aumento de fecundidade (GIRIN; BOULÉTREAU, 1995; VAVRE et al., 1999). A indução de telitoquia é a modificação na reprodução mais comum resultante da interação dessa bactéria com espécies desse parasitoide de ovos.

Em *Trichogramma* existem duas formas de telitoquia: a reversível (associada a infecções microbianas) e a não-reversível (STOUTHAMER et al., 1990). Evidências citológicas apontam para a relação entre a presença de microrganismos em ovos e a incidência de partenogênese (telitoquia) reversível em espécies desse parasitoide (STOUTHAMER; WERREN, 1993). Fêmeas telítocas de parasitoides quando expostas à alimentação com antibiótico ou a altas temperaturas tiveram a densidade de *Wolbachia* reduzida ou completamente eliminada, passando a produzir prole de ambos os sexos (STOUTHAMER; LUCK; HAMILTON, 1990). Em várias espécies de *Trichogramma*, machos obtidos via tratamento com antibiótico são bem sucedidos na fertilização de fêmeas tratadas da mesma linhagem (STOUTHAMER; LUCK, 1993), o que não ocorre para várias outras espécies de parasitoides, como *Encarsia formosa* (ZCHORI-FEIN et al., 1992), *Muscidifurax uniraptor* (GOTTLIEB; ZCHORI-FEIN, 2001; STOUTHAMER et al., 1993, 1994; ZCHORI-FEIN; GOTTLIEB; COLL, 2000), *Apoanagyrus diversicornis* (PIJLS et al., 1996), *Aphytis* sp. (ZCHORI-FEIN et al., 1995), *Telenomus nawaii* (ARAKAKI; NODA.; YAMAGISHI, 2000) e *Eretmocerus mundus* (DE BARRO; HART, 2001).

Estudos sobre o efeito desse simbiote em parâmetros biológicos do hospedeiro são normalmente utilizados via comparação entre indivíduos tratados com antibióticos (sem *Wolbachia*) e aqueles não-tratados (com *Wolbachia*). Em três espécies de *Trichogramma*, o número de descendentes produzidos por fêmeas infectadas foi significativamente menor que os produzidos pelas fêmeas curadas (STOUTHAMER; LUCK, 1993), mostrando que as fêmeas infectadas por *Wolbachia* são menos fecundas (STOUTHAMER; LUCK, 1993; VAN MEER, 1999; HOHMANN; LUCK; STOUTHAMER, 2001). Entretanto, foi observado aumento na fecundidade devido à associação com *Wolbachia* (GIRIN; BOULÉTREAU, 1995; VAVRE et al., 1999), apesar de indivíduos infectados sofrerem alta mortalidade embrionária (VAN MEER, 1999; HOHMANN; LUCK, 2000) quando comparados aos não-infectados.

Estudos de aptidão biológica de *Trichogramma* têm sido realizados para entender os custos adaptativos da associação com *Wolbachia*-parasitoide e os benefícios da utilização de fêmeas infectadas em relação às fêmeas não-infectadas em programas de controle biológico. Parâmetros biológicos de *Trichogramma*, como tamanho do corpo, sobrevivência da progênie,

taxa de desenvolvimento, longevidade e fecundidade, vêm sendo utilizados como medidas para testar a teoria evolutiva ou para avaliação das implicações ecológicas.

A diversidade de efeitos causados por *Wolbachia* permite adotar estratégias de controle em campo, como a utilização de uma linhagem telítoca de *Trichogramma*, já que a telitoquia consiste na produção exclusiva de fêmeas, apresentando várias vantagens em relação à população arrenótoca: 1) crescimento mais rápido da população telítoca; 2) redução dos custos de produção, pois não há produção de machos; 3) fácil estabelecimento no campo, pois não há necessidade de cópula e, além disso, a população pode reproduzir-se eficientemente em baixas densidades de hospedeiros (STOUTHAMER, 1993).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Detecção de infecções naturais de *Wolbachia* em *Trichogramma galloi*

A ocorrência de *Wolbachia* associada a *Trichogramma galloi* foi verificada em duas populações naturais coletadas em ovos de *Diatraea saccharalis* provenientes de canaviais dos municípios de Iracemápolis e Lençóis Paulista, Estado de São Paulo, Brasil. Amostras dos espécimes obtidos foram identificadas com auxílio da chave ilustrada para as espécies de *Trichogramma* do Brasil (QUERINO; ZUCCHI, 2005).

As posturas obtidas foram individualizadas em tubos de vidro contendo papel umedecido até a constatação do parasitismo, dada pela alteração da coloração dos ovos do amarelo ao preto. Gotículas de mel foram adicionadas à parede interna do tubo como fonte de alimento para os adultos dos parasitoides.

As fêmeas obtidas de cada coorte foram individualizadas para o estabelecimento de isolinhagens, às quais foram oferecidos ovos de *D. saccharalis* para o parasitismo por 24 h. Ao término do período de parasitismo, as posturas parasitadas foram colocadas em contato com papel de filtro umedecido para a manutenção da umidade, evitando, assim, o ressecamento dos ovos do hospedeiro.

Os parasitoides foram mantidos em câmaras climatizadas ($25\pm 1^{\circ}\text{C}$; $60\pm 10\%$ UR; fotofase de 14h) até a emergência, quando novas posturas do hospedeiro foram oferecidas para o parasitismo e manutenção das isolinhagens estabelecidas. Cada fêmea isolada para o estabelecimento das diferentes isolinhagens em cada coorte selecionada foi preservada em 100% etanol ao término do período de parasitismo e submetida ao processo de extração de DNA genômico para a realização de PCRs diagnósticos voltados à detecção de *Wolbachia*.

3.2 Análises moleculares

3.2.1 Extração de DNA genômico

Os exemplares foram removidos do etanol e colocados individualmente no interior de tubos de 1,5 ml à temperatura ambiente até a completa evaporação do etanol. Após a secagem,

foram acrescentados 80µl de solução de Chelex a 10% e 8µl de proteinase K a 20mg/mL, sendo a amostra colocada em bloco térmico a 95°C por 20 min. Posteriormente, a amostra foi colocada em centrífuga de mesa e o sobrenadante recuperado para a posterior realização de reações de polimerase em cadeia (PCR).

3.2.2 Detecção de *Wolbachia*

A presença de *Wolbachia* nos indivíduos de *T. galloi* de ambas populações estudadas foi diagnosticada pela amplificação de fragmento do gene *wsp* responsável pela produção de proteína específica da parede celular desse simbiote, utilizando-se os iniciadores específicos *wsp* 81F (5'-TGGTCCAATAAGTGATGAAGAAAC-3') e *wsp* 691R (5'-AAAAATTAAACGCTACTCCA-3'), em reação de PCR programada a 94°C por 2 min (1 ciclo); 94°C por 1 min, 55°C por 1 min e 72°C por 1 min (35 ciclos); seguido de extensão final a 72°C por 5 min (1 ciclo) (BRAIG et al., 1998). As reações foram realizadas em volume total de 25 µL, contendo 1 µL de gDNA (concentração não foi determinada), 1x PCR buffer, 1,5 mM MgCl₂, 200 µM cada dNTP, 0,32 µM de cada iniciador e 0,5 U Taq polimerase.

Os produtos de amplificação foram separados por eletroforese em gel de agarose a 1,5%, contendo 0,5 µg/mL de brometo de etídio, utilizando-se o tampão Tris acetato-EDTA (TAE) (0,1M Tris-HCl, 0,01M EDTA, 9,3 mL água ultra-pura, pH 8,5) e visualizados em transluminador (UV) acoplado ao sistema de captura e digitalização de imagens GelCapture® 4.1.11.4.

Amostras que testaram negativas no PCR-diagnóstico inicial foram sujeitas à reamplificação em reação aninhada com os iniciadores *wsp* 106F (5'-GGATAGTCCCTTAACAAGAT 3') e *wsp* 460R (5'-TTGATTTCTGGAGTTACATC 3'), utilizando condições idênticas às aquelas anteriormente descritas para as reações de PCR, detecção e visualização dos amplicons.

3.2.3 Clonagem

Para realização da clonagem, o produto de amplificação foi ligado ao vetor pGEM®-T (Promega), seguindo as recomendações do fabricante. Após a ligação, 2 µL desta reação foram adicionados a 50 µL de células competentes DH5-α de *Escherichia coli* para transformação.

Após a adição da reação de ligação às células, as mesmas permaneceram em gelo por 30 min antes de serem submetidas ao choque térmico, em banho-maria a 42°C, por 30 s. Após o choque térmico, as células permaneceram em gelo por mais 2 min, sendo então adicionados 250 µL de meio SOC para a incubação das mesmas sob agitação constante a 37°C por uma hora.

As células foram plaqueadas em meio LB-ágar acrescido de ampicilina (100 mg/L) e X-Gal (20 µl a 20 mg/mL). As placas foram colocadas a 37°C por 16 h, para posterior seleção dos transformantes para extração de plasmídeos e amplificação dos insertos utilizando-se dos iniciadores universais SP6 e T7. A reação de PCR com os iniciadores SP6 e T7 foi realizada utilizando-se 1 µL de gDNA, 5 µL de tampão 5x, 1,5 mM MgCl₂, 200 µM cada dNTP, 0,32 µM de cada iniciador e 0,5 U Taq polimerase e 16 µL água destilada ou deionizada autoclavada para o volume final de 25 µL. O programa de amplificação consistiu em uma desnaturação inicial de 3 min a 95°C, 35 ciclos de 45 s a 95°C, 45 s a 55°C e 1 min a 72°C, com extensão de 5 min a 72°C.

A confirmação da presença do inserto foi realizada via visualização em gel de agarose a 1%. Os produtos de PCR positivos foram purificados e encaminhados para o sequenciamento.

3.2.4 Caracterização da linhagem de *Wolbachia*

Para a caracterização da linhagem de *Wolbachia* em *T. galloi* foi utilizada a extração de gDNA de indivíduos da população de Lençóis Paulista (população selecionada) para amplificação do fragmento com os iniciadores específicos *wsp* 81F e *wsp* 691R, assim como descrito anteriormente.

Os produtos de amplificação foram purificados após adição de 0,1 volume de 3M acetato de sódio e 2,5 volumes de 95% etanol gelado à reação de amplificação, e incubação em freezer (-20°C) por 15h. Após o período de incubação, as amostras foram centrifugadas à temperatura ambiente (10 min a 18.000 g), o precipitado obtido foi lavado em 500 µL de 80% etanol gelado e novamente centrifugado. Esse procedimento foi repetido por mais uma vez. Após a remoção do etanol, o pellet formado foi mantido à temperatura ambiente para a completa evaporação do etanol e ressuspensão da amostra em 10 µL de água ultra-pura autoclavada.

Os produtos de PCR purificados foram submetidos ao sequenciamento bidirecional utilizando-se os mesmos iniciadores empregados nas reações de amplificação. As amostras foram processadas pelo Centro de Biologia Molecular e Engenharia Genética (CBMEG) da Universidade Estadual de Campinas. As sequências obtidas foram editadas manualmente e

analisadas no programa BioEdit (<http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html>) para eliminação de possíveis erros de leitura e utilizadas para a busca de sequências homólogas e caracterização das regiões hipervariáveis do *wsp* em banco de dados específico para tipagem de *Wolbachia* (<http://pubmlst.org/wolbachia/wsp/>).

3.3 Produção de isolinhagens aposimbiontes

Após a confirmação da infecção de isolinhagens de *T. galloi* por *Wolbachia*, uma das isolinhagens infectada foi selecionada aleatoriamente para a produção de isolinhagem irmã livre de *Wolbachia*. Assim, parte dos indivíduos desta isolinhagem selecionada foi alimentada apenas com mel puro, mantendo sua associação com *Wolbachia* (W^+), enquanto a outra parte dos indivíduos foi alimentada com mel acrescido de antibiótico (0,25% tetraciclina), dando origem a isolinhagem irmã livre de *Wolbachia* (W^-). Ovos do hospedeiro só eram oferecidos aos indivíduos para parasitismo 48 h após o início da alimentação, garantindo, assim, a ingestão do antibiótico antes do parasitismo. A cada geração obtida, novos indivíduos eram separados e alimentados para cada uma das isolinhagens W^+ e W^- , assim como descrito anteriormente, até a completa eliminação de *Wolbachia* da isolinhagem W^- . Todas as fêmeas selecionadas como progenitoras da nova geração foram testadas pelos PCR-diagnósticos descritos anteriormente para a detecção de *Wolbachia* ao término do período de parasitismo.

3.4 Cruzamentos biológicos entre indivíduos infectados e livres de *Wolbachia*

Indivíduos machos e fêmeas de cada uma das isolinhagens irmãs, não-infectadas e infectadas por *Wolbachia*, foram obtidos de ovos que deram origem a um único indivíduo. Esses indivíduos foram utilizados em um dos seguintes tratamentos: 1) macho W^+ x fêmea W^+ , 2) macho W^- x fêmea W^- , 3) macho W^+ x fêmea W^- , 4) macho W^- x fêmea W^+ , 5) fêmea W^+ virgem e 6) fêmea W^- virgem. Os casais ou as fêmeas virgens foram colocados em tubos de vidro contendo pequenas gotículas de mel na parede interna do tubo como fonte de alimento e 100 ovos de *D. saccharalis* foram oferecidos diariamente até a morte das fêmeas, sendo avaliadas a fecundidade, a fertilidade e a razão sexual (fêmeas/fêmeas+machos) produzida. As posturas foram mantidas em condições controladas, conforme detalhado anteriormente.

3.5 Avaliação da interação *Wolbachia* – *Trichogramma galloi*

Como a linhagem de *Wolbachia* infectando *T. galloi* não induzia telitoquia, a verificação do efeito deste simbiote foi avaliada via estudos comparativos utilizando-se 30 casais individualizados de *T. galloi* para cada isolinha (W^+ e W^-). Esses casais foram acondicionados em tubos de vidro contendo pequenas gotículas de mel colocadas na parede interna do tubo como alimento. Para cada casal selecionado foram oferecidos diariamente cerca de 100 ovos de *D. saccharalis* até a morte das fêmeas. As posturas coletadas eram colocadas em contato com papel de filtro umedecido e mantidas em condições controladas para o completo desenvolvimento do parasitoide. Assim, o efeito da eliminação de *Wolbachia* na aptidão biológica de *T. galloi* foi avaliado observando-se o número de ovos parasitados (dado pelo número de ovos do hospedeiro escurecidos, indicativo de que o parasitoide atingiu a fase de prepupa), fertilidade (%) (dada pela sobrevivência do período prepupa a adulto e calculada a partir do número de ovos com orifícios de saída do parasitoide pelo número total de ovos escurecidos), número de indivíduos alocados por ovo hospedeiro (dado pela razão entre o número total de adultos e o número de ovos com orifícios de emergência), longevidade (dias), duração do período ovo-adulto (dias) e razão sexual (fêmeas/fêmeas+machos).

Os experimentos foram conduzidos em câmaras tipo BOD com condições controladas de temperatura ($25\pm 1^\circ\text{C}$), umidade relativa ($60\pm 10\%$) e fotofase (14 h).

3.6 Efeito da associação com *Wolbachia* na resposta de *T. galloi* ao estresse térmico

3.6.1 Efeito da duração do estresse térmico na sobrevivência e longevidade de fêmeas

Para a avaliação do efeito da associação com *Wolbachia* na resposta de *T. galloi* ao estresse térmico, fêmeas das isolinhagens irmãs infectadas e não-infectadas foram submetidas ao choque térmico a 36°C por diferentes períodos (1 h, 2 h, 3 h, 4 h e 6 h). O choque térmico foi realizado em banho térmico com controle digital de temperatura, com sensibilidade de $0,1^\circ\text{C}$. Para cada período de exposição, 60 fêmeas, para cada isolinhagem, foram utilizadas. Após o choque térmico, as fêmeas foram transferidas para câmaras do tipo BOD ($25\pm 1^\circ\text{C}$, $60\pm 10\%$ UR e fotofase de 14 h), sendo a sobrevivência das mesmas avaliada a intervalos de 12h.

3.6.2 Efeito do estresse térmico na aptidão reprodutiva

Fêmeas acasaladas de *T. galloi* obtidas de isolinhagens não-infectada e infectada por *Wolbachia* foram individualizadas e submetidas ao choque térmico a 36°C por 2 h ou 6 h. Para cada uma das condições de infecção e tempo de exposição, foram utilizadas 30 fêmeas. Após o choque térmico, as fêmeas foram transferidas para as condições experimentais descritas anteriormente e oferecidas cerca de 100 ovos de *D. saccharalis* até a morte das mesmas. As posturas parasitadas eram colocadas em contato com papel de filtro umedecido e mantidas em condições controladas para o completo desenvolvimento do parasitoide. Dessa forma, o efeito da eliminação de *Wolbachia* na resposta de fêmeas de *T. galloi* ao estresse térmico foi avaliado observando-se a fecundidade (ovos parasitados/fêmea), a fertilidade (%), o número de indivíduos alocados por ovo hospedeiro, a longevidade das fêmeas (h) e a razão sexual da progênie produzida (fêmeas/fêmeas+machos).

3.7 Análises estatísticas

Os dados de contagem, como longevidade, número de ovos parasitados e fertilidade, foram analisados ajustando-se ao modelo de regressão Poisson, que é um modelo linear generalizado (NELDER; WEDDERBURN, 1972). Quando este modelo não foi ajustado, optou-se pelo método de quase-verossimilhança para estimar os parâmetros do modelo, chamado de quase-Poisson. As comparações múltiplas foram feitas a partir dos intervalos de confiança obtidos para as médias, segundo o modelo utilizado.

Os dados que consistiam de variáveis contínuas, como o número de indivíduos por ovo, foram ajustados ao modelo normal (normalidade), com posterior verificação das pressuposições do modelo: homogeneidade de variâncias e normalidade dos resíduos. Os dados de longevidade após tratamento térmico foram transformados com raiz quadrada, com intuito de atender as pressuposições do modelo e proceder com a análise de variância, além de ter sido feita a regressão para esse parâmetro biológico. A verificação de normalidade foi feita com o teste de Shapiro-Wilk (SHAPIRO; WILK, 1965) e a homogeneidade de variâncias foi testada com o teste de Hartley (HARTLEY, 1950). Posteriormente, as comparações múltiplas foram feitas com o teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

Os dados referentes à razão sexual e duração do período ovo-adulto, em geral, consistem em proporções e, por isso, foram analisados usando modelo de regressão binomial, que é um modelo linear generalizado (NELDER; WEDDERBURN, 1972). As comparações múltiplas foram feitas a partir dos intervalos de confiança obtidos para as médias, segundo o modelo utilizado.

Para os dados analisados utilizando-se o modelo normal foi feita a análise de variância (ANOVA), sendo que para os dados que foram ajustados utilizando os modelos de Poisson, quasi-Poisson e binomial, foi aplicada a análise de desvio (ANODEV).

As análises estatísticas dos dados obtidos foram feitas com o *software* gratuito R, em sua versão 2.13.0 (R Development Core Team, 2011).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Detecção de infecções naturais de *Wolbachia* em *Trichogramma galloi*

O número de adultos das duas populações naturais de *Trichogramma galloi* obtidas de cada coorte (postura parasitada) de *Diatraea saccharalis* foi variável, assim como o número de fêmeas. A população de Iracemápolis teve apenas uma coorte analisada (22 ovos), da qual emergiram 40 fêmeas e oito machos, sendo que seis das 40 fêmeas (15%) testaram positivas para a presença de *Wolbachia*. Já para a população de Lençóis Paulista foram obtidas oito coortes (61 ovos), das quais emergiram 39 fêmeas e 47 machos. Das 39 fêmeas obtidas, 13 testaram positivas para *Wolbachia* (33%).

A análise molecular para detecção de *Wolbachia* indicou a presença de fêmeas infectadas e não-infectadas originadas na mesma coorte avaliada. Com isso, pode-se inferir que a densidade da bactéria é variável na população de *T. galloi*. O fato da densidade de *Wolbachia* ser variável na população de *T. galloi* pode ser explicado por um mecanismo de resistência desenvolvido pelo hospedeiro, impedindo que a bactéria fosse fixada na população do parasitoide.

A análise do gene parcial da linhagem de *Wolbachia* associada a isolinhagem de *T. galloi* estudada indicou que a mesma possui regiões hipervariáveis (HVR1: 2; HVR2: 17; HVR3: 3; HVR4: 234) idênticas àquela caracterizada no banco de dados de *Wolbachia* como *wsp* 584 .

4.2 Cruzamentos biológicos entre indivíduos infectados e livres de *Wolbachia*

Os cruzamentos entre indivíduos das isolinhagens irmãs de *T. galloi*, infectada (W^+) ou não (W^-), e a análise da razão sexual de fêmeas virgens de cada isolinhagem, permitiu a verificação de que fêmeas virgens infectadas produzem progênie composto por ambos os sexos, enquanto fêmeas virgens não-infectadas produziram apenas descendentes machos (Tabela 1). Esses resultados demonstram a eficiência no processo de eliminação de *Wolbachia* via tratamento com antibiótico, já que o modo normal de reprodução arrenótoca da espécie foi restaurado. A constatação de machos e fêmeas produzidos por fêmeas virgens infectadas indica que a bactéria não consegue se multiplicar no hospedeiro o suficiente para infectar todos os óvulos produzidos e induzir à sua diploidização, levando ao desenvolvimento exclusivo de fêmeas (Tabela 1).

O cruzamento entre machos e fêmeas de isolinhagens infectadas e não-infectadas também demonstrou que não há incompatibilidade no cruzamento de indivíduos curados e infectados em qualquer direção, já que a razão sexual da progênie foi a mesma entre todos os acasalamentos, sendo, ainda, superior àquela obtida por fêmeas virgens infectadas (Tabela 1).

Outro aspecto interessante foi a observação de que fêmeas acasaladas apresentaram fecundidade muito superior às fêmeas virgens, independentemente de estarem ou não infectadas por *Wolbachia* (Tabela 1). Estes resultados demonstram que machos de *T. galloi* podem contribuir com recursos nutricionais para o desenvolvimento do aparelho reprodutor de fêmeas de *T. galloi*. Há inúmeros exemplos na literatura que relatam a transferência de substâncias moduladoras da fisiologia/comportamento das fêmeas ou que tenham função nutricional para a fêmea ou embrião por machos, juntamente com fluído seminal (POIANI, 2006).

Tabela 1 – Fecundidade (nº de ovos/fêmea), fertilidade (%) e razão sexual (Média $\pm$ EP) obtidos de cruzamentos de indivíduos de *Trichogramma galloi* infectados (W^+) e não-infectados (W^-) por *Wolbachia* ($25\pm 1^\circ\text{C}$; $60\pm 10\%$ UR; fotofase de 14h)

Tratamentos	Fecundidade	Fertilidade (%)	Razão sexual
MW ⁺ x FW ⁺	26,07 $\pm$ 1,88 a	82,00 $\pm$ 1,57 a	0,91 $\pm$ 0,01 ^a
MW ⁺ x FW ⁻	26,53 $\pm$ 1,65 a	84,67 $\pm$ 1,63 a	0,92 $\pm$ 0,01 a
FW ⁺	11,96 $\pm$ 0,98 b	89,29 $\pm$ 2,72 a	0,57 $\pm$ 0,07 b
MW ⁻ x FW ⁺	31,35 $\pm$ 2,37 a	89,29 $\pm$ 1,12 a	0,84 $\pm$ 0,06 a
MW ⁻ x FW ⁻	25,47 $\pm$ 2,03 a	81,29 $\pm$ 1,68 a	0,81 $\pm$ 0,06 a
FW ⁻	9,40 $\pm$ 0,89 b	55,55 $\pm$ 6,39 b	—

Médias seguidas de mesma letra nas colunas não diferem entre si a 5% de probabilidade

MW+: macho infectado

MW-: macho não-infectado

FW+: fêmea infectada

FW-: fêmea não-infectada

Em relação à fertilidade não houve diferença entre os cruzamentos, exceto as fêmeas virgens não-infectadas, em que foi observada forte redução neste parâmetro biológico.

Contudo, vale ressaltar que na ausência de modificações reprodutivas, *Wolbachia* poderia ter sido perdida da população de *T. galloi*. Portanto, pode ser que essa bactéria confira vantagens na aptidão biológica de fêmeas infectadas ou manipule a reprodução em vários

caminhos que não foi possível de serem detectados neste trabalho. Além disso, as interações inseto-simbionte existentes são muito diversas, variando quanto ao tipo do próprio microrganismo, graus de co-dependência, localização, funções e distribuição no hospedeiro (BUCHNER, 1965; MIRA; MORAN, 2002; BAUMANN, 2005).

Portanto, investigações sobre a relação de simbiose na associação *Wolbachia* – *T. galloi* e a caracterização de potenciais microrganismos que poderiam interagir com este simbionte são fundamentais para a correta determinação de efeitos induzidos por *Wolbachia* na aptidão biológica de *T. galloi*, o que poderia contribuir para a seleção de linhagens infectadas desta espécie de *Trichogramma* para sua utilização em programas de controle biológico de *D. saccharalis*.

4.3 Avaliação da infecção por *Wolbachia* na aptidão biológica de *Trichogramma galloi*

A análise comparativa dos parâmetros biológicos observados para isolinhagens irmãs de *T. galloi*, infectadas (W^+) ou não (W^-) pela bactéria *Wolbachia*, indicou que a eliminação da bactéria por meio do tratamento com antibiótico influenciou a longevidade dos adultos e o número de indivíduos alocados por ovo do hospedeiro (Tabela 2). Machos e fêmeas infectados por *Wolbachia* foram mais longevos do que aqueles não-infectados, mas fêmeas W^- alocaram maior número de descendentes por ovo hospedeiro do que as fêmeas W^+ (Tabela 2).

O efeito positivo encontrado na longevidade de adultos W^+ de *T. galloi* é contrário ao observado para outras associações com *Wolbachia*, como em parasitóide *Drosophila melanogaster*, em que uma drástica redução na longevidade foi observada (MIN; BENZER, 1997).

A longevidade é uma característica de grande importância para programas de controle biológico, pois fêmeas mais longevas, teriam, provavelmente, maior eficiência em campo, sendo na maioria das vezes, capazes de parasitar por mais tempo quando comparados com aquelas que sobrevivem em curto espaço de tempo. Esse seria um mecanismo indireto do simbionte em ampliar sua distribuição na população hospedeira, mas a capacidade de parasitismo de *Trichogramma* é concentrada nos primeiros dias de vida do adulto (ZAGO et al., 2007) e, na linhagem em estudo, fêmeas concentraram seu parasitismo apenas no primeiro dia de vida. Este fato é bastante atípico se comparado ao ritmo de parasitismo normalmente observado para outras

espécies de *Trichogramma*, incluindo outras linhagens de *T. galloi*, as quais apresentam atividade de parasitismo por vários dias, com 80% de parasitismo sendo realizado até o 4º – 5º dia de vida (LOPES; PARRA, 1991; CÔNSOLI; PARRA, 1994; SÁ; PARRA, 1994; GARCIA et al., 2001).

A linhagem em questão também apresentou fecundidade inferior àquela usualmente relatada para *T. galloi*, normalmente muito superior aos poucos mais de 30 descendentes produzidos por fêmea neste estudo (LOPES; PARRA, 1991, CÔNSOLI; PARRA, 1994, 1995, 1996). No entanto, a fertilidade de isolinhagens irmãs de *T. galloi* infectada e não-infectada por *Wolbachia* foi superior àquela relatada por Pereira-Barros et al. (2005).

Tabela 2 – Parâmetros biológicos (Média $\pm$ EP) de *Trichogramma galloi* infectados (W^+) e não-infectados (W^-) por *Wolbachia* criados em ovos de *Diatraea saccharalis* ($25\pm 1^\circ\text{C}$; $60\pm 10\%$ UR; fotofase de 14h)

Parâmetros	W^+	W^-
Longevidade de fêmeas (dias)	$4,42 \pm 0,41$ a	$3,40 \pm 0,28$ b
Longevidade de machos (dias)	$2,83 \pm 0,25$ a	$1,80 \pm 0,22$ b
Número de indivíduos por fêmea	$31,27 \pm 2,40$ a	$30,93 \pm 2,63$ a
Fecundidade (nº ovos/fêmea)	$27,64 \pm 2,34$ a	$25,16 \pm 2,32$ a
Fertilidade (%)	$87,75 \pm 2,37$ a	$92,12 \pm 0,48$ a
Número de indivíduos por ovo	$1,19 \pm 0,04$ b	$1,44 \pm 0,04$ a
Período ovo-adulto (dias)	$10,16 \pm 0,06$ a	$10,16 \pm 0,06$ a
Razão sexual	$0,87 \pm 0,01$ a	$0,86 \pm 0,01$ a

Médias seguidas de mesma letra nas linhas não diferem entre si a 5% de probabilidade

Outro parâmetro biológico influenciado pela eliminação de *Wolbachia* foi o número médio de indivíduos de *T. galloi* alocados por ovo de *D. saccharalis*, sendo muito inferior àquele encontrado em outros estudos com *T. galloi* parasitando ovos de *D. saccharalis* (OLIVEIRA et al., 2003; PEREIRA-BARROS et al., 2005). Este fato pode ser decorrente do número de ovos do hospedeiro oferecidos às fêmeas para o parasitismo. Como *T. galloi* é uma espécie semi-gregária, a disponibilidade de um menor número de ovos em uma massa pode acarretar a maior deposição de ovos do parasitoide/ovo do hospedeiro, como uma estratégia de maximização da exploração do recurso nutricional disponível (WAAGE; MING, 1984). As decisões quanto ao número de descendentes a ser alocado por hospedeiro é uma característica genética da fêmea (CHASSAIN; BOULETREAUX, 1987, WAJNBERG et al., 1989), mas pode ser influenciado por inúmeros

outros fatores, como, por exemplo, a idade do hospedeiro (PAK et al., 1986). Entretanto, a constatação de que *Wolbachia* também pode influenciar essa característica requer maior atenção, visto que os dados aqui apresentados não podem descartar a mortalidade diferencial durante a fase imatura (anterior à formação da prepupa) entre os indivíduos W^+ e W^- .

Wolbachia não alterou a duração do período ovo-adulto ou razão sexual da progênie de fêmeas de *T. galloi* infectadas ou não-infectadas (Tabela 2). Com isso, este estudo consiste no primeiro relato da associação natural de *Wolbachia* – *T. galloi* e que não induz 100% telitoquia.

4.4 Efeito da associação com *Wolbachia* na resposta de *T. galloi* ao estresse térmico

4.4.1 Efeito da duração do estresse térmico na sobrevivência e longevidade de fêmeas

A duração do período de exposição e a infecção por *Wolbachia* influenciaram a sobrevivência de fêmeas de *T. galloi*, sem ocorrer, porém, interação entre os diferentes fatores (Tabela 3). Apesar da mortalidade inicial nos três primeiros períodos de exposição ao choque térmico ter sido sempre superior em fêmeas W^+ de *T. galloi*, a análise fatorial realizada indicou efeito apenas para o período de exposição ao choque térmico, visto a inexistência de interação entre os fatores analisados. Assim, apenas a exposição por 6 h ao choque térmico induz a mortalidade inicial significativa das fêmeas de *T. galloi* (Tabela 3).

Tabela 3 – Sobrevivência inicial (%) (Média $\pm$ EP) de fêmeas de *Trichogramma galloi*, infectadas (W^+) e não-infectadas (W^-) por *Wolbachia*, após estresse térmico a 36°C por diferentes períodos e posteriormente mantidas em condições controladas (25 $\pm$ 1°C; 60 $\pm$ 10% UR; fotofase de 14h)

Choque térmico	W^+	W^-	Média
1h	93,33 $\pm$ 4,63	100,00 $\pm$ 0,00	96,67 $\pm$ 2,34 b
2h	90,00 $\pm$ 5,57	100,00 $\pm$ 0,00	95,00 $\pm$ 2,84 b
3h	90,00 $\pm$ 5,57	100,00 $\pm$ 0,00	95,00 $\pm$ 2,84 b
4h	96,67 $\pm$ 3,33	96,67 $\pm$ 3,33	96,67 $\pm$ 2,34 b
6h	73,33 $\pm$ 8,21	73,33 $\pm$ 8,21	73,33 $\pm$ 5,76 a
Média	88,67 $\pm$ 2,60 A	94,00 $\pm$ 1,95 A	

Médias seguidas de mesma letra minúscula nas linhas ou maiúscula nas colunas não diferem entre si pelo teste Tukey a 5% de probabilidade

Analisando a longevidade de fêmeas de *T. galloi* pode-se verificar redução dos dias de vida das mesmas, apenas na exposição ao choque térmico por um período de 6 h, sendo que a longevidade observada neste tratamento não diferiu daquela de fêmeas expostas ao choque térmico por um período de 4 h (Tabela 4).

Tabela 4 – Longevidade (Média $\pm$ EP) de fêmeas de *Trichogramma galloi*, infectadas (W^+) e não-infectadas (W^-) por *Wolbachia*, após estresse térmico a 36°C por diferentes períodos e posteriormente mantidas em condições controladas (25 $\pm$ 1°C; 60 $\pm$ 10% UR; fotofase de 14h)

Choque térmico	W^+	W^-	Média
1h	70,71 $\pm$ 7,59	106,80 $\pm$ 9,63	89,38 $\pm$ 6,58 a
2h	65,78 $\pm$ 6,78	114,00 $\pm$ 10,49	91,16 $\pm$ 7,10 a
3h	65,33 $\pm$ 7,28	102,00 $\pm$ 10,40	84,63 $\pm$ 6,86 a
4h	48,41 $\pm$ 6,80	83,59 $\pm$ 7,28	66,00 $\pm$ 5,46 ab
6h	44,73 $\pm$ 8,24	57,82 $\pm$ 10,00	51,27 $\pm$ 6,48 b
Média	59,45 $\pm$ 3,34 B	94,89 $\pm$ 4,56 A	

Médias seguidas de mesma letra minúscula nas linhas ou maiúscula nas colunas não diferem entre si pelo teste Tukey a 5% de probabilidade

A eliminação de *Wolbachia* de fêmeas de *T. galloi* influenciou de forma positiva a resistência do inseto ao choque térmico, sendo as fêmeas W^- mais longevas do que as fêmeas W^+ (Tabela 4). No entanto, é interessante notar que a análise por regressão da resposta de fêmeas W^+ e W^- aos diferentes períodos de exposição ao choque térmico indicou que o decréscimo na longevidade de fêmeas W^- com o aumento do período de exposição ao tratamento térmico foi muito mais acentuada do que aquela observada em fêmeas W^+ , assim como indicado pelos coeficientes angulares estimados (Figura 1).

Figura 1 - Análise de regressão da longevidade de fêmeas de isolinhagens de *T. galloi* infectadas (W^+) e não-infectadas (W^-) por *Wolbachia* após exposição à temperatura de 36°C por períodos de tempo distintos

4.4.2 Efeito do estresse térmico na aptidão reprodutiva

Testes subsequentes utilizando apenas dois períodos distintos de exposição ao choque térmico (2 e 6 h) para a verificação do efeito do estresse térmico em diferentes parâmetros biológicos de isolinhagens irmãs de *T. galloi* W^+ e W^- indicaram efeito apenas na longevidade e fecundidade de fêmeas (Tabelas 5 e 6). No entanto, foi encontrada interação entre os fatores analisados, tempo de exposição e infecção, apenas para a longevidade, sendo observada maior longevidade em fêmeas W^- do que em fêmeas W^+ após 2 h de exposição ao choque térmico (Tabela 5). Porém, fêmeas W^- sofreram drástica redução em sua longevidade com o aumento do período de exposição ao choque térmico de 2 h para 6 h, sendo que a longevidade de fêmeas W^+ permaneceu inalterada com o aumento do período de exposição (Tabela 5).

Tabela 5 – Longevidade (Média $\pm$ EP) de fêmeas de *Trichogramma galloi* infectadas (W^+) e não-infectadas (W^-) por *Wolbachia* criadas em ovos de *Diatraea saccharalis* ($25\pm 1^\circ\text{C}$; $60\pm 10\%$ UR; fotofase de 14h) após estresse térmico a 36°C por 2 h e 6 h

Choque térmico	Longevidade de fêmeas (horas)	
	W^+	W^-
2h	$75,56 \pm 5,54$ bA	$118,75 \pm 10,49$ aA
6h	$61,33 \pm 6,09$ aA	$61,28 \pm 4,38$ aB

Médias seguidas de mesma letra minúscula nas linhas ou maiúscula nas colunas não diferem entre si a 5% de probabilidade

A fecundidade também demonstrou ser afetada pelo estresse térmico (Tabela 6). Neste caso, porém, não foi verificada interação entre os fatores estudados, sendo a fecundidade afetada exclusivamente pelo período de exposição ao choque térmico, ocorrendo decréscimo da mesma com a maior exposição ao estresse térmico (Tabela 6). A presença ou não de *Wolbachia* não afetou a fecundidade de fêmeas de *T. galloi* quando expostas ao choque térmico por diferentes períodos (Tabela 6).

Tabela 6 – Fecundidade (nº de ovos/fêmea) (Média $\pm$ EP) por fêmeas de *Trichogramma galloi* infectadas e não-infectadas por *Wolbachia* criadas em ovos de *Diatraea saccharalis* ($25\pm 1^\circ\text{C}$; $60\pm 10\%$ UR; fotofase de 14h) após estresse térmico a 36°C por 2 h e 6 h

Choque térmico	Fecundidade		Média
	W^+	W^-	
2h	$26,6 \pm 3,85$	$25,8 \pm 2,72$	$18,11 \pm 2,34$ a
6h	$11,16 \pm 2,58$	$18,3 \pm 2,17$	$13,45 \pm 1,74$ b
Média	$18,83 \pm 2,51$ A	$22,05 \pm 1,80$ A	

Médias seguidas de mesma letra minúscula nas linhas ou maiúscula nas colunas não diferem entre si a 5% de probabilidade

Os demais parâmetros observados, fertilidade, número de indivíduos por ovo hospedeiro e razão sexual, não sofreram influência do estresse térmico, independentemente do período de exposição ao choque térmico e da eliminação do simbionte *Wolbachia*.

O efeito negativo da exposição de insetos a altas temperaturas é normalmente observado na taxa de crescimento, desenvolvimento, duração do ciclo de vida, tamanho do adulto e fecundidade (DENLINGER; LEE Jr., 1998; MARGRAF; GOTTHARD; RAHIER, 2003, TAMMARU et al., 2004, CUI et al., 2008). No entanto, mesmo exposições a choques térmicos de curta duração podem influenciar de forma negativa a sobrevivência e fecundidade de insetos, visto que vários processos fisiológicos podem ser influenciados pela perda d'água pelo inseto (ARBOGAST, 1981; DENLINGER; LEE Jr., 1998; MIRONIDIS; SAVOPOULOU-SOULTANI, 2010). A redução na fecundidade observada em *T. galloi* após exposição ao choque térmico pode ter sido decorrente de danos causados aos oócitos ou ao desenvolvimento do ovário, assim como observado em outras espécies (ARBOGAST, 1981; CUI et al., 2008; MIRONIDIS; SAVOPOULOU-SOULTANI, 2010).

Apesar da existência de inúmeros relatos de que a exposição ao estresse térmico pode resultar em aumento da longevidade e resistência do inseto a fontes letais de estresse via hormesia (MINOIS, 2000; HERCUS et al., 2003; LE BOURG, 2005), incluindo espécies de *Trichogramma* (SCOTT; BERRIGAN; HOFFMANN, 1997), a exposição de fêmeas de *T. galloi* ao estresse térmico, mesmo que por períodos curtos de exposição, influenciou de forma negativa a longevidade das mesmas. Entretanto, o efeito benéfico da exposição ao estresse térmico pode ser dependente do estágio de desenvolvimento submetido ao estresse, bem como da temperatura utilizada e do período de exposição à mesma, assim como demonstrado para várias espécies, incluindo aquelas do gênero *Trichogramma* (SCOTT; BERRIGAN; HOFFMANN, 1997; AMICE et al., 2008; MIRONIDIS; SAVOPOULOU-SOULTANI, 2010).

Wolbachia tem sido associada como um fator indutor da resistência do hospedeiro a fontes de estresse, mas vários são os relatos que demonstram que essa bactéria pode ser eliminada ou ter sua abundância drasticamente reduzida mesmo por exposições relativamente curtas a altas temperaturas (JOHANOWICZ; HOY, 1998; PINTUREAU; BOLLAND, 2001). No entanto, apesar dos efeitos benéficos da associação de *T. galloi* a *Wolbachia* na longevidade de machos e fêmeas, mesmo a curta exposição de fêmeas W⁺ a condições de estresse térmico parece ter sido o suficiente para reverter os benefícios desta associação, visto que, nessas condições, fêmeas W⁺ foram menos longevas que fêmeas W⁻. Neste caso, as consequências da exposição ao estresse térmico nas interações entre hospedeiro e simbiote parecem permanecer inexplicáveis, visto a capacidade de uma espécie reduzir o efeito de temperaturas nocivas em outras, como

demonstrado para *Acyrtosiphon pisum*, não parece tão evidente na associação *T. galloi* – *Wolbachia* (MONTLOR et al., 2002).

5 CONCLUSÕES

- A eliminação de *Wolbachia* aumenta a longevidade de adultos de *Trichogramma galloi*;
- A associação *Wolbachia* – *Trichogramma galloi* não influencia a capacidade reprodutiva de fêmeas do parasitoide;
- A linhagem de *Wolbachia* associada a *Trichogramma galloi* induz telitoquia parcial na progênie;
- Machos de *T. galloi*, infectados ou não por *Wolbachia*, transferem nutrientes via cópula e influenciam a capacidade reprodutiva das fêmeas;
- A longevidade de fêmeas de *T. galloi* não-infectadas por *Wolbachia* expostas ao estresse térmico por 6 h é drasticamente reduzida;
- Fêmeas não-infectadas são mais longevas que fêmeas infectadas por *Wolbachia* quando expostas ao estresse térmico;
- Fêmeas não-infectadas apresentam redução mais acentuada na longevidade do que fêmeas infectadas por *Wolbachia* à medida que a exposição ao estresse térmico aumenta;
- O estresse térmico afeta a fecundidade de fêmeas de *T. galloi*, independentemente de sua associação com *Wolbachia*.

REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, R.P. de; VAN LENTEREN, J.C.; STOUTHAMER, R. Does *Wolbachia* infection affect *Trichogramma atopovirilia* behaviour? **Brazilian Journal of Biology**, São Carlos, v. 70, p. 435-442, 2010.
- AMICE, G.; VERNON, P.; OUTREMAN, Y.; VAN ALPHEN, J.; VAN BAAREN, J. Variability in responses to thermal stress in parasitoids. **Ecological Entomology**, London, v. 33, p. 701-708, 2008.
- ARAKAKI, N.; NODA, H.; YAMAGISHI, K. *Wolbachia*-induced parthenogenesis in the egg parasitoid *Telenomus nawai*. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, Dordrecht, v. 96, p. 177-184, 2000.
- ARBOGAST, R.T. Mortality and reproduction of *Ephesia cautella* and *Plodia interpunctella* exposed as pupae to high temperatures. **Environmental Entomology**, College Park, v. 10, p. 708-710, 1981.
- BALDO, L.; PRENDINI, L.; CORTHALS, A.; WERREN, J.H. *Wolbachia* are present in Southern African scorpions and cluster with Supergroup F. **Current Microbiology**, New York, v. 55, p. 367-373, 2007.
- BALDO, L.; HOTOPP, J.C.D.; JOLLEY, K.A.; BORDENSTEIN, S.R.; BIBER, S.A.; CHOUDHURY, R.R.; HAYASHI, C.; MAIDEN, M.C.J.; TETTELIN, H.; WERREN, J.H. Multilocus sequence typing system for the endosymbiont *Wolbachia pipientis*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 72, p. 7098-7110, 2006.
- BANDI, C.; ANDERSON, T.J.C.; GENCHI, C.; BLAXTER, M.L. Phylogeny of *Wolbachia*-like bacteria in filarial nematodes. **Proceedings of the Royal Society**, London, v. 265, p. 2407-2413, 1998.
- BAUMANN, P. Bacteriocyte-associated endosymbionts of plant sap-sucking insects **Annual Review of Microbiology**, Palo Alto, v. 59, p. 155-189, 2005.
- BAUMANN, P.; BAUMANN, L.; LAI, C.; ROUHBAKHSH, D.; MORAN, N.A.; CLARK, M.A. Genetics, physiology, and evolutionary relationships of the genus *Buchnera*; intracellular symbionts of aphids. **Annual Review of Microbiology**, Palo Alto, v. 49, p. 55-94, 1995.
- BAZZOCCHI, C.; JAMNOGLUK, W.; O' NEILL, S.; ANDERSON, T.; GENCHI, C.; BANDI, C. *wsp* gene sequences from the *Wolbachia* of filarial nematodes. **Current Microbiology**, New York, v. 41, p. 96-100, 2000.
- BERTICAT, C.; ROUSSET, F.; RAYMOND, M.; BERTHOMIEU, A.; WEILL, M. High *Wolbachia* density in insecticide-resistant mosquitoes. **Proceedings of the Royal Society**, London, v. 269, p. 1413-1416, 2002.

- BIAN, G.; XU, Y.; LU, P.; XIE, Y.; XI, Z. The endosymbiotic bacterium *Wolbachia* induces resistance to dengue virus in *Aedes aegypti*. **Plos Pathogens**, San Francisco, v. 6, p. 1-10, 2010.
- BOTELHO, P.S.M. Eficiência de *Trichogramma* em campo. In: PARRA, J.R.P.; ZUCCHI, R.A. (Ed.). **Trichogramma e o controle biológico aplicado**. Piracicaba: FEALQ, 1997. cap. 11, p. 303-318.
- BOUCHON, D.; CORDAUX, R.; GRÈVE, P. Feminizing *Wolbachia* and the evolution of sex determination in isopods. In: BOURTZIS, K.; MILLER, T.A. (Ed.). **Insect symbiosis**. Boca Raton: CRC Press, 2008. v. 3, p. 273-294.
- BOUCHON, D.; RIGAUD, T.; JUCHAULT, P. Evidence for widespread *Wolbachia* infection in isopod crustaceans: molecular identification and host feminization. **Proceedings of the Royal Society**, London, v. 265, p. 1085-1090, 1998.
- BOURTZIS, K.; MILLER, T.A. **Insect symbiosis**. Boca Raton: CRC Press, 2003. 276 p.
- BRAIG, H.R.; GUZMAN, H.; TESH, R.B.; O'NEILL, S.L. Replacement of the natural *Wolbachia* symbiont of *Drosophila simulans* with a mosquito counterpart. **Nature**, London, v. 367, p. 453-455, 1994.
- BRAIG, H.R.; ZHOU, W.G.; DOBSON, S.L.; O'NEILL, S.L. Cloning and characterization of a gene encoding the major surface protein of the bacterial endosymbiont *Wolbachia pipientis*. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 180, p. 2373-2378, 1998.
- BREEUWER, J.A.J.; JACOBS, G. *Wolbachia*: intracellular manipulators of mite reproduction. **Experimental and Applied Acarology**, Amsterdam, v. 20, p. 421-434, 1996.
- BROWNLIE, J.C.; ADAMSKI, M.; SLATKO, B.; MCGRAW, E.A. Diversifying selection and host adaptation in two endosymbiont genomes. **BMC Evolutionary Biology**, New York, v.7, p. 68, 2007.
- BUCHNER, P. **Endosymbiosis of animals with plant microorganisms**. New York: Interscience, 1965. 909 p.
- COMINS, H.N.; WELLINGS, P.W. Density-related parasitoid sex ratio: influence on host-parasitoid dynamics. **Journal Animal Ecology**, London, v. 54, p. 583-594, 1985.
- CÔNSOLI, F.L.; PARRA, J.R.P. Efeito do fotoperíodo na biologia de *Trichogramma galloi*. **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, Jaboticabal, v. 23, p. 467-472, 1994.
- _____. Effects of constant and alternating temperatures on *Trichogramma galloi* Zucchi (Hym., Trichogrammatidae) biology. II. Parasitism capacity and longevity. **Journal of Applied Entomology**, Berlin, v. 119, p. 667-670, 1995.

_____. Biology of *Trichogramma galloi* and *T. pretiosum* (Hymenoptera: Trichogrammatidae) reared in vitro and in vivo. **Annals of the Entomological Society of America**, College Park, v. 89, p. 828-834, 1996.

CORDAUX, R.; MICHEL-SALZAT, A.; BOUCHON, D. *Wolbachia* infection in crustaceans: novel hosts and potential routes for horizontal transmission. **Journal of Evolutionary Biology**, Basel, v. 14, p. 237-243, 2001.

CUI, X.H.; WAN, F.H.; XIE, M.; LIU, T.X. Effects of heat shock on survival and reproduction of two whitefly species, *Trialeurodes vaporariorum* and *Bemisia tabaci* Biotype B. **Journal of Insect Science**, Madison, v. 8, p. 1-10, 2008.

DE BARRO P.J., HART P.J. Antibiotic curing of parthenogenesis in *Eretmocerus mundus* (Australian parthenogenic form). **Entomologia Experimentalis et Applicata**, Dordrecht, v. 99, p. 225-230, 2001.

DEAN, J.; DOBSON, S. Characterization of *Wolbachia* infections and interspecific Crosses of *Aedes* (*Stegomyia*) *polynesiensis* and *Ae.* (*Stegomyia*) *riversi* (Diptera: Culicidae). **Journal of Medical Entomology**, Lanham, v. 41, p. 894-900, 2004.

DEAN, M.D. A *Wolbachia*-associated fitness benefit depends on genetic background in *Drosophila simulans*. **Proceedings of the Royal Society**, London, v. 273, p. 1415-1420, 2006.

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

DENLINGER, D.L.; LEE Jr, R.E. Physiology of heat sensitivity. In: HALLMAN, G.J.; DENLINGER, D.L. **Temperature sensitivity in insects and application in integrated pest management**. Boulder: Westview Press. 1998. cap. 3, p. 7-57.

DOBSON; S.L.; RATTANADECHAKUL, W. A Novel Technique for Removing *Wolbachia* Infections from *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae). **Journal of Medical Entomology**, Lanham, v 30, p. 844-849, 2001.

DOBSON, S.L.; MARSLAND, E.J.; VENETI, Z.; BOURTZIS, K.; O'NEILL, S.L. Characterization of *Wolbachia* host cell range via the in vitro establishment of infections. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 68, p. 656-660, 2002.

DOBSON, S.L.; BOURTZIS, K.; BRAIG, H.R.; JONES, B.F.; ZHOU, W.; ROUSSET, F.; O'NEILL, S.L. *Wolbachia* infections are distributed throughout insect somatic and germ line tissues. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, Oxford, v. 29, p. 153-160, 1999.

DURON, O.; LABBÉ, P.; BERTICAT, C.; ROUSSET, F.; GUILLOT, S.; RAYMOND, M.; WEILL, M. High *Wolbachia* density correlates with cost of infection for insecticide resistant *Culex pipiens* mosquitoes. **Evolution**, New York, v. 60, p. 303-314, 2006.

DURON, O.; BOUCHON, D.; BOUTIN, S.; BELLAMY, L.; ZHOU, L.; ENGELSTÄDTER, J.; HURST, G.D. The diversity of reproductive parasites among arthropods: *Wolbachia* do not walk alone. **BMC Biology**, London, v. 6, p. 1-12, 2008.

DYER, K.A.; JAENIKE, J. Evolutionarily stable infection by a male-killing endosymbiont in *Drosophila innubila*: molecular evidence from the host and parasite genomes. **Genetics**, Austin, v. 168, p. 1443-1455, 2004.

DYSON, E.A.; HURST, G.D.D. Persistence of an extreme sex-ratio bias in a natural population. **Proceedings of National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 101, p. 6520-6523, 2004.

DYSON, E.A.; KAMATH, M.K.; HURST, G.D.D. *Wolbachia* infection associated with all-female broods in *Hypolimnas bolina* (Lepidoptera: Nymphalidae): evidence for horizontal transmission of a butterfly male killer. **Heredity**, London, v. 88, p. 166-171, 2002.

DUMLER, J.S.; BARBET, A.F.; BEKKER, C.P.; DASCH, G.A.; PALMER, G.H.; RAY, S.C.; RIKIHISA, Y.; RURANGIRWA, F.R. Reorganization of genera in the families Rickettsiaceae and Anaplasmataceae in the order Rickettsiales: unification of some species of *Ehrlichia* with *Anaplasma*, *Cowdria* with *Ehrlichia* and *Ehrlichia* with *Neorickettsia*, descriptions of six new species combinations and designation of *Ehrlichia equi* and 'HGE agent' as subjective synonyms of *Ehrlichia phagocytophila*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 51, p. 2145-2165, 2001.

ENGELSTADTER, J.; TELSCHOW, A.; YAMAMURA, N. Coexistence of cytoplasmic incompatibility and male-killing-inducing endosymbionts, and their impact on host gene flow. **Theoretical Population Biology**, New York, v. 73, p. 125-133, 2008.

FIALHO, R.F.; STEVENS, L. Male-killing *Wolbachia* in a flour beetle. **Proceedings of the Royal Society**, London, v. 267, 1469-1474, 2000.

FLEURY, F.; VAVRE, F.; RIS, N.; FOUILLET, P.; BOULETREAUX, M. Physiological cost induced by the maternally-transmitted endosymbiont *Wolbachia* in the *Drosophila* parasitoid *Leptopilina heterotoma*. **Parasitology**, Cambridge, v. 121, p. 493-500, 2000.

FRY, A.J.; PALMER, M.R.; RAND, D.M. Variable fitness effects of *Wolbachia* infection in *Drosophila melanogaster*. **Heredity**, London, v. 93, p. 379-389, 2004.

GARCIA, P.V.; WAJNBERG, E.; OLIVEIRA, M.L.M.; TAVARES, J. Is the parasitization capacity of *Trichogramma cordubensis* influenced by the age of the females? **Entomologia Experimentalis et Applicata**, Dordrecht, v. 98, p. 219-224, 2001.

GIORDANO, R.; O'NEILL, S.L.; ROBERTSON, H.M. *Wolbachia* infections and the expression of cytoplasmic incompatibility in *Drosophila sechellia* and *D. mauritiana*. **Genetics**, Austin, v. 140, p. 1307-1317, 1995.

GIRIN, C.; BOULETREAU, M. Microorganism-associated variation in host infestation efficiency in a parasitoid wasp, *Trichogramma bourarachae* (Hymenoptera: Trichogrammatidae). **Cellular and Molecular Life Sciences**, Basel, v. 51, p. 398-401, 1995.

GOMEZ-VALERO, L.; SORIANO-NAVARRO, M.; PÉREZ-BROCAL, V.; HEDDI, A.; MOYA, A.; GARCÍA-VERDUGO, J.M.; LATORRE, A. Coexistence of *Wolbachia* with *Buchnera aphidicola* and a Secondary Symbiont in the Aphid *Cinara cedri* **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 186, p. 6626-6633, 2004.

GOTOH, T.; NODA, H.; HONG, X-Y. *Wolbachia* distribution and cytoplasmic incompatibility based on a survey of 42 spider mite species (Acari: Tetranychidae) in Japan. **Heredity**, London, v. 91, p. 208-216, 2003.

GOTTLIEB, Y.; ZCHORI-FEIN, E. Irreversible thelytokous reproduction in *Muscidifurax uniraptor*. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, Dordrecht, v. 100, p. 271-278, 2001.

GRENIER, S.; PINTUREAU, B.; HEDDI, A.; FRANÇOIS LASSABLIÈRE, F.; JAGER, C., LOUIS, C.; KHATCHADOURIAN, C. Successful horizontal transfer of *Wolbachia* symbionts between *Trichogramma* wasps. **Proceedings of the Royal Society**, London, v. 265, p. 1441-1445, 1998.

HARCOMBE, W.; HOFFMANN, A. *Wolbachia* effects in *Drosophila melanogaster*: in search of fitness benefits. **Journal of Invertebrate Pathology**, San Diego, v. 87, p. 45-50, 2004.

HARIRI, A.R.; WERREN, J.H.; WILKINSON, G.S. Distribution and reproductive effects of *Wolbachia* in stalk-eyed flies (Diptera: Diopsidae). **Heredity**, London, v. 81, 254-260, 1998.

HARRIS, H.L.; BRENNAN, L.J.; KEDDIE, B.A.; BRAIG, H.R. Bacterial symbionts in insects: balancing life and death. **Symbiosis**, Philadelphia, v. 51, p. 37-53, 2010.

HARTLEY, H.O. The maximum F-ratio as a short cut test for heterogeneity of variances. **Biometrika**, London, v. 37, p. 308-312, 1950.

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

HEATH, B.D.; BUTCHER, R.D.; WHITFIELD, W.G.; HUBBARD, S.F. Horizontal transfer of *Wolbachia* between phylogenetically distant insect species by a naturally occurring mechanism. **Current Biology**, London, v. 9, p. 313-316, 1999.

HERCUS, M.J.; LOESCHCKE, V.; RATTAN, S.I.S. Lifespan extension of *Drosophila melanogaster* through hormesis by repeated mild heat stress. **Biogerontology**, Denmark, v. 4, p. 149-156, 2003.

HEDGES, L.; BROWNLIE, J.C.; O'NEILL, S.; JOHNSON, K.N. *Wolbachia* and virus protection in insects. **Science**, Washington, v. 322, p. 702, 2008.

HERTIG; M.; WOLBACH, S.B. Studies on Rickettsia-like microorganisms in insects. **Journal of International Medical Research**, Northampton, v. 44, p. 329-374, 1924.

HILGENBOECKER, K.; HAMMERSTEIN, P.; SCHLATTMANN, P.; TELSCHOW, A.; WERREN, J.H. How many species are infected with *Wolbachia*?- A statistical analysis of current data. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 281, p. 215-220, 2008.

HOFFMANN, A.A. The cost of acclimation. **Trends in Ecology and Evolution**, Amsterdam, v. 10, p. 1-2, 1995

HOFFMANN, A.A.; TURELLI, M.; HARSHMAN, L.G. Factors affecting the distribution of cytoplasmic incompatibility in *Drosophila simulans*. **Genetics**, Austin, v. 126, p. 933-948, 1990.

HOHMANN, C.L.; LUCK, R.F. Effect of temperature on the development and thermal requirements of *Wolbachia*-infected and antibioticly cured *Trichogramma kaykai* Pinto and Stouthamer (Hymenoptera: Trichogrammatidae). **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, Jaboticabal, v. 29, p. 497-505, 2000

HOHMANN, C.L.; LUCK, R.F.; STOUTHAMER, R. Effect of *Wolbachia* on the Survival and Reproduction of *Trichogramma kaykai* Pinto & Stouthamer (Hymenoptera: Trichogrammatidae). **Neotropical Entomology**, Londrina, v. 30, p. 607-612, 2001.

HORJUS, M.; STOUTHAMER, R. Does infection with thelytoky-causing *Wolbachia* in pre-adult and adult life stages influence the adult fecundity of *Trichogramma deion* and *Muscidifurax uniraptor*? **Proceedings of the Section Experimental and Applied Entomology**, London, v. 6, p. 35-40, 1995.

HORNETT, E.A.; CHARLAT, S.; DUPLOUY, A.M.R.; DAVIES, N.; RODERICK, G.K. WEDELL, N.; HURST, G.D.D. Evolution of Male-Killer Suppression in a Natural Population. **Plos Biology**, Cambridge, v. 4, p. 1643-1648, 2006.

HOSOKAWA, T.; KOGA, R.; KIKUCHI, Y.; MENG, XIAN-YING; FUKATSU, T. *Wolbachia* as a bacteriocyte-associated nutritional mutualist. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 107, p. 769-774, 2010.

HUIGENS, M.E.; LUCK, R.F.; KLAASSEN, R.H.G.; MAAS, M.F.P.M.; TIMMERMANS, M.J.T.N.; STOUTHAMER, R. Infectious parthenogenesis. **Nature**, London, v. 405, 2000.

HURST, G.D.D.; MAJERUS, M.E.N. Why do maternally inherited microorganisms kill males? **Heredity**, London, v. 71, p. 81-95, 1993.

HURST, G.D.D.; JOHNSON, A.P.; VON DER SCHULENBUR, J.H.G.; FUYAMA, Y. Male-killing *Wolbachia* in *Drosophila*: a temperature-sensitive trait with a threshold bacterial density. **Genetics**, Austin, v. 156, p. 699-709, 2000.

HURST, G.D.D.; SCHULENBURG, J.H.G.V.D.; MAJERUS, T.M.O.; BERTRAND, D., ZACHAROV, I.; BAUNGAARD, J.; VOLKL, W.; STOUTHAMER, R.; MAJERUS, MEN. Invasion of one insect species, *Adalia bipunctata*, by two different male-killing bacteria. **Insect Molecular Biology**, Oxford, v. 8, p. 133-139, 1999.

JAENIKE, J. Spontaneous emergence of a new *Wolbachia* phenotype. **Evolution**, New York, v. 61, p. 2244-2252, 2007

JEYAPRAKASH, A.; HOY, M.A. Long PCR improves *Wolbachia* DNA amplification: wsp sequences found in 76% of sixty-three arthropod species. **Insect Molecular Biology**, Oxford, v. 9, p. 393-405, 2000

JIGGINS, F.M.; HURST, G.D.D.; DOLMAN, C.E.; MAJERUS, M.E.N. High-prevalence male-killing *Wolbachia* in the butterfly *Acraea encedana*. **Journal of Evolutionary Biology**, Basel, v. 13, p. 495-501, 2000.

JOHANOWICZ, D.L.; HOY, M.A. Experimental induction and termination of non-reciprocal reproductive incompatibilities in a parahaploid mite. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, Dordrecht, v. 87, p. 51-58, 1998.

KAGEYAMA, D.; NISHIMURA, G., HOSHIZAKI, S.; ISHIKAWA, Y. Feminizing *Wolbachia* in an insect, *Ostrinia furnacalis* (Lepidoptera: Crambidae). **Heredity**, London, v. 88: p. 444-449, 2002.

_____. Two kinds of sex ratio distorters in a moth, *Ostrinia scapularis*. **Genome**, Montreux, v. 46, p. 974-982, 2003

KAMBRIS, Z.; COOK, P.E.; PHUC, H.K.; SINKINS, S.P. Immune activation by life-shortening *Wolbachia* and reduced filarial competence in mosquitoes. **Science**, Washington, v. 326, p. 134-136, 2009.

KLASSON, L.; WESTBERG, J.; SAPOUNTZIS, P.; NASLUND, K.; YLVA LUTNAES; DARBY, A.C. The mosaic genome structure of the *Wolbachia* wRi strain infecting *Drosophila simulans*. **Proceedings of National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 106, p. 5725-5730, 2009.

KLEPZIG, K.D.; ADAMS, A.S.; HANDELSMAN, J.; RAFFA, K.F. Symbioses: A key driver of insect physiological processes, ecological interactions, evolutionary diversification, and impacts on humans. **Environmental Entomology**, College Park, v. 38, p. 67-77, 2009.

KOGA, R.; TSUCHIDA, T.; FUKATSU, T. Changing partners in an obligate symbiosis: a facultative endosymbiont can compensate for loss of the essential endosymbiont *Buchnera* in an aphid. **Proceedings of the Royal Society**, London, v. 270, p. 2543-2550, 2003.

KORB, J.; AANEN, D.K. The evolution of uniparental transmission of fungal symbionts in fungus-growing termites (Macrotermitinae). **Behavioral Ecology and Sociobiology**, New York, v. 53, p. 65-71, 2003.

KREMER, N.; VORONIN, D.; CHARIF, D.; MAVINGUI, P.; BERTRAND, M.; VAVRE, F. *Wolbachia* interferes with ferritin expression and iron metabolism in insects. **Plos Pathogens**, San Francisco, v. 5, p. 1-12, 2009.

LE BOURG, E. Hormetic protection of *Drosophila melanogaster* middle-aged male flies from heat stress by mildly stressing them at young age. **Naturwissenschaften**, Berlin, v. 92, p. 293-296, 2005.

LIMA FILHO, M.; LIMA, J.O.G. Massas de ovos de *Diatraea saccharalis* (Fabr.) (Lepidoptera: Pyralidae) em cana-de-açúcar: número de ovos e porcentagem de parasitismo por *Trichogramma* spp. (Hymenoptera: Trichogrammatidae) em condições naturais. **Neotropical Entomology**, Londrina, v. 30, p. 483-488, 2001.

LO, N.; CASIRAGHI, M.; SALATI, E.; BAZZOCCHI, C.; BANDI, C. How many *Wolbachia* supergroups exist? **Molecular Biology and Evolution**, Chicago, v. 19, p. 341-346, 2002.

LO, N.; PARASKEVOPOULOS, C.; BOURTZIS, K.; O'NEILL, S.L.; WERREN, J.H.; BORDENSTEIN, S.R.; BANDI, C. Taxonomic status of the intracellular bacterium *Wolbachia pipientis*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 57, p. 654-657, 2007.

LOPES, J.R.S.; PARRA, J.R.P. Efeito da idade do ovo do hospedeiro natural e alternativo no desenvolvimento e parasitismo de duas espécies de *Trichogramma*. **Revista da Agricultura**, Piracicaba, v. 66, p. 221-244, 1991.

MARGRAF, N.; GOTTHARD, K.; RAHIER, M. The growth strategy of an alpine beetle: maximization or individual growth adjustments in relation to seasonal time horizons? **Functional Ecology**, London, v. 17, p. 605-610, 2003.

MIN, K.T.; BENZER, S. *Wolbachia*, normally a symbiont of *Drosophila*, can be virulent, causing degeneration and early death. **Proceedings of National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 94, p. 10792-10796, 1997.

MINOIS, N. Longevity and aging: beneficial effects of exposure to mild stress. **Biogeront**, Denmark, v. 1, p. 15-29, 2000.

MIRA, A.; MORAN, N.A. Estimating population size and transmission bottlenecks in maternally transmitted endosymbiotic bacteria. **Microbial Ecology**, New York, v. 44, p. 137-143, 2002.

MIRONIDIS, G.K.; SAVOPOULOU-SOULTANI, M. Effects of heat shock on survival and reproduction of *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) adults. **Journal of Thermal Biology**, New York, v. 35, p. 59-69, 2010.

MONTLLOR, C.; MAXMEN, A.; PURCELL, A. Facultative bacterial endosymbionts benefit pea aphids *Acyrtosiphon pisum* under heat stress. **Ecological Entomology**, London, v. 27, p. 189-195, 2002.

- MOREIRA, L.A.; ITURBE-ORMAETXE, I.; JEFFERY, J.A.; LU, G.; PYKE, A.T.; HEDGES, L.M.; ROCHA, B.C.; HALL-MENDELIN, S.; DAY, A.; RIEGLER, M.; HUGO, L.E.; JOHNSON, K.N.; KAY, B.H.; MCGRAW, E.A.; VAN DEN HURK, A.F.; RYAN, P.A.; O'NEIL, S.L. A *Wolbachia* symbiont in *Aedes aegypti* limits infection with Dengue, Chikungunya, and Plasmodium. **Cell**, Cambridge, v. 139, p. 1268-1278, 2009.
- NEGRI, I.; PELLECCIA, M.; MAZZOGLIO, P.J.; PATETTA, A.; ALMA, A. Feminizing *Wolbachia* in *Zyginidia pullula* (Insecta, Hemiptera), a leafhopper with an XX/X0 sex-determination system. **Proceedings of the Royal Society**, London, v. 273, p. 2409-2416, 2006.
- NELDER, J.A.; WEDDERBURN, R.W.M. Generalized linear models. **Journal of the Royal Statistical Society**, London, v. 135, p.370-84, 1972.
- OLIVEIRA, H. N.; PARATISSOLI, D.; ZANUNCIO, J. C.; SERRÃO, J. E. Influência da idade dos ovos de *Oxydia vesulia* no parasitismo de *Trichogramma maxacalii*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 38, p. 551-554, 2003
- OLIVER, K.M.; RUSSELL, J.A.; MORAN, N.A.; HUNTER, M.S. Facultative bacterial symbionts in aphids confer resistance to parasitic wasps. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 100, p. 1803–1807, 2003.
- O'NEILL, S.L.; GIORDANO, R.; COLBERT, A.M.E.; KARR, T.L., ROBERTSON, H.M. 16S rRNA phylogenetic analysis of the bacterial endosymbionts associated with cytoplasmic incompatibility in insects. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 88, p. 2699–2702, 1992.
- PANNEBAKKER, B.A.; LOPPIN, B.; ELEMANS, C.P.; HUMBLLOT, L.; VAVRE, F. Parasitic inhibition of cell death facilitates symbiosis. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 104, p. 213-215, 2007.
- PARRA, J.R.P.; ZUCCHI, R.A. *Trichogramma* in Brazil: feasibility of use after twenty years of research. **Neotropical Entomology**, Londrina, v. 33, p. 271-281, 2004.
- _____. Utilização de *Trichogramma* no Brasil: situação atual e desafios. In: VENZON, M.; PAULA JÚNIOR, T.J.; PALLINI, A. (Ed.). **Avanços no controle alternativo de pragas e doenças**. Viçosa: EPAMIG; CTZM. 2008. cap. 1, p. 1-29.
- PARRA, J.R.P.; BOTELHO, P.S.M.; CÔRREA-FERREIRA, B.S.; BENTO, J.M.S. Controle biológico: terminologia. In: PARRA, J.R.P.; BOTELHO, P.S.M.; CÔRREA-FERREIRA, B.S.; BENTO, J.M.S. (Ed.). **Controle biológico no Brasil: parasitoides e predadores**. Barueri: Manole, 2002. cap. 1, p. 1-16.
- PENG, Y.; NIELSEN, J.E.; CUNNINGHAM, J.P.; MCGRAW, E. A. *Wolbachia* infection alters olfactory-cued locomotion in *Drosophila* spp. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 74, p. 3943–3948, 2008.

PEREIRA-BARROS, J.L.; FORTI BROGLIO-MICHELETTI, S.M.; SANTOS, A.J.N. dos; CARVALHO, L.W.T. de; CARVALHO, L.H.T. de; OLIVEIRA, C.J.T. de. Aspectos biológicos de *Trichogramma galloi* Zucchi, 1988 (Hymenoptera: Trichogrammatidae) criados em ovos de *Diatraea saccharalis* (Fabricius, 1794) (Lepidoptera: Crambidae). **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 29, p. 714-718, 2005.

PIJLS, J.W.A.M.; VAN STEENBERGEN, H.J.; VAN ALPHEN, J.J.M. Asexuality cured: the relations and differences between sexual and asexual *Apoanagyrus diversiconis*. **Heredity**, London, v. 76, p. 506-513, 1996.

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

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

PINTUREAU, B.; BOLLAND, P. A *Trichogramma* species showing a better adaptation to high temperatures than its symbionts. **Biocontrol Science and Technology**, London, v. 11, p. 13-20, 2001.

PLANTARD, O.; RASPLUS, J.-Y.; MONDOR, G.; CLAINCHE, I.L.E.; SOLIGNAC, M. Distribution and phylogeny of *Wolbachia* inducing thelytoky in Rhoditini and “Aylacini” (Hymenoptera:Cynipidae). **Insect Molecular Biology**, Oxford, v. 8, p. 185-191, 1999.

POIANI, A. Complexity of seminal fluid: a review. **Behavioral Ecology and Sociobiology**, New York, v. 60, p. 289-310, 2006.

PRESGRAVES, D.C. A genetic test of the mechanism of *Wolbachia*-induced cytoplasmic incompatibility in *Drosophila*. **Genetics**, Austin, v. 154, p. 771-776, 2000.

QUERINO, R.B.; ZUCCHI, R.A. An illustrated key to the species of *Trichogramma* (Hymenoptera: Trichogrammatidae) recorded in Brazil. **Zootaxa**, New Zealand, v. 1073, p. 37-70, 2005.

R DEVELOPMENT CORE TEAM. **A language and environment for statistical computing**. Vienna: R Foundation for Statistical Computing, 2011. Disponível em: <<http://www.R-project.org>>. Acesso em: 28 mar. 2011.

RASGON, J.L. *Wolbachia* and *Anopheles* mosquitoes. In: BOURTZIS, K.; MILLER, T.A. **Insects symbiosis**. Boca Raton: CRC Press, 2009. chap. 14, p. 321-327.

RELMAN, D.A. Til death do us part: coming to terms with symbiotic relationships. **Nature**, London, v. 6, p. 721-724, 2008.

- REYNOLDS, K.T.; THOMSON, L.J.; HOFFMANN, A.A. The effects of host age, host nuclear background and temperature on phenotypic effects of the virulent *Wolbachia* strain *popcorn* in *Drosophila melanogaster*. **Genetics**, Austin, v. 164, p. 1027-1034, 2003.
- RIGAUD, T. Inherited microorganisms and sex determination of arthropod hosts. In: O'NEILL, S.L.; HOFFMANN, A.A.; WERREN, J.H. (Ed.). **Influential passengers: inherited microorganisms and arthropod reproduction**. Oxford: Oxford University Press, 1997. p. 81-101.
- RIGAUD, T., MOREAU, J.; JUCHAULT, P. 1999. *Wolbachia* infection in the terrestrial isopod *Oniscus asellus*: sex ratio distortion and effect on fecundity. **Heredity**, London, v. 83, p. 469-475, 1999.
- ROS, V.I.; FLEMING, V.M.; FEIL, E.J.; BREEUWER, J.A.J. How diverse is the genus *Wolbachia*? Multiple-gene sequencing reveals a putatively new *Wolbachia* supergroup recovered from spiders mites (Acari: Tetranychidae). **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 75, p. 1036-1043, 2009.
- ROUSSET, F.; BOUCHON, D.; PINTUREAU, B.; JUCHAULT, P.; SOLIGNAC, M. *Wolbachia* endosymbionts responsible for various alterations of sexuality in arthropods. **Proceedings of the Royal Society**, London, v. 250, p. 91-98, 1992.
- ROWLEY, S.M.; RAVEN, R.J.; MCGRAW, E.A. *Wolbachia pipientis* in Australian spiders. **Current Microbiology**, New York, v. 49, p. 208-214, 2004.
- SÁ, L.A.; PARRA, J.R.P. Biology and parasitism of *Trichogramma pretiosum* Riley (Hym., Trichogrammatidae) on *Ephestia kuehniella* (Zeller) (Lep., Pyralidae) and *Heliothis zea* (Boddie) (Lep., Noctuidae) eggs. **Journal of Applied Entomology**, Berlin, v. 118, p. 38-43, 1994.
- SCARBOROUGH, C.L.; JULIA FERRARI, J.; GODFRAY, H.C.J. Aphid protected from pathogen by endosymbiont. **Science**, Washington, v. 310, p. 1781, 2005.
- SCHILTHUIZEN, M.; STOUTHAMER, R. Horizontal transmission of parthenogenesis inducing microbes in *Trichogramma* wasps. **Proceedings of the Royal Society**, London, v. 264, p. 361-66, 1997.
- SCOTT, M.; BERRIGAN, D.; HOFFMANN, A.A. Costs and benefits of acclimation to elevated temperatures in *Trichogramma carverae*. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, Dordrecht, v. 85, p. 211-219, 1997.
- SHAPIRO, S.S.; WILK, M.B. An analysis of variance test for normality (complete samples). **Biometrika**, London, v. 52, p. 591-611, 1965.
- SINKINS, S.P.; WALKER, T.; LYND, A.R.; STEVEN, A.R.; MAKEPEACE, B.L.; GODFRAY, H.C.; PARKHILL, J. *Wolbachia* variability and host effects on crossing type in *Culex* mosquitoes. **Nature**, New York, v. 436, p. 257-260, 2005.

SNOOK, R.R.; CLELAND, S.Y.; WOLFNER, M.F.; KARR, T.L. Offsetting effects of *Wolbachia* infection and heat shock on sperm production in *Drosophila simulans*: analyses of fecundity, fertility and accessory gland proteins. **Genetics**, Austin, v. 155, p. 167-178, 2000.

STEVENS, L.; GIORDANO, R.; FIALHO, R.F. Male-killing, nematode infections, bacteriophage infection, and virulence of cytoplasmic bacteria in the genus *Wolbachia*. **Annual Review of Ecology, Evolution and Systematics**, Palo Alto, v. 32, p. 519-524, 2001.

STOLK; C.; STOUTHAMER, R. Influence of cytoplasmic incompatibility-inducing *Wolbachia* on the fitness of the parasitoid wasp *Nasonia vitripennis*. **Proceedings Experimental and Applied Entomology**, Amsterdam, v. 7, p. 33-37, 1996.

STOUTHAMER, R. The use of sexual versus asexual wasps in biological control. **Entomophaga**, Paris, v. 38, p. 3-6, 1993.

_____. *Wolbachia* induced parthenogenesis. In: O'NEIL, S.C.; WERREN, J.H.; HOFFMAN, A.A. (Ed.). **Influential passengers, inherited microorganisms and arthropod reproduction**. Oxford: Oxford University Press, 1997. p. 102-124.

STOUTHAMER; R.; KAZMER, D.J. Cytogenetics of microbe-associated parthenogenesis and its consequences for gene flow in *Trichogramma* wasps. **Heredity**, London, v. 73, p. 317-327, 1994.

STOUTHAMER, R.; LUCK, R.F. Influence of microbe-associated parthenogenesis on the fecundity of *Trichogramma deion* and *Trichogramma pretiosum*. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, Dordrecht, v. 67, p. 183-192, 1993.

STOUTHAMER; R.; WERREN, J.H. Microbes associated with parthenogenesis in wasps of the genus *Trichogramma*. **Journal of Invertebrate Pathology**, San Diego, v. 61, p. 6-9, 1993.

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

STOUTHAMER, R.; LUCK, R.F.; HAMILTON, W.D. Antibiotics cause parthenogenetic *Trichogramma* (Hymenoptera: Trichogrammatidae) to revert to sex. **Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America**, Washington, v. 87, p. 2424-2427, 1990.

STOUTHAMER, R.; LUKO, S., MAK, F. Influence of parthenogenesis *Wolbachia* on host fitness. **Norwegian Journal of Agricultural Sciences**, As, v. 16, p. 117-122, 1994.

STOUTHAMER, R.; PINTO, J.D.; PLATNER, G.R.; LUCK, R.F. Taxonomic status of thelytokous forms of *Trichogramma* (Hymenoptera: Trichogrammatidae). **Annals of the Entomological Society of America**, Columbus, v. 83, p. 475-481, 1990.

TAMMARU, T.; NYLIN, S.; RUOHOMAKI, K.; GOTTHARD, K. Compensatory Responses in Lepidopteran Larvae: A test of growth rate maximization. **Oikos**, Rio de Janeiro, v. 107, p. 352-362, 2004.

TANAKA; Y.; KAYA, H.K. **Insect pathology**. New York: Academic Press, 1993. 666 p.

TAYLOR, M.J.; HOERAUF, A. *Wolbachia* bacteria of filarial nematodes. **Parasitology Today**, Amsterdam, v. 15, p. 437-442, 1999.

TEIXEIRA, L.; FERREIRA, A.; ASHBURNER, M. The bacterial symbiont *Wolbachia* induces resistance to RNA viral infections in *Drosophila melanogaster*. **Plos Biology**, Cambridge, v. 6, p. 2753-2763, 2008.

THAO, M.L.; BAUMANN, P. Evolutionary relationships of primary prokaryotic endosymbionts of whiteflies and their hosts **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 70, p. 3401-3406, 2004.

TSUCHIDA, T.; KOGA, R.; FUKATSU, T. Host plant specialization governed by facultative symbiont. **Science**, Washington, v. 303, p. 1989, 2004.

VAN LENTEREN, J.C.; HALE, A.; KLAPWIJK, J.N.; VAN SCHELT, J.; STEINBERG, S. Guidelines for quality control of commercially produced natural enemies. In: VAN LENTEREN J.C. (Ed.). **Control and production of biological control agents: theory and testing procedures**. Wallingford: CABI Publ., 2003. chap. 19, p. 265-303.

VAN MEER, M.M.M. **Phylogeny and host interactions of thelytoky inducing *Wolbachia* in Hymenoptera**. 1999. 118 p. Thesis (PhD) -Wageningen Agricultural University, Wageningen, 1999

VAVRE, F.; GIRIN, C.; BOULETREAU, M. Phylogenetic status of a fecundity-enhancing *Wolbachia* that does not induce thelytoky in *Trichogramma*. **Insect Molecular Biology**, Oxford, v. 8, p. 67-72, 1999.

VORONIN, D.A.; DUDKINA, N.K.; KISELEVA, E.V. A new form of symbiotic bacteria *Wolbachia* found in the endoplasmic reticulum of early embryos of *Drosophila melanogaster*. **Doklady Biological Sciences**, Moscou, v. 396, p. 227-229, 2004.

WADE, M.J.; CHANG, N.W. Increased male fertility in *Tribolium confusum* beetles after infection with the intracellular parasite *Wolbachia*. **Nature**, London, v. 373, p. 72-74, 1995.

WEEKS, A.R.; VELTEN, R.; STOUTHAMER, R. Incidence of a new sex-ratio-distorting endosymbiotic bacterium among arthropods. **Proceedings of the Royal Society**, London, v. 270, p. 1857-1865, 2003.

WEEKS, A.R.; TURELLI, M.; HARCOMBE, W.R.; REYNOLDS, K.T.; HOFFMANN, A.A. From parasite to mutualist: rapid evolution of *Wolbachia* in natural populations of *Drosophila*. **Plos Biology**, Cambridge, v. 5, p. 997-1004, 2007.

- WENSELEERS, T.; ITO, F.; VAN BORM, S.; HUYBRECHTS, R.; VOLCKAERT, F.; BILLEN, J. Widespread occurrence of the micro-organism *Wolbachia* in ants. **Proceedings of the Royal Society**, London, v. 265, p. 1447-1452, 1998.
- WERREN, J.H.; JAENIKE, J. *Wolbachia* and cytoplasmic incompatibility in mycophagous *Drosophila* and their relatives. **Heredity**, London, v. 75, p. 320-326, 1995.
- WERREN, J.H.; O'NEILL, S.L. The evolution of heritable symbionts. In: O'NEILL, S.L.; HOFFMANN, A.A.; WERREN, J.H. (Ed.). **Influential passengers**: inherited microorganisms and arthropod reproduction. Oxford: Oxford University Press, 1997. p. 1-41.
- WERREN, J.H.; WINDSOR, D. *Wolbachia* infection frequencies in insects: evidence of a global equilibrium? **Proceedings of the Royal Society**, London, v. 267, p. 1277-1285, 2000.
- WERREN, J.H.; BALDO, L.; CLARK, M.E. *Wolbachia*: master manipulators of invertebrate biology. **Nature**, London, v. 6, p. 741-751, 2008.
- WERREN, J.H.; WINDSOR, D.; GUO, L.R. Distribution of *Wolbachia* among neotropical arthropods. **Proceedings of the Royal Society**, London, v. 262, p. 197-204, 1995.
- WERREN, J.H.; ZHANG, W.; GUO, L.R. Evolution and phylogeny of *Wolbachia*: reproductive parasites of arthropods. **Proceedings of the Royal Society**, London, v. 261, p. 55-71, 1995.
- YEN, J.H.; BARR, A.R. New hypothesis of the cause of cytoplasmic incompatibility in *Culex pipiens*. **Nature**, London, v. 232, p. 657-658, 1971.
- ZABALOU, S.; APOSTOLAKI, A.; PATTAS, S.; VENETI, Z.; PARASKEVOPOULOS, C.; LIVADARAS, I.; MARKAKIS, G.; BRISSAC, T.; MERÇOT, H.; BOURTZIS, K. Multiple rescue factors within a *Wolbachia* strain. **Genetics**, Austin, v. 178, p. 2145-2160, 2008.
- ZAGO, H.B.; PRATISSOLI, D.; BARROS, R.; GONDIM JR., M.G.C.; SANTOS JR., H.J.G. dos. Capacidade de Parasitismo de *Trichogramma pratissolii* Querino & Zucchi (Hymenoptera: Trichogrammatidae) em hospedeiros alternativos, sob diferentes temperaturas. **Neotropical Entomology**, Londrina, v. 36, p. 84-89, 2007.
- ZCHORI-FEIN, E.; GOTTLIEB, Y.; COLL, M. *Wolbachia* density and host fitness components in *Muscidifurax uniraptor* (Hymenoptera: Pteromalidae). **Journal of Invertebrate Pathology**, San Diego, v. 75, p. 267-272, 2000.
- ZCHORI-FEIN, E.; ROUSCH, R.T.; HUNTER, M.S. Male production induced by antibiotic treatment in *Encarsia formosa* (Hymenoptera: Aphelinidae), in asexual species. **Cellular and Molecular Life Sciences**, Basel, v. 48, p. 102-105, 1992.
- ZCHORI-FEIN, E.; FAKTOR, O.; ZEIDAN, M.; GOTTLIEB, Y.; CZOSNEK, H.; ROSEN, D. Parthenogenesis-inducing microorganisms in *Aphytis* (Hymenoptera: Aphelinidae). **Insect Molecular Biology**, Oxford, v. 4, p. 173-178, 1995.

ZHOU, W.; RUSSET, F.; O'NEILL, S. Phylogeny and PCR-based classification of Wolbachia strains using *wsp* gene sequences. **Proceedings of the Royal Society**, London, v. 265, p. 509-515, 1998.

ZUCCHI, R.A.; MONTEIRO, R.C. O gênero *Trichogramma* na América do Sul. In: PARRA, J.R.P.; ZUCCHI, R.A. (Ed.). ***Trichogramma e o controle biológico aplicado***. Piracicaba: FEALQ, 1997. cap. 2, p. 41-66.