

Universidade de Brasília – UnB

Instituto de Ciências Biológicas

Programa de Pós-Graduação em Zoologia

Resposta comportamental e molecular dos parasitoides
Telenomus podisi e *Trissolcus basalis* (Hymenoptera:
Platygastridae) aos feromônios sexuais de pentatomídeos

Pedro Henrique Cavendish Schimmelpfeng

Orientador: Dr. Raúl Alberto Laumann

Co-orientadora: Dra. Débora Pires Paula

Brasília, 2014

Universidade de Brasília – UnB
Instituto de Ciências Biológicas
Programa de Pós-Graduação em Zoologia

Resposta comportamental e molecular dos parasitoides
Telenomus podisi e *Trissolcus basalis* (Hymenoptera:
Platygastridae) aos feromônios sexuais de pentatomídeos

Pedro Henrique Cavendish Schimmelpfeng

Orientador: Dr. Raúl Alberto Laumann

Co-orientadora: Dra. Débora Pires Paula

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Zoologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília (UnB), como requisito parcial à obtenção do grau de mestre em Zoologia.

Brasília, 2014

AGRADECIMENTOS

À Universidade de Brasília (UnB), em especial ao Departamento de Pós-Graduação em Zoologia pela oportunidade de realização do mestrado;

Ao Programa de Bolsas REUNI pela concessão da bolsa de estudos e à Fundação de Amparo à Pesquisa (FAP-DF) pelo apoio financeiro concedido ao projeto;

À Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia por todo apoio concedido ao longo da realização deste trabalho;

Ao meu orientador Dr. Raúl A. Laumann por toda a paciência, compreensão e companheirismo ao longo desses dois anos;

À minha orientadora Dra. Débora P. Paula por me socorrer tantas vezes no fascinante mundo da Biologia Molecular e por todas as conversas que tivemos ao longo desse percurso;

À todos os meus queridos amigos que conheci durante esses dois anos de mestrado, que sabem o quanto se tornaram especiais na minha vida!

Aos meus pais pelo suporte, apoio e ombro amigo durante essa etapa;

À Amanda V. Rodrigues, que sem o apoio incondicional esse trabalho não teria sido concretizado;

Ao pessoal do Laboratório Planta-Praga 3 (LPP 3), em especial ao Mário e Andressa por todo o apoio oferecido durante a execução dos experimentos;

ÍNDICE

Lista de Figuras	i
Lista de Tabelas	v
Resumo	vi
Abstract	vii
Introdução Geral	1
Capítulo 1	4
Introdução	5
Objetivo	9
Hipóteses	9
Material e Métodos	10
Resultados	17
Discussão	21
Conclusão	26
Capítulo 2	27
Introdução	28
Objetivo	32
Hipóteses	32
Material e Métodos	33
Resultados	40
Discussão	50
Conclusão	52

Considerações Finais	53
Bibliografia	54
Anexo I	66
Anexo II	74

LISTA DE FIGURAS

Capítulo 1

- Figura 1.1** – Complexo de percevejos praga-da-soja e seus inimigos naturais. (A) *Euschistus heros*, (B) *Nezara viridula*, (C) *Piezodorus guildinii*, (D) *Trissolcus basal* e (E) *Telenomus podisi*. Fonte: Google Imagens. 07
- Figura 1.2** – (A) Esquema representativo do processo de aeração e coleta de voláteis de machos de *N. viridula*. 1 – Entrada de ar dentro do sistema. Antes de entrar o ar é filtrado através de carvão ativado (representado em cinza escuro) para evitar contaminantes. 2 – Saída de ar do sistema carregando os voláteis coletados dentro do recipiente. Os voláteis são retidos em partículas de adsorvente (representado em cinza claro) para, mais tarde, serem eluídas. 3 – Sistema fechado onde ficam armazenados os machos de *N. viridula* para coleta de voláteis. (B) Esquema representativo do processo de fracionamento através de uma coluna de sílica-gel. 1 – Local onde ocorre a inserção da amostra e das diferentes soluções utilizadas no fracionamento da mesma. 2 – A cor-fantasia amarela representa a sílica-gel na pipeta de vidro por onde a amostra irá correr. 3 – Saída das diferentes amostras coletadas durante o fracionamento (uma para cada mL da solução inserida na etapa 1). As setas indicam o sentido percorrido pela amostra até a sua coleta na extremidade da pipeta. 12
- Figura 1.3** – Olfatômetro de dupla escolha tipo “Y”. (1) área de liberação (corpo central - 7,7 x 1,3 cm), local onde o parasitoide é colocado para o início do bioensaio, (2) e (3) áreas onde se recebem os tratamentos (braço 7,0 x 1,3 cm). As linhas amarelas indicam o sentido de circulação do ar. 14
- Figura 1.4** – Sistema de fluxo de ar para execução dos bioensaios. 1 – Bomba de ar, responsável por gerar o fluxo de ar dentro no sistema, 2 – Filtro de carvão ativado, 3 – Umidificador, 4 – Seringas onde se colocam os papéis-filtro contendo os tratamentos (n-hexano + composto) ou apenas controle (n-hexano), 5 – Olfatômetro. Fluxo de entrada: 0,6 mL/min; fluxo de saída: 0,4 mL/min. 15
- Figura 1.5** – Escolha inicial, representada pelo número de insetos de *T. podisi* por braços do olfatômetro (tipo “Y”) tratados e não-tratados (controle) com soluções de diferentes concentrações do feromônio sexual de diferentes espécies de percevejos. A comparação entre o número de insetos escolhendo o tratamento e controle para cada feromônio e concentração foi realizada com teste χ^2 . *0,05>P>0,01, **0,01>P>0,001 e ***P< 0,001. 17

Figura 1.6 – Tempo de residência (média ± EP – Erro Padrão) de *T. podisi* olfatômetro tipo “Y” com diferentes feromônios sexuais de percevejos em três concentrações diferentes (1,0 mg/mL, 0,1 mg/mL e 0,01 mg/mL) e n-hexano utilizado como controle. A comparação entre os tempos de residência nas áreas de tratamento e controle para cada feromônio e concentração e o controle foi realizada com o teste estatístico de Wilcoxon, sendo que *0,05>P>0,01, **0,01>P>0,001 e ***P< 0,001. Os números ao lado direito do gráfico representam o total de bioensaios em que o inseto apresentou resposta e os números entre parentêses representam o número de bioensaios onde não houve resposta. 18

Figura 1.7 – Escolha inicial, representada pelo número de insetos de *Tr. basalis* por braços do olfatômetro (tipo “Y”) tratados e não-tratados (controle) com soluções de diferentes concentrações do feromônio sexual de diferentes espécies de percevejos. A comparação entre o número de insetos escolhendo o tratamento e controle para cada feromônio e concentração foi realizada com teste χ^2 . *0,05>P>0,01, **0,01>P>0,001 e ***P< 0,001. 19

Figura 1.8 – Tempo de residência (média ± EP – Erro Padrão) de *Tr. basalis* olfatômetro tipo “Y” com diferentes feromônios sexuais de percevejos em três concentrações diferentes (1,0 mg/mL, 0,1 mg/mL e 0,01 mg/mL) e n-hexano utilizado como controle. A comparação entre os tempos de residência nas áreas de tratamento e controle para cada feromônio e concentração e o controle foi realizada com o teste estatístico de Wilcoxon, sendo que *0,05>P>0,01, **0,01>P>0,001 e ***P< 0,001. Os números ao lado direito do gráfico representam o total de bioensaios em que o inseto apresentou resposta e os números entre parentêses representam o número de bioensaios onde não houve resposta. 20

Capítulo 2

Figura 2.1 – Ilustração dos componentes ultraestruturais do sistema olfatório dos insetos (A) Representação de uma sensila multiporosa. (B) Representação do lúmen e proteínas responsáveis pela captação da partícula de odor (OBP), elicitação do sinal elétrico (OR) e degradação da partícula de odor (ODE). Fonte: Chapman (2013). 29

Figura 2.2 – Categorização das funções moleculares dos transcritos identificados no transcriptoma de *T. podisi* (categorização de nível 2) pela análise do *GeneOntology* (GO) do corpo inteiro de fêmeas com vinte dias (n= 7.171 contigs). 39

Figura 2.3 – Espécies com maior similaridade com o transcriptoma de *T. podisi* de fêmeas com 20 dias de idade. As barras indicam o número de *hits* de similaridade (n= 31,619, 10,4%, BLASTx hits). 40

Figura 2.4 – Sequência nucleotídica das três OBPs encontradas para o parasitoide *T. podisi* e estrutura primária da sequência de aminoácidos correspondente. 43

Figura 2.5 - Alinhamento da sequência deduzida de aminoácidos das três TpodOBPs identificadas em *T. podisi* de 20 dias de idade (ClustalW2). As setas indicam os resíduos conservados de cisteína. 45

Figura 2.6 – Alinhamento parcial das regiões de *TpodOBPs*, OBPs obtidas no *GenBank* (identidade >30%) obtidas pelo BLASTx (ClustalW2) e de percevejos. As colunas destacadas com fundo negro demonstram a similaridade entre elas pela representação dos resíduos de cisteína conservados. As setas em vermelho indicam a localização das TpodOBPs. Eher – *Euschistus heros*; Alin – *Adelphocoris lineolatus*; Focc – *Frankliniella occidentalis*; Lmig – *Locusta migratoria*; Aosa – *Anomala osakana*; Acor – *Anomala corpulenta*; Hpic – *Heptophylla picea*; Tcas – *Tribolium castaneum*; Rpal – *Rhynchophorus palmarum*; Llin – *Lygus lineolaris*; Aluc – *Apolygus lucorum*; Lstr – *Laodelphax striatellus*; Amel – *Apis mellifera*; Ocor – *Osmia cornuta*. 45 - 46

Figura 2.7 – Árvore parcial das relações filogenéticas entre as potenciais OBPs de *T. podisi* e de outras 217 OBPs de himenópteros. A árvore foi construída utilizando o método de *neighbor-joining* (MEGA 6.06). Os números de acesso do *GenBank* estão incluídos entre parentêses logo após o nome das OBPs. 48

Anexos

Figura 3.1 – Cromatograma (GC-FID) representando a mistura feromonal completa de *E. heros* (Eher1). 1 - (2E,4Z)-decadienoato de metila (53%), 2 - 2,6,10- trimetil dodecanoato de metila (3%), 3 - 2,6,10- trimetil tridecanoato de metila (44%) e 4 – Padrão Interno (PI) para quantificação Hexadecanolideo. 66

Figura 3.2 – Cromatograma (GC-MS) representando a mistura feromonal completa de *E. heros* (Eher1). A - (2E,4Z)-decadienoato de metila (53%), B - 2,6,10- trimetil dodecanoato de metila (3%), C - 2,6,10- trimetil tridecanoato de metila (44%). 69

Figura 3.3 - Cromatograma representando a solução Pgui. 1 – 7R-(+)- β -sesquifelandreno e 2 - Padrão Interno (PI) para quantificação Hexadecanolideo. 70

Figura 3.4 - Cromatograma (GC-MS) representando a solução Pgui. 7R-(+)- β -sesquifelandreno. 71

- Figura 3.5** – Cromatograma (GC-FID) representando a solução Nvir. 1 – trans (Z) – epoxibisaboleno, 2 – cis (Z) – epoxibisaboleno e 3 - Padrão Interno (PI) para quantificação Hexadecanolideo. 72
- Figura 3.6** – Cromatograma (GC-MS) representando a solução Nvir. A – trans (Z) – epoxibisaboleno e 2 – cis (Z) – epoxibisaboleno. 73
- Figura 3.7** - Árvore total das relações filogenéticas entre as potenciais OBPs de *T. podisi* e de outras 217 OBPs de himenópteros. A árvore foi construída utilizando o método de neighbor-joining (MEGA 6.06). Os números de acesso do GenBank estão incluídos entre parentêses logo após o nome das OBPs. 74

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.1 – Soluções utilizadas para os bioensaios de olfatosmetria com <i>T. podisi</i> e <i>Tr. basalis</i> . As abreviações utilizadas na coluna da direita serão utilizadas na apresentação dos resultados e discussão a fim de representar as soluções utilizadas nos bioensaios e suas respectivas espécies.	11
Tabela 2.1 – Oligonucleotídeos desenhados para análise da expressão por RT-qPCR dos potenciais transcritos completos relacionados à olfação de semioquímicos e de genes de referência no parasitoide <i>T. podisi</i> . Produtos de amplificação de 100 pb.	36
Tabela 2.2 – Contigs identificados no transcriptoma do parasitoide <i>T. podisi</i> (20 dias) com similaridade para genes relacionados à olfação. Os contigs que continham as OBPs <i>full-length</i> estão representados com o código de acesso em negrito.	41
Tabela 2.3 – Características preditivas das potenciais OBPs identificadas no transcriptoma de <i>T. podisi</i> . AA – número de resíduos de aminoácidos; pI – ponto isoelétrico; MW – massa molecular (Da); CC – Cisteínas Conservadas.	43
Tabela 2.4 – Sequências selecionadas para cada uma das OBPs.	44
Tabela 2.5 – Dados obtidos através dos programas <i>BestKeeper</i> e <i>NormFinder</i> para validação de genes de referência. Para ambos os programas os genes de Actina e Miosina foram os candidatos mais adequados para serem usados como genes de referência.	49

RESUMO

A utilização de microhimenópteros parasitoides para controlar insetos-praga dentro do Manejo Integrado de Pragas (MIP) é uma alternativa para reduzir o uso de fitossanitários na lavoura e as consequências negativas em decorrência de seu uso. Os parasitoides de ovos *Telenomus podisi* e *Trissolcus basal* têm se destacado como agentes de controle de pentatomídeos praga-da-soja, como *Euschistus heros*, *Piezodorus guildinii* e *Nezara viridula*. Para localização de seus hospedeiros estes parasitoides utilizam sinais e pistas predominantemente químicas originadas das plantas ou de seus hospedeiros (feromônios de alarme e sexual, por exemplo) que são interceptadas por proteínas olfativas denominadas OBPs (do inglês, *Odorant Binding Proteins*). O presente trabalho teve como objetivo (1) avaliar a resposta de *T. podisi* e *Tr. basal* aos feromônios sexuais isolados dos hospedeiros (*E. heros* – Eher1, Eher2 e Eher3, *P. guildinii* - Pgui e *N. viridula* - Nvir) em bioensaios de olfatometria em diferentes concentrações (1,0 mg/mL, 0,1 mg/mL e 0,01 mg/mL) e (2) identificar potenciais OBPs mediante transcriptômica de insetos adultos de ambos os sexos por RNA-Seq/Illumina e analisar a influência da exposição aos feromônios sexuais dos hospedeiros na expressão dos mesmos em *T. podisi*. Ambos os parasitoides estudados mostraram resposta seletiva em relação aos compostos avaliados e suas respectivas concentrações (*T. podisi* - Eher3 (0,01 mg/mL), Pgui (0,01 mg/mL) e Nvir (0,1 mg/mL); *Tr. basal* - Eher1 (1,0 mg/mL e 0,1 mg/mL), Eher3 (1,0 mg/mL) e Pgui (1,0 mg/mL). No entanto, a resposta observada diferiu da hipótese inicial de que a resposta dos parasitoides aos compostos sintéticos está relacionada com a sua preferência pelos hospedeiros descritos na literatura. Foram encontrados em *T. podisi* sete transcritos de OBPs, sendo três contendo a região codificante completa, designadas de TpodOBP1, TpodOBP2 e TpodOBP3. As sequências deduzidas de aminoácidos de TpodOBP1 e TpodOBP2 apresentaram alta similaridade com OBPs do percevejo *E. heros* (TpodOBP1 x EherOBP2: 88,5% e TpodOBP2 x EherOBP1: 82,4%), sugerindo que tais potenciais OBPs estariam relacionadas à olfação de pistas feromonais do hospedeiro ou à olfação dos mesmos estímulos. No entanto, fêmeas de *T. podisi* estimuladas com compostos feromonais dos hospedeiros não tiveram a expressão das potenciais TpodOBPs alteradas.

Palavras-chave: Análise de expressão; Bioensaios; *Odorant Binding Proteins* (OBPs); Parasitoides;

ABSTRACT

The use of microhymenopteran parasitoids has been studied within Integrated Pest Management (IPM) in order to control insects that causes economic damage to agriculture and reduce the emission of agrotoxics. The egg parasitoids *Telenomus podisi* and *Trissolcus basalisi* have received significant attention as control agents of the pentatomid stinkbugs-soycomplex, such as *Euschistus heros*, *Piezodorus guildinii* and *Nezara viridula*. To locate its hosts these parasitoids use mainly chemical signals and cues originated by plants or by the host itself (e.g. alarm and sexual pheromones) that are intercepted by olfactory proteins called Odorant Binding Proteins (OBPs). The present work had as objective (1) to evaluate the response of *T. podisi* and *Tr. basalisi* towards the isolated sexual pheromones of its main hosts (*E. heros*, *P. guildinii*, and *N. viridula*) in different concentrations (1,0 mg/mL, 0,1 mg/mL e 0,01 mg/mL) through dual-choice olfactometry bioassays and (2) identify possible OBPs, through transcriptome analysis of adult insects of both sexes with RNA-Seq/Illumina, and analyse the influence of the exposition of sexual pheromones into the profile expression in *T. podisi* OBPs. Both the parasitoids showed a selective response towards the treatments and its respective concentrations (*T. podisi* - Eher3 (0,01 mg/mL), Pgui (0,01 mg/mL) e Nvir (0,1 mg/mL; *Tr. basalisi* - Eher1 (1,0 mg/mL e 0,1 mg/mL) Eher3 (1,0 mg/mL) e Pgui (1,0 mg/mL). However, the response observed differed from initial hypothesis that the parasitoid response to the synthetic pheromones would be related to its preference as described on the literature. The transcriptome analysis of *T. podisi* retrieved seven protein transcripts potentially related to semiochemical binding (OBPs), being that three of those were full-length (i.e.: TpodOBP1, TpodOBP2 e TpodOBP3). The translated amino acid sequence of TpodOBP1 e TpodOBP2 showed high similarity with EherOBP1 and EherOBP2 (TpodOBP1 x EherOBP2: 88.5% e TpodOBP2 x EherOBP1: 82.4%) suggesting that those putative TpodOBPs might be related to olfaction cues from its host or a shared and related stimuli. However, females of *T. podisi* stimulated with the pheromonal compounds of its hosts did not have any change on its expression profile.

Keywords: Bioassays; Expression Analysis; Odorant Binding Proteins (OBPs); Parasitoids;

INTRODUÇÃO GERAL

A soja, *Glycine max* (L.) Merrill, 1997 (Fabales: Fabaceae), é a oleaginosa mais produzida e consumida no mundo e o Brasil é o seu segundo maior produtor com aproximadamente 30 milhões de hectares plantados e 80 milhões de toneladas de grãos na safra 2013/2014 (Conab, 2014). No entanto, parte da produção anual é perdida devido ao ataque de insetos-praga, como o complexo de percevejos pentatomídeos formado majoritariamente por *Euschistus heros* (Fabricius) e *Nezara viridula* (Linnaeus) e outras espécies, entre elas *Piezodorus guildinii* (Westwood), como pragas secundárias (Corrêa-Ferreira e Moscardi, 1994; Moraes et al., 2008a). A utilização exaustiva de fitossanitários nessa cultura tem representado um grande risco ao meio ambiente pela contaminação do solo, diminuição nas populações de insetos benéficos e seleção de variedades resistentes de insetos-praga. Por isso, a utilização de inimigos naturais, como predadores e parasitoides, oferecem uma alternativa sustentável no combate e controle desses insetos.

A comunicação química através de compostos voláteis (semioquímicos) é um dos mecanismos sensoriais mais importantes para os insetos, possibilitando reações variadas em seu comportamento, como atração sexual, formação de trilha e sinalização de perigo (Chapman, 2012). Essa forma de comunicação não se restringe apenas a indivíduos da mesma espécie, sendo que predadores ou parasitoides podem ser capazes de reconhecer os voláteis de suas presas/hospedeiros e usá-los para facilitar o encontro dos mesmos, maximizando seu sucesso reprodutivo (Corrêa-Ferreira e Moscardi, 1994; Medeiros et al., 1997). Assim, a mediação das relações entre insetos-praga, seus inimigos naturais e as plantas por substâncias químicas tem sido alvo de estudo nos últimos anos devido ao potencial dessas substâncias na manipulação comportamental dos insetos (Colazza et al., 1999; Bruni et al., 2000; Moraes et al., 2005).

O uso de parasitoides microhimenópteros, em especial parasitoides de ovos (Família Platygasteridae), tem se mostrado uma alternativa viável no controle dos percevejos-praga (Medeiros et al., 1998; Chabi-Olaye et al., 2001; Puente et al., 2008; Dicke, 2009). Em particular, as espécies *Telenomus podisi* (Ashmead) e *Trissolcus basalis* (Wollaston) tem mostrado potencial como agentes de controle do complexo de percevejos praga-da-soja (Pacheco e Corrêa-Ferreira, 1998, Corrêa-Ferreira, 2002; Cingolani et al., 2013).

Diversos trabalhos relatam a atração destes parasitoides a diferentes estímulos, principalmente químicos, durante a busca e seleção de hospedeiros. Além de compostos

voláteis de plantas, os Platygastriidae podem utilizar semioquímicos dos seus hospedeiros, incluindo os feromônios sexuais. Esta constatação tem sido feita tanto em experimentos de laboratório através de bioensaios de olfatométrica como em experimentos em campo (Borges et al., 1998a; Borges et al., 1999; Silva et al., 2006; Borges et al., 2011). Além desses trabalhos orientados a estudar os mecanismos de resposta dos parasitoides frente a diferentes estímulos e a interpretação do seu significado evolutivo, a identificação de compostos químicos que possam modificar o comportamento dos mesmos pode maximizar a presença destas vespas na lavoura e aumentar sua taxa de parasitismo (Vet et al., 1991; Vinson, 1998; Laumann et al., 2011). A constatação de atração de ambas espécies pelo feromônio sexual de seus principais hospedeiros pode contribuir para desenvolver este tipo de ferramenta. Além de conhecer a resposta comportamental aos semioquímicos e elucidar o processamento fisiológico dos mesmos, também é relevante compreender as formas de aplicação prática associadas ao seu uso.

A resposta olfativa inicial dos insetos é produzida nas antenas e suas sensilas, principalmente nas de tipo multiporosas (Isidoro et al., 2001). As partículas de odor atravessam esses poros e são interceptadas por proteínas específicas que as carregam através da linfa sensilar até as terminações nervosas responsáveis por elicitar a resposta comportamental. Essas proteínas, chamadas de OBPs (do inglês, *Odorant Binding Proteins*), fazem parte do primeiro contato entre as partículas de odor capturadas em um ambiente heterogêneo e o sistema fisiológico do inseto (Fan et al., 2011). Por isso, é sugerido na literatura que essas proteínas são capazes de discriminar partículas mais relevantes para o inseto e aumentar a sua percepção, mesmo que em quantidades diminutas, sendo que o perfil de expressão dessas OBPs pode variar dependendo do comportamento e condição fisiológica que o inseto se encontra (Steinbrecht, 1996). A identificação de OBPs de insetos de diferentes ordens tem aumentado nos últimos anos, incluindo algumas espécies de himenópteros (i.e.: *Nasonia vitripennis* (Walker) (Vieira et al., 2012) e *Cotesia versatilis* (Haliday) (Nishimura et al., 2012). No entanto, nenhuma OBP foi identificada ainda para Platygastriidae.

Considerando a relevância do entendimento da resposta olfativa, tanto comportamental como fisiológica de inimigos naturais e sua relação com os mecanismos de busca e seleção de hospedeiros, o presente trabalho avaliou a resposta comportamental de *T. podisi* e *Tr. basalis* aos feromônios sexuais dos hospedeiros *E. heros*, *P. guildinii* e *N. viridula*. Adicionalmente, fez-se a prospecção de transcritos relacionados a olfação de

semioquímicos em *T. podisi* e a avaliação se tal resposta comportamental está associada a alteração na expressão gênica de potenciais OBPs. Dessa forma, esta dissertação está apresentada na forma de dois capítulos: o primeiro trata do estudo comportamental dos parasitoides *T. podisi* e *Tr. basalis* quando expostos aos compostos feromonais dos hospedeiros, e o segundo trata do estudo molecular da olfação em *T. podisi*, utilizado como modelo experimental.

Capítulo 1

Resposta olfativa de *Telenomus podisi* e *Trissolcus basal* aos
feromônios sexuais de diferentes hospedeiros

INTRODUÇÃO

De acordo com Eggleton e Belshaw (1992) um parasitoide é um organismo que se desenvolve em um único hospedeiro, extraindo nutrientes do mesmo e, conseqüentemente, levando-o à morte como resultado direto ou indireto de seu desenvolvimento. Parasitoides podem ser classificados pelo seu desenvolvimento dentro do hospedeiro como cenobiontes, quando o hospedeiro continua seu ciclo de vida e o parasitoide emerge em um estágio seguinte, e idiobiontes, quando o parasitoide interrompe o desenvolvimento do hospedeiro. Além disso, podemos encontrar exemplos de hiperparasitismo, onde uma espécie de parasitoide utiliza uma segunda espécie que possua o mesmo comportamento de parasitismo como hospedeiro e multiparasitismo, quando ocorre o surgimento de indivíduos de diferentes espécies em um mesmo hospedeiro (Borror e DeLong, 2011).

Durante seu ciclo vital os parasitoides passam por uma etapa crucial, que é o momento no qual as fêmeas precisam procurar um novo hospedeiro para parasitar (busca) e, uma vez localizado, decidir se realizam a oviposição ou não (seleção) (Godfray, 1994). Este processo é fundamental desde o ponto de vista do controle biológico já que o parasitismo bem sucedido culmina com a morte do hospedeiro e conseqüentemente tem impacto nos níveis populacionais do inseto-alvo.

O forrageamento das fêmeas dos parasitoides inclui uma série de passos comportamentais sequenciais, que incluem: a localização do hábitat do hospedeiro, a localização do hospedeiro, o reconhecimento do hospedeiro, a aceitação do hospedeiro e a adequação do hospedeiro (Vinson, 1998; Steidle e van Loon, 2002). Nestes passos os parasitoides utilizam estímulos de natureza física (visuais ou mecânicas), química (semioquímicos) ou bioquímica, sendo os semioquímicos os mais frequentemente utilizados por vespas (Hymenoptera) parasitoides (Vinson, 1998; Godfray, 1994).

Os semioquímicos envolvidos nas interações interespecíficas podem ser nomeados de diferentes formas, dependendo do organismo que obtém a vantagem evolutiva (emissor ou receptor). Assim os semioquímicos podem ser caracterizados como cairomônios (benéfico, em termos evolutivos, para a espécie receptora do semioquímico), alomônios (benéfico para a espécie emissora) ou sinomônios (benéfico para o emissor e também para o receptor) (Otte, 1974; Picket et al., 1992; Witzgall et al., 2008). Esses voláteis podem, também, ser diferenciados entre sinais (troca de informações entre

indivíduos) e pistas (utilização de informações presentes no ambiente), dependendo da forma como o inimigo natural (predador ou parasitoide) intercepta essas informações e a intenção do emissor original ao propagar essa mensagem contida em uma molécula orgânica.

Pode-se dizer então que a percepção por parte de um parasitoide da alteração do perfil de voláteis de uma planta que sofreu injúria por uma presa em potencial constitui um sinal (Sinomônio – troca de informações entre a planta e o inimigo natural) (Dicke, 2009; Hilker e Meiners, 2010; Puente et al., 2008). Enquanto que, quando o parasitoide intercepta um volátil utilizado na comunicação do seu hospedeiro, pode-se caracterizar este volátil como uma pista para o parasitoide (Cairomônio – não existe troca de informação direta entre o hospedeiro e o parasitoide). Por exemplo, o feromônio sexual liberado por um hospedeiro que tem como objetivo atrair um (a) parceiro (a) sexual, mas é interceptado por um predador ou parasitoide para facilitar a localização do hospedeiro (Colazza et al., 1997; Bruni et al., 2000; Laumann et al., 2009).

A percepção e uso de sinais e pistas disponíveis no ambiente pelo parasitoide pode seguir diferentes mecanismos e estratégias. Vet et al., (1991) descreve o paradigma de confiabilidade e detectabilidade na percepção e uso de voláteis pelo parasitoide em uma relação de custo e benefício. Estímulos diretamente relacionados com os hospedeiros, como por exemplo feromônios sexuais ou de alarme, conferem informações confiáveis sobre a identidade do emissor. Contudo, são mais difíceis de serem detectados devido as baixas concentrações ou taxas em que são liberados, enquanto que voláteis emitidos por plantas seriam facilmente detectados, mas teriam baixa confiabilidade. Ademais, Vinson (1998) indica que a percepção do estímulo e a resposta dos parasitoides a pistas ou sinais químicos depende da relação entre fatores internos (fome, idade, ovos disponíveis, experiência e condição fisiológica) e externos (alimento, doenças, refúgio, ambiente, competidores e predadores).

Os indivíduos pertencentes à família Platygasteridae são geralmente endoparasitas de ovos (Tomonori e Mishiro, 2004), podendo ser idiobiontes (quando a larva chega ao estágio adulto no mesmo estágio em que o hospedeiro foi inicialmente parasitado) ou cenobionte (quando a larva chega ao estágio adulto em um estágio diferente em que o hospedeiro foi inicialmente parasitado) (Pennachio e Strand, 2006; Masner, 1993). As características mais marcantes da família Platygasteridae consistem na esclerotização de

seu metassoma, o mecanismo operacional de seu ovipositor (Masner, 1993), venação alar reduzida e suas antenas inseridas logo abaixo da linha dos olhos, próximo à boca (Austin et al., 2005).

A atratividade de diferentes espécies de parasitoides da família Platygasteridae aos voláteis de insetos, como lepidópteros (Colazza et al., 1997) e hemípteros (Laumann et al., 2009), indicam a possibilidade de uso destes semioquímicos para o manejo comportamental de inimigos naturais, visando incrementar a sua eficiência como agentes de controle biológico de pragas.

Telenomus podisi e *Tr. basalis* são vespas da família Platygasteridae (Hymenoptera) e parasitoides de ovos de percevejos praga-da-soja da família Pentatomidae, mais especificamente *Euschistus heros*, *Nezara viridula* e *Piezodorus guildinii* (Figura 1.1). A ecologia comportamental das espécies acima mencionadas tem sido estudada nos últimos anos a fim de identificar diferentes estímulos químicos utilizados no processo de busca de hospedeiros (Borges et al., 1998a; Borges et al., 1999, 2011; Laumann et al., 2009; Lopes et al., 2012; Michereff et al., 2013; Moraes et al., 2014) e outros de diferente natureza, como visuais e mecânicos (Laumann et al., 2011) utilizados no processo de busca do hospedeiro.

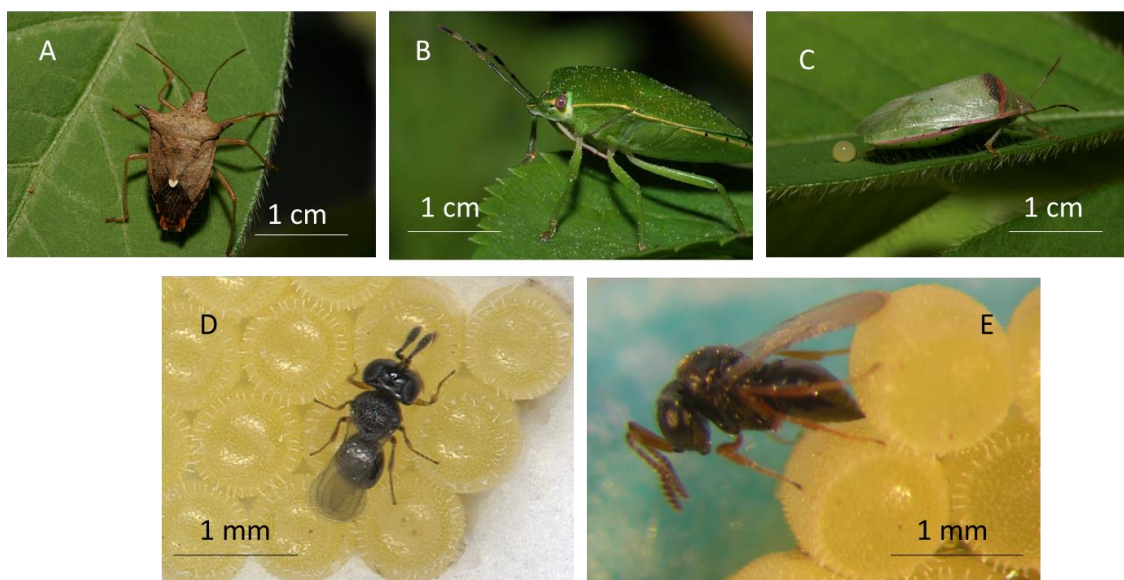


Figura 1.1 – Complexo de percevejos praga-da-soja e seus inimigos naturais. (A) *Euschistus heros*, (B) *Nezara viridula*, (C) *Piezodorus guildinii*, (D) *Telenomus podisi* e (E) *Trissolcus basalis*. Fonte: Vieira, C. e Laumann, R. A.

De acordo com a literatura, existe uma preferência por hospedeiros que maximiza a capacidade reprodutiva destes parasitoides (Pacheco e Corrêa-Ferreira 1998; Sujii et al., 2002). Enquanto que *T. podisi* apresenta forte atração e ótimo desenvolvimento em ovos do percevejo-marrom, *E. heros* (Medeiros et al., 1997; Pacheco e Corrêa-Ferreira 1998; Sujii et al., 2002), *Tr. basalis* prefere ovos do percevejo-verde, *N. viridula* (Medeiros et al., 1998; Sujii et al., 2002). Estas preferências são observadas também na resposta específica a semioquímicos (Laumann et al., 2009, Lopes et al., 2012) e sinais vibratórios dos percevejos (Laumann et al., 2011). Enquanto isso, o percevejo-verde-pequeno, *P. guildinii* é parasitado na natureza por ambas as espécies, entretanto os índices de parasitismo são menores que nas espécies anteriormente mencionadas (Pacheco e Corrêa-Ferreira 1998; Medeiros et al., 1998).

Os feromônios sexuais liberados por machos dessas três espécies de percevejos foram identificados e sintetizados em trabalhos anteriores e sua atração para fêmeas da espécie foi comprovada (Baker et al., 1987; Borges et al., 1998b, 2007). Borges et al., (1998a) relataram a coleta de *T. podisi* em armadilhas contendo uma formulação do feromônio sexual de *E. heros*. Entretanto, a influência desses compostos no comportamento do parasitoide não foi estudada até o momento. Da mesma maneira a influência de feromônios sexuais de outros percevejos no comportamento de *T. podisi* e *Tr. basalis* e sua possível relação com a discriminação ou seleção de hospedeiros ainda não foram relatadas.

Apesar de serem de gêneros distintos, *T. podisi* e *Tr. basalis* possuem hospedeiros em comum por parasitarem percevejos Pentatomidae. Devido a essa característica e sua ampla distribuição geográfica, ambas as espécies têm sido estudadas a fim de combater o complexo de percevejos praga da soja dentro do Manejo Integrado de Pragas (MIP). A atratividade de diferentes espécies de parasitoides Platygastridae aos voláteis de insetos, como lepidópteros (Colazza et al., 1997) e hemípteros (Laumann et al., 2009), indicam a possibilidade de uso destes semioquímicos para seu manejo comportamental, visando incrementar a sua eficiência como agentes de controle biológico de pragas. Para isto é necessário identificar os semioquímicos e estabelecer como os mesmos modificam o comportamento dos parasitoides.

OBJETIVOS

Caracterizar a resposta comportamental de *T. podisi* e *Tr. basalis* aos feromônios sexuais dos hospedeiros *E. heros*, *N. viridula* e *P. guildinii*.

Os objetivos específicos foram:

- (1.1) Observar se a resposta dos parasitoides *T. podisi* e *Tr. basalis* aos diferentes feromônios sexuais testados se relaciona com a preferência de hospedeiros observada em campo;
- (1.2) Avaliar a resposta dos parasitoides *T. podisi* e *Tr. basalis* a diferentes concentrações dos feromônios sexuais a fim de se estabelecer uma concentração ótima de resposta;

HIPÓTESES

- (1.1) A resposta dos parasitoides aos compostos sintéticos feromonais está relacionada com a sua preferência pelos hospedeiros descritos na literatura. Sendo assim, é esperado que *T. podisi* responda preferencialmente ao feromônio sexual de *E. heros* e *Tr. basalis* ao feromônio sexual de *N. viridula*;
- (1.2) Considerando que a dinâmica da resposta dos receptores sensoriais das antenas aos sinais químicos é amplamente variável nos insetos. A resposta dos parasitoides *T. podisi* e *Tr. basalis* aos feromônios sexuais é dose-dependente e pode variar entre as espécies.

MATERIAL E MÉTODOS

Todos os experimentos foram conduzidos no laboratório de Semioquímicos, localizado na Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia (Cenargen) em Brasília – DF

a) Criação dos parasitoides *T. podisi* e *Tr. basalis*.

Todos os parasitoides utilizados nesse trabalho foram criados no Laboratório de Semioquímicos em gaiolas plásticas de 25 cm², alimentados com mel puro, ovos de *E. heros* foram utilizados como hospedeiros. A colônia foi mantida em sala com fotofase de 14 horas, 26.0±0,5°C e 65±10% de umidade relativa do ar. As fêmeas utilizadas nos experimentos de olfatosmetria possuíam entre 24 e 48 horas na fase adulta, foram mantidas previamente com machos para garantir que estivessem fecundadas e não possuíam qualquer experiência prévia de oviposição.

b) Criação de *Nezara viridula* para coleta de voláteis.

Adultos e ninfas desta espécie foram coletados em campos de soja no Distrito Federal e armazenados em gaiolas plásticas forradas com papel A4, água em recipiente plástico e alimentados com vagem de feijão (*Phaseolus vulgaris* - Linnaeus, 1758), amendoim (*Arachis hypogaea* - Linnaeus, 1758), girassol (*Helianthus annuus* - Linnaeus, 1758) e sementes de soja (*Glycine max*). A partir da segunda geração, machos foram separados das fêmeas ao alcançar a idade adulta e continuaram sendo alimentados da mesma forma, assim como as fêmeas. Após o período de sete a dez dias os machos foram utilizados em experimentos de aeração devido ao início da liberação de feromônios sexuais (Baker et al., 1987).

c) Compostos utilizados nos bioensaios.

Os feromônios sexuais das espécies de percevejos selecionados foram isolados e caracterizados em trabalhos anteriores através da caracterização química, configuração absoluta e a proporção entre os componentes nas misturas (Baker et al., 1987; Borges et al., 1998b; Borges et al., 2007). Para os bioensaios com os feromônios de *E. heros* e *P. guildinii* foram utilizados compostos sintéticos obtidos do banco de semioquímicos do Laboratório de Semioquímicos da Embrapa Cenargen. Os compostos utilizados nos bioensaios foram sintetizados no Laboratório de Semioquímicos da Embrapa Cenargen (*P. guildinii*) e pela empresa Fuji Flavor, Co., Ltd, (Tokyo, Japão) (*E. heros*). No caso de

E. heros, dois dos compostos majoritários da mistura feromonal foram testados separadamente. A composição e proporção relativa entre os componentes que formam a mistura final de cada uma das três espécies, assim como dos compostos de *E. heros* mencionados anteriormente estão detalhados na Tabela 1.1.

Tabela 1.1 – Soluções utilizadas para os bioensaios de olfatosmetria com *T. podisi* e *Tr. basalis*. As abreviações utilizadas na coluna da direita serão utilizadas na apresentação dos resultados e discussão a fim de representar as soluções utilizadas nos bioensaios e suas respectivas espécies.

Espécie	Soluções	Abreviação	Local de Obtenção	Concentrações para cada Solução
<i>E. heros</i>	Mistura Feromonal Completa	Eher1	Banco de Semioquímicos do Laboratório de Semioquímicos (Embrapa Cenargen)	1,0 mg/ml
	2,6,10-trimetiltridecanoato de metila	Eher2		
	2,4-decadienoato de metila	Eher3		
<i>P. guildinii</i>	7R-(+)- β -sesquifelandreno	Pgui	Fuji Flavor (Tóquio, Japão)	0,1 mg/ml
				0,01 mg/ml
<i>N. viridula</i>	trans e cis-(Z)-epoxibisaboleno	Nvir	Extratos de aeração e fracionamento de machos de <i>N. viridula</i> sexualmente maduros	

Para obter a mistura feromonal de *N. viridula* foi utilizada a técnica de aeração com machos (sexo produtor do feromônio sexual em Pentatomidae) de acordo com a metodologia descrita por Zhang et al., (2003) (Figura 1.2A) com algumas modificações. Os insetos foram acondicionados em uma câmara de aeração (grupo de 20 indivíduos por aeração) com entrada de ar através de um filtro de carvão ativado (Mesh: 20 – 40 μ m), possuíam sete a dez dias na fase adulta e foram alimentados apenas com vagem de feijão (*Phaseolus vulgaris*), sendo a mesma trocada duas vezes por semana. O fluxo de ar foi gerado por uma bomba de vácuo (aproximadamente 0,5 L/min) e os voláteis foram coletados a cada 24 horas através da eluição do adsorvente (SuperQ - Alltech Associates Inc., Deerfield, IL, USA – Mesh: 80 – 100 μ m) com n-hexano. Os insetos permaneceram por 20 dias nas câmaras de aeração com a substituição dos insetos mortos a fim de manter o número de 20 machos constante durante todo o período de aeração. Todas as amostras obtidas durante o experimento de aeração foram guardadas em freezer a -20°C. Após a coleta das amostras foi utilizada a técnica de fracionamento (Moraes et al., 2012) para separar o feromônio sexual do macho dos outros voláteis presentes na amostra (Figura 1.2B).

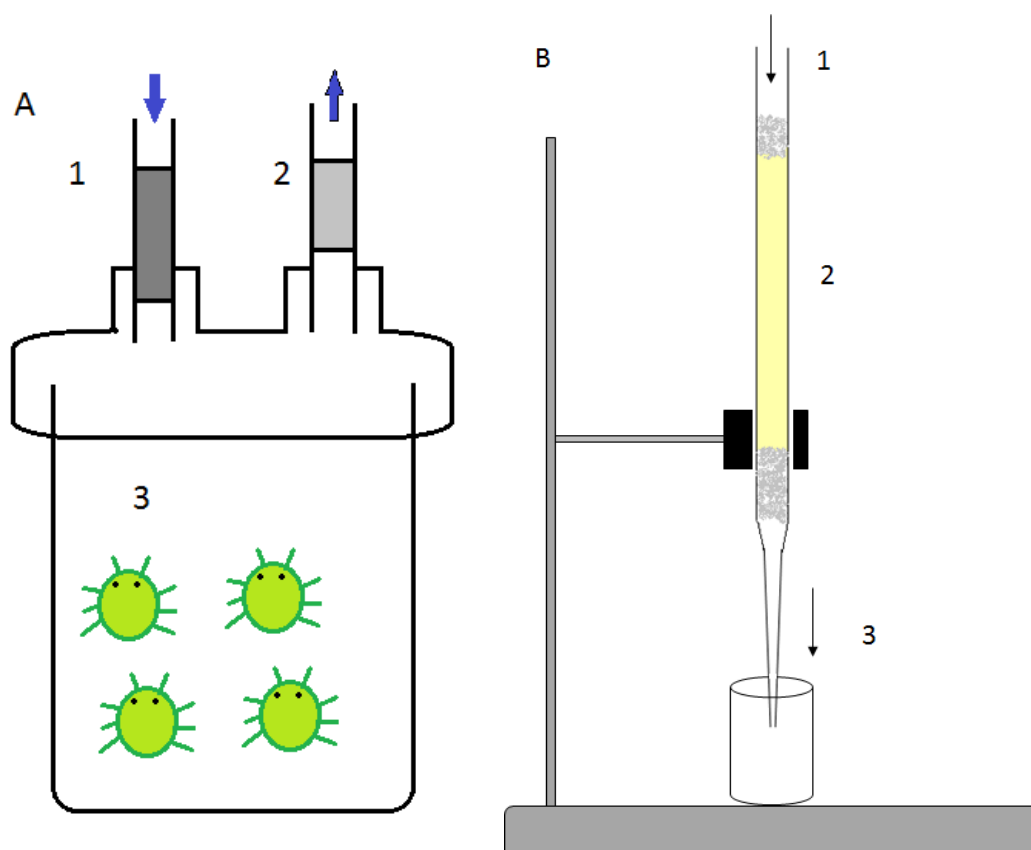


Figura 1.2 – (A) Esquema representativo do processo de aeração e coleta de voláteis de machos de *N. viridula*. 1 – Entrada de ar dentro do sistema. Antes de entrar o ar é filtrado através de carvão ativado (representado em cinza escuro) para evitar contaminantes. 2 – Saída de ar do sistema carregando os voláteis coletados dentro do recipiente. Os voláteis são retidos em partículas de adsorvente (representado em cinza claro) para, mais tarde, serem eluídas. 3 – Sistema fechado onde ficam armazenados os machos de *N. viridula* para coleta de voláteis. (B) Esquema representativo do processo de fracionamento através de uma coluna de sílica-gel. 1 – Local onde ocorre a inserção da amostra e das diferentes soluções utilizadas no fracionamento da mesma. 2 – A cor-fantasia amarela representa a sílica-gel na pipeta de vidro por onde a amostra irá correr. 3 – Saída das diferentes amostras coletadas durante o fracionamento (uma para cada mL da solução inserida na etapa 1). As setas indicam o sentido percorrido pela amostra até a sua coleta na extremidade da pipeta.

Após as amostras serem coletadas foi realizada a pré-concentração das mesmas pelo uso de um leve fluxo de gás nitrogênio sobre elas até que todas pudessem ser armazenadas em um único recipiente com um volume final de 1 mL para posterior fracionamento. O fracionamento foi realizado utilizando uma coluna de sílica-gel (500

mg – Mesh: 70-230) em uma pipeta Pasteur (6,0 cm x 0,5 cm) na qual a amostra foi inserida na extremidade superior e, em seguida, lavada com diferentes soluções (3 x 1 mL de pentano, 3 x 1 mL de 5% de dietil éter em pentano e 3 x 1 mL 10% dietil éter em pentano – totalizando 9 mL). Esse procedimento separa, através da polaridade, diferentes compostos de uma mesma mistura (Figura 1.2B).

Para garantir que as misturas utilizadas na realização dos bioensaios estivessem puras e nas proporções corretas, todas as amostras foram analisadas pela técnica de Cromatografia Gasosa acoplada ao Espectrômetro de Massa (GC-MS, do inglês *Gas Chromatography / Mass spectrometer*) para identificação dos compostos utilizados. A confirmação desses compostos ocorreu pela biblioteca do *National Institute of Standards and Technology* (NIST), tanto para os voláteis obtidos nas aerações como os feromônios sintéticos. Para a quantificação dessas soluções foi utilizada a técnica de Cromatografia Gasosa acoplada ao Detector por Ionização de Chama (GC-FID, do inglês *Gas Chromatography / Flame Ionization Detector*) para quantificação. Os cromatogramas das soluções padrão das misturas feromonais se apresentam no Anexo I.

d) Bioensaios de olfatométrica com parasitoides

Para a realização dos bioensaios de olfatométrica foi utilizado um olfatômetro tipo “Y” desenvolvido para avaliar a resposta do inseto frente a dois tratamentos em ambiente com controle das condições ambientais (temperatura, umidade e luminosidade). O aparelho é montado em uma placa de acrílico (27,5 x 21,0 cm) de 10 mm de espessura prensada na sua parte superior (transparente) e inferior (fosca) com placas de vidro de 4 mm. O acrílico possui um furo central em forma de ”Y”, sendo que seu corpo central possui 7,7 x 1,3 cm e cada braço 7,0 x 1,3 cm (Figura 1.3). A placa tem um furo circular no extremo de cada braço (0,5 cm) e um furo similar no extremo do corpo central, estes furos servem para entrada e saída do ar no aparelho. Para gerar a circulação de ar foi utilizada uma bomba de ar (bomba de aquário). O fluxo gerado pela bomba foi conduzido por mangueiras de silicone para os componentes do sistema. Em seguida, o ar segue por um filtro de carvão ativado e um umidificador até ser conduzido para seringas de vidro de 10 mL onde se encontram os tratamentos. O escoamento de ar foi realizado utilizando uma bomba de vácuo ligada no extremo do corpo central (Figura 1.4). Durante os bioensaios o fluxo de entrada (0,6 Lpm) e saída (0,4 Lpm) foram regulados com fluxometro a fim de criar uma leve pressão positiva no olfatômetro para evitar contaminação pelo ar não filtrado.

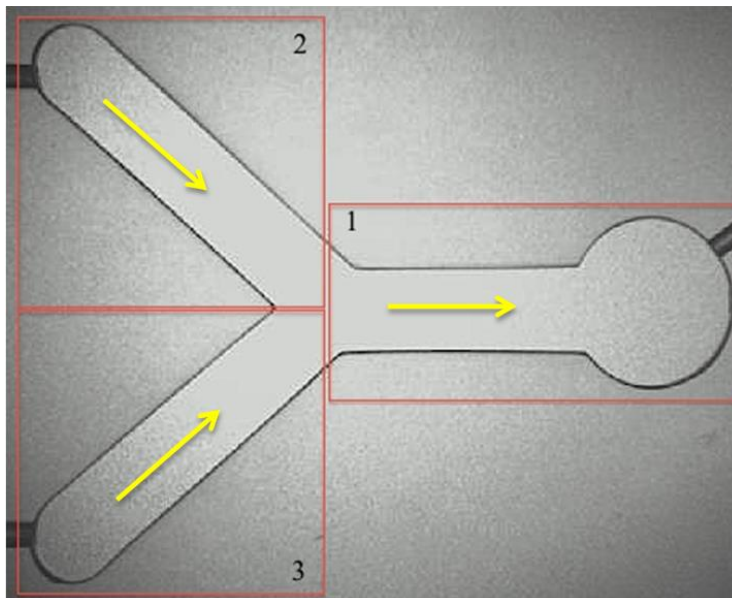


Figura 1.3 – Olfatômetro de dupla escolha tipo “Y”. (1) área de liberação (corpo central - 7,7 x 1,3 cm), local onde o parasitoide é colocado para o início do bioensaio, (2)

e (3) áreas onde se recebem os tratamentos (braço 7,0 x 1,3 cm). As linhas amarelas indicam o sentido de circulação do ar.

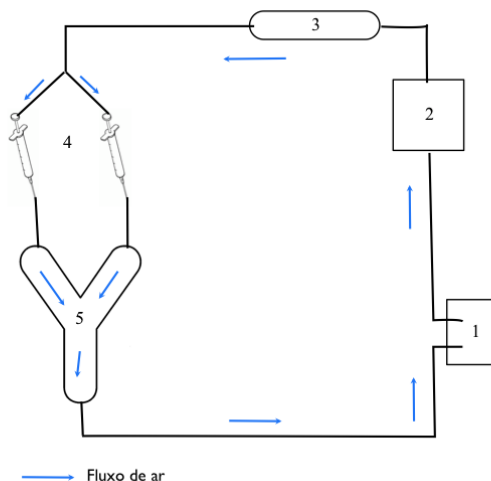


Figura 1.4 – Sistema de fluxo de ar para execução dos bioensaios. 1 – Bomba de ar, responsável por gerar o fluxo de ar dentro no sistema, 2 – Filtro de carvão ativado, 3 – Umidificador, 4 – Seringas onde se colocam os papéis-filtro contendo os tratamentos (n-hexano + composto) ou apenas controle (n-hexano), 5 – Olfatômetro. Fluxo de entrada: 0,6 mL/min; fluxo de saída: 0,4 mL/min.

Nos bioensaios foi avaliada a resposta do inseto aos diferentes tratamentos (feromônios sexuais das espécies selecionadas ou componentes isolados) em relação ao controle (papéis tratados com n-hexano). Os compostos utilizados (Tabela 1.1) foram diluídos em n-hexano para obter soluções de diferentes concentrações (1,0 mg/mL, 0,1 mg/mL e 0,01 mg/mL). Considerando que cada composto foi testado em três concentrações diferentes, foram totalizados quinze tratamentos para cada espécie. Em cada bioensaio foram utilizados cinco microlitros da solução escolhida, colocados individualmente em papel filtro de 1 cm x 1 cm e introduzidos nas seringas de vidro descritas anteriormente.

Para cada bioensaio foi colocada uma fêmea de *T. podisi* ou *Tr. basalis* na área de liberação do olfatômetro (extremo do braço principal, oposto à área de escolha) e seu comportamento foi monitorado por uma câmera CCD Sony SPT M324CE durante 10 minutos através de um programa de captura e processamento de imagens (SACAM, desenvolvido pela equipe de trabalho da Embrapa). As fêmeas utilizadas nos

experimentos de olfatosmetria possuíam entre 24 e 48 horas na fase adulta e foram mantidas previamente com machos para garantir que estivessem fecundadas e não possuíam qualquer experiência prévia de oviposição. A cada cinco bioensaios foi trocado o olfatômetro (placa de acrílico e placas de vidro) além de se inverter os braços que continham os tratamentos a fim de evitar qualquer influência da posição na resposta dos insetos e evitar a formação de pseudoréplicas. Indivíduos que não escolheram uma das soluções em cinco minutos foram considerados ‘sem resposta’ e não foram incluídos nas análises estatísticas. Foram realizados quarenta bioensaios para cada tratamento.

A partir deste procedimento foram utilizadas duas variáveis para análise da resposta, sendo a primeira a escolha inicial (braço do olfatômetro onde o inseto entra pela primeira vez e permanece por mais de vinte segundos) e a segunda o tempo (s) de permanência em cada braço. Enquanto que a escolha inicial do parasitoide entre tratamento e controle foi comparada utilizando o teste de χ^2 (Excel, Microsoft), o tempo de residência foi analisado pelo teste de Wilcoxon (plataforma R – R Development Core Team, 2009) a fim de comparar as médias entre tratamento e controle no olfatômetro.

RESULTADOS

O parasitoide *T. podisi* preferiu os tratamentos Eher3 ($\chi^2_1 = 0,1$; $P = 0,002$) e Pgui ($\chi^2_1 = 0,1$; $P = 0,062$), ambos na menor concentração avaliada (0,01 mg/mL) em relação ao controle quando observada a escolha inicial (Figura 1.5). Além disso, *T. podisi* passou significativamente mais tempo nas áreas de tratamento para as soluções de Nvir (0,1 mg/mL – $\chi^2_1 = 0,1$; $P = 0,023$), Pgui (0,01 mg/mL – $\chi^2_1 = 0,1$; $P = 0,067$) e Eher3 (0,01 mg/mL – $\chi^2_1 = 0,1$; $P = 0,010$) em relação ao controle (Figura 1.6).

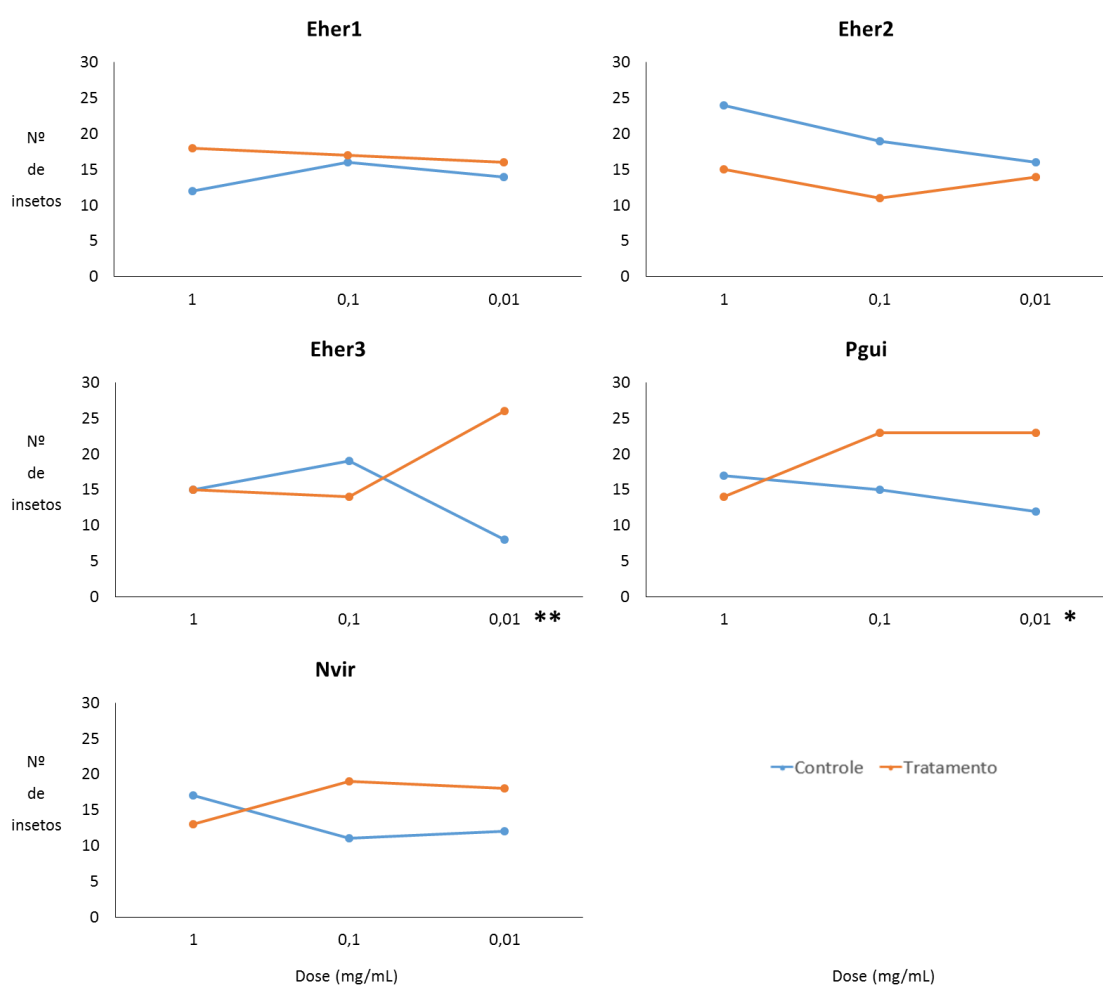


Figura 1.5 – Escolha inicial, representada pelo número de insetos de *T. podisi* por braços do olfatômetro (tipo “Y”) tratados e não-tratados (controle) com soluções de diferentes concentrações do feromônio sexual de diferentes espécies de percevejos. A comparação entre o número de insetos escolhendo o tratamento e controle para cada feromônio e concentração foi realizada com teste χ^2 . * $0,05 > P > 0,01$, ** $0,01 > P > 0,001$ e *** $P < 0,001$.

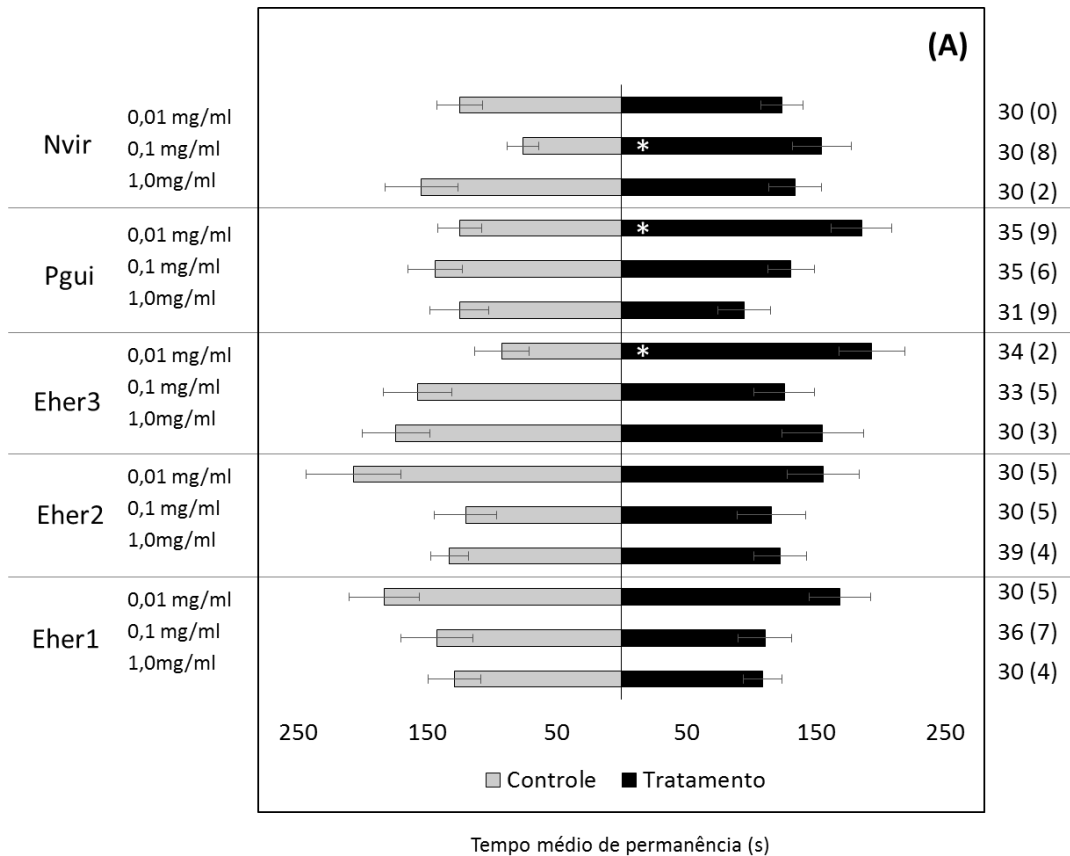


Figura 1.6 – Tempo de residência (média \pm EP – Erro Padrão) de *T. podisi* olfactômetro tipo “Y” com diferentes feromônios sexuais de percevejos em três concentrações (1,0 mg/mL, 0,1 mg/mL e 0,01 mg/mL) e n-hexano utilizado como controle. A comparação entre os tempos de residência nas áreas de tratamento e controle para cada feromônio e concentração e o controle foi realizada com o teste estatístico de Wilcoxon, sendo que * $0,05 > P > 0,01$, ** $0,01 > P > 0,001$ e *** $P < 0,001$. Os números ao lado direito do gráfico representam o total de bioensaios em que o inseto apresentou resposta e os números entre parênteses representam o número de bioensaios onde não houve resposta.

No caso da escolha inicial em *Tr. basalis* o parasitoide preferiu o tratamento para a mistura completa do feromônio sexual de *E. heros* (Eher1) nas concentrações de 1,0 mg/mL ($\chi^2_1 = 0,1$; $P = 0,007$) e 0,1 mg/mL ($\chi^2_1 = 0,1$; $P = 0,050$) e Eher3 à 1,0 mg/mL ($\chi^2_1 = 0,1$; $P = 0,010$). Ao avaliar a mistura feromonal de *N. viridula* (Nvir) nas concentrações de 0,01 mg/mL ($\chi^2_1 = 0,1$; $P = 0,067$) e 1,0 mg/mL ($\chi^2_1 = 0,1$; $P = 0,048$) *Tr. basalis* mostrou preferência pelos controles em relação ao tratamento (Figura 1.7). Quando considerado o tempo de residência, *Tr. basalis* passou significativamente mais tempo no tratamento quando foram avaliadas as soluções de Pgui (1,0 mg/mL – $\chi^2_1 = 0,1$;

P = 0,010), Eher1 (1,0 mg/mL – $\chi^2_1 = 0,1$; P = 0,010 e 0,1 mg/mL $\chi^2_1 = 0,1$; P = 0,021) e Eher3 (1,0 mg/mL – $\chi^2_1 = 0,1$; P = 0,027) em relação ao controle (Figura 1.8).

Além da variação na resposta das duas espécies em relação aos tratamentos, pode-se observar também a diferença entre a dose necessária para eliciar o comportamento de atração pelo parasitoide para cada composto.

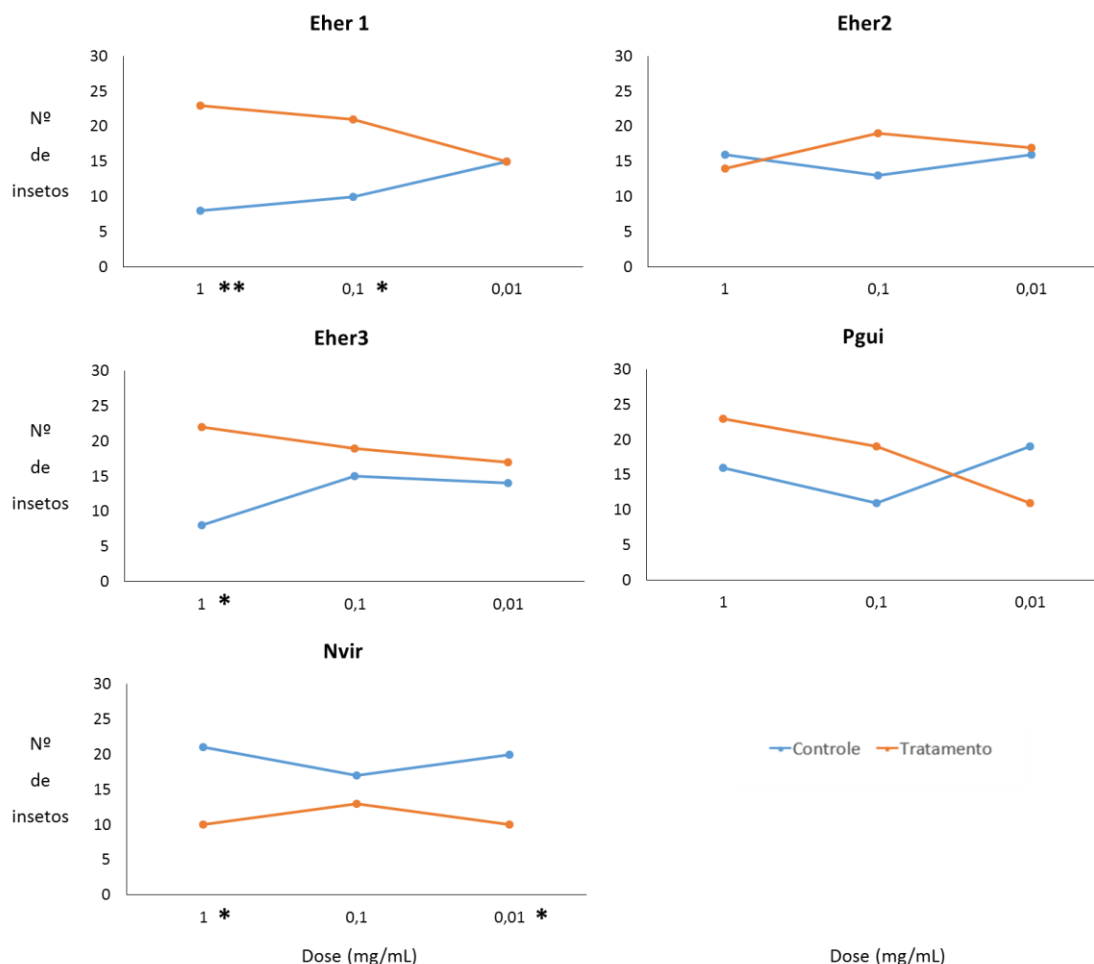


Figura 1.7 – Escolha inicial, representada pelo número de insetos de *Tr. basalis* por braços do olfatômetro (tipo “Y”) tratados e não-tratados (controle) com soluções de diferentes concentrações do feromônio sexual de diferentes espécies de percevejos. A comparação entre o número de insetos escolhendo o tratamento e controle para cada feromônio e concentração foi realizada com teste χ^2 . * $0,05 > P > 0,01$, ** $0,01 > P > 0,001$ e *** $P < 0,001$.

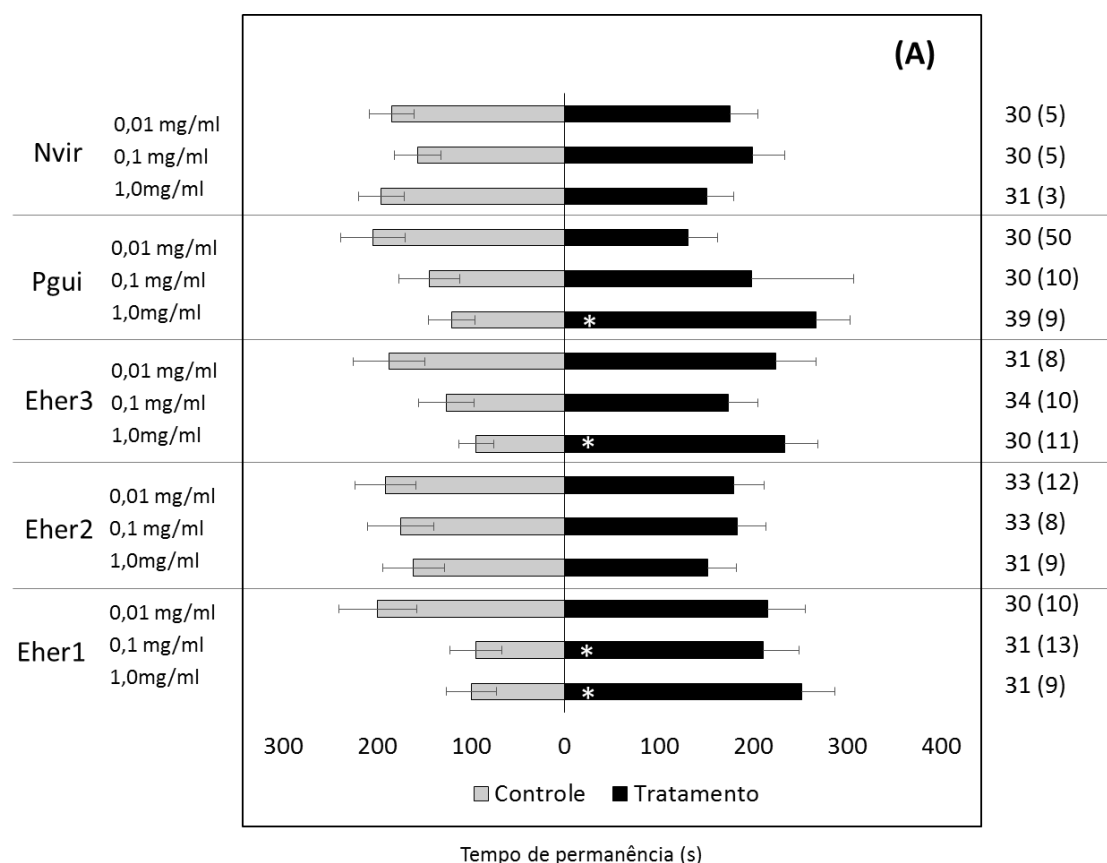


Figura 1.8 – Tempo de residência (média ± EP – Erro Padrão) de *Tr. basalis* olfatômetro tipo “Y” com diferentes feromônios sexuais de percevejos em três concentrações (1,0 mg/mL, 0,1 mg/mL e 0,01 mg/mL) e n-hexano utilizado como controle. A comparação entre os tempos de residência nas áreas de tratamento e controle para cada feromônio e concentração e o controle foi realizada com o teste estatístico de Wilcoxon, sendo que * $0,05 > P > 0,01$, ** $0,01 > P > 0,001$ e *** $P < 0,001$. Os números ao lado direito do gráfico representam o total de bioensaios em que o inseto apresentou resposta e os números entre parentêses representam o número de bioensaios onde não houve resposta.

DISCUSSÃO

A resposta de *T. podisi* e *Tr. basalis* a diferentes componentes de feromônios sexuais de pentatomídeos mostrou diferença entre as espécies de parasitoides tanto em relação aos compostos que atraíram significativamente os parasitoides quanto às concentrações utilizadas nos bioensaios.

Em relação aos feromônios sexuais de *E. heros*, *T. podisi* foi atraído ao tratamento Eher3 (0,01 mg/mL) quando observada a escolha inicial e o tempo de residência em relação ao controle. Quanto a *Tr. basalis*, o mesmo foi atraído significativamente para a solução com os três componentes do feromônio sexual de *E. heros* (Eher1) em duas concentrações (1,0 mg/mL e 0,1 mg/mL) em relação ao controle e permaneceu por mais tempo nas áreas tratadas com as soluções Eher1 (1,0 mg/mL e 0,1 mg/mL) e Eher3 (1,0 mg/mL).

Apesar de existirem trabalhos que relatam a atração de *T. podisi* ao 2,6,10-trimetil tridecanoato de metila em experimentos conduzidos em arena fechada (Silva et al., 2006) e em campo (Borges et al., 1998), o parasitoide não foi atraído pelo mesmo composto nos bioensaios em olfatômetro Tipo “Y”. Diferenças na concentração dos compostos nos dois tipos de arenas podem explicar as diferentes respostas observadas no parasitoide quando observado os diferentes tratamentos. Inclusive, em arenas fechadas a concentração após determinado período pode ser homogênea na área, fato que não ocorre no olfatômetro. A solução Eher3 (2,6,10-trimetil decadienoato de metila), correspondente ao componente que aparece em maior proporção na mistura feromonal de *E. heros*, capaz de promover a atração do parasitoide em bioensaios em arenas fechadas também elicitou essa resposta no olfatômetro (Silva et al., 2006), enquanto que a mistura completa do feromonino sexual (Eher1 - 2,6,10- trimetil tridecanoato de metila; 2,6,10- trimetil dodecanoato de metila; (2E,4Z)- decadienoato de metila) não atraiu fêmeas de *T. podisi*.

O (2E,4Z)- decadienoato de metila é um composto presente em várias espécies do gênero *Euschistus* (Pareja et al., 2007) e que o mesmo é liberado em maiores quantidades quando *E. heros* sofre stress alimentar, mudando sua proporção entre 53% a 80% (Moraes et al., 2008b). Assim, este composto pode se apresentar no ambiente em maiores concentrações que os outros componentes, facilitando a sua detectabilidade pelo parasitoide, o que pode favorecer a seleção de indivíduos com capacidade de utilizar este volátil como pista.

Trissolcus basalis foi atraído para a mistura completa do feromônio sexual de *E. heros* e, apesar de não haver relatos na literatura da influência de seus voláteis no comportamento de *Tr. basalis*, Borges et al., (1998) capturaram *Trissolcus urichi* (Crawford) e *Trissolcus teretis* (Johnson) ao utilizar armadilhas iscadas com 2,6,10-tridecanoato de metila. A resposta de *Tr. basalis* ao feromônio de *E. heros* não foi a predita pela hipótese proposta neste trabalho, considerando que *E. heros* não é um hospedeiro preferencial de *Tr. basalis*. No entanto, não se deve descartar a hipótese de condicionamento pré-imaginal ou condicionamento dos adultos recentemente emergidos já que os insetos utilizados neste trabalho foram criados por várias gerações (+50) em ovos de *E. heros* e pelo fato que análises químicas do córion de ovos deste percevejo revelaram traços do feromônio sexual da espécie (Raúl Laumann, comunicação pessoal). O rol do condicionamento pre-imaginal na modulação da resposta de parasitoides é um fato bem demonstrado na literatura (Gandolfi et al., 2003; Gutiérrez-Ibáñez et al., 2007; Kaiser et al., 2008) e recentemente foi comprovado para *T. podisi* (Tognon et al. 2013).

Quanto à solução Pgui (7R-(+)- β -sesquifelandreno), ambas as espécies responderam ao composto ainda que em concentrações diferentes. Esta também foi uma resposta não predita pela hipótese de preferência proposta neste trabalho. Uma razão para justificar o comportamento observado em ambas as espécies de parasitoides poderia estar associada ao fato de que os sesquiterpenos são compostos muito comuns na natureza, geralmente produzidos pelas plantas após injúrias de herbivoria e, também são comumente encontrados em feromônios e outros voláteis produzidos por diferentes espécies de percevejos da família Pentatomidae (Leal et al., 1998; Weissbecker et al., 2000; McBrien et al., 2002; Hoballah et al., 2002; Huh et al., 2006). Assim, a resposta ao feromônio de *P. guildinii* pode se considerar como parte de uma resposta generalizada a este grupo de terpenos que estaria relacionada com a identificação e reconhecimento de habitats e locais onde se encontram os hospedeiros.

A solução do feromônio sexual de *Nezara viridula* (Nvir) atraiu *T. podisi* na concentração de 0,1 mg/mL e sugere que pode haver efeito de repelência para *Tr. basalis* nas concentrações de 1,0 mg/mL e 0,01 mg/mL. No caso de *T. podisi*, pode-se supor, assim como na solução Pgui, que devido aos componentes formadores do feromônio sexual de *N. viridula* estarem presentes em mais de uma espécie da família Pentatomidae (Moraes et al., 2012), a atração pode representar um comportamento generalista na resposta ao feromônio sexual de percevejos relacionado ao hábito polífago deste

parasitoide (Orr, 1982, Corrêa-Ferreira e Moscardi, 1994). No caso de *Tr. basalis* pode-se elaborar duas hipóteses que justifiquem seu comportamento, sendo a primeira a anteriormente citada do condicionamento pré-imaginal ou na emergência dos adultos e a segunda que esta espécie de parasitoides não utilize feromônios sexuais deste hospedeiro no comportamento de busca ou que o uso destas pistas se realize num contexto multimodal.

O forrageamento das fêmeas dos parasitoides inclui uma série de passos comportamentais sequenciais, que incluem: a localização do hábitat do hospedeiro, a localização do hospedeiro, o reconhecimento do hospedeiro, a aceitação do hospedeiro e a adequação do hospedeiro (Vinson, 1998, Steidle e van Loon, 2002). No caso específico de *Trissolcus basalis* e *Telenomus podisi* a localização do habitat e do hospedeiro pode estar influenciada por voláteis de plantas induzidos por herbivoria (Colazza et al., 2004, Moraes et al., 2005, 2008) e voláteis extraídos das glândulas metatorácicas de diferentes percevejos e geralmente associados a funções defensivas (feromônios de alarme) (Laumann et al., 2009). Neste último caso a resposta observada foi seletiva e relacionada com a preferência de hospedeiros, embora os compostos isolados, quando avaliados individualmente, promovam um comportamento mais generalista, possivelmente pelo fato que estes compostos podem estar presentes nas misturas das glândulas de mais de uma espécie de percevejos (Pareja et al., 2007).

Para explicar a utilização de compostos voláteis por insetos na busca e seleção de hospedeiros Vet et al. (1991) sugerem a hipótese da detectabilidade-confiabilidade pela qual o uso de estímulos pelos parasitoides durante a procura por hospedeiros depende da disponibilidade do sinal. Sinais que sejam mais fáceis de serem detectados, ainda que de baixa qualidade de informação (por exemplo não indicam diretamente a presença ou identidade do hospedeiro), podem ser preferidos frente a sinais com alta qualidade de informação, mas difíceis de serem detectados. A taxa de emissão mais elevada e constante dos compostos presentes nas glândulas metatorácicas de percevejos, em relação aos feromônios sexuais (Pareja et al., 2007; Moraes et al., 2008b) podem resultar em maiores concentrações e permanência dos mesmos no ambiente. Este tipo de estímulo mais facilmente detectável poderia ser utilizado pelos parasitoides de ovos, especificamente *Tr. basalis*, em relação a estímulos encontrados em menores concentrações ou de forma esporádica no ambiente, como é o caso dos feromônios sexuais. Para confirmar esta hipótese seria necessário contrastar a resposta dos parasitoides utilizados neste trabalho

aos feromônios sexuais e extratos de glândulas metatorácicas de percevejos e, adicionalmente, avaliar a sensibilidade de detecção de ambos os tipos de voláteis em estudos de eletroantenografia e dos receptores destes compostos (identificação e caracterização de proteínas receptoras de odores, ver Capítulo 2, p. 27-28 desta dissertação).

Os parasitoides procuram hospedeiros em ambientes químicamente complexos influenciados pela diversidade vegetal, de suas presas e de outros organismos presentes nos ecossistemas, esta complexidade pode variar em escala temporal e espacial (Waschke et al., 2013). A esta complexidade pode se somar o fato que em parasitoides generalistas as estratégias de forrageio podem ser plásticas, não se baseando em um único mecanismo ou utilização constante e inalterada de sinais/pistas, podendo ser influenciadas pelas características da história de vida dos parasitoides, como tamanho corporal, grau de especialização e forma de reprodução (Steidle e van Loon, 2002, Waschke et al., 2013). A própria condição do inseto pode ser fundamental para determinar seu comportamento (Sznajder et al., 2010) que pode variar em relação a sua condição fisiológica (alimentação, idade, estado reprodutivo), sua experiência prévia e a plasticidade fenotípica da espécie e/ou o *pool* gênico da população (Sznajder et al., 2010, Heil, 2014). Assim as respostas de *T. podisi* e *Tr. basalis* para os feromônios sexuais de percevejos observadas neste trabalho precisam ser comprovadas em situações onde os parasitoides encontrem ambientes mais complexos (mistura de diferentes estímulos) ou uma sequência de estímulos que represente a sequência encontrada na natureza e proposta no modelo sugerido por Laumann et al. (2011)

A relação encontrada entre as duas espécies de parasitoides estudadas e a concentração-ótima para eliciar uma resposta olfativa de atração foi antagonica. Enquanto *Tr. basalis* seguiu o padrão previsto na literatura (Byers, 2013) de que, em um determinado intervalo de concentração, o aumento da dosagem utilizada nos bioensaios está relacionado com um aumento na resposta ao tratamento, *T. podisi* mostrou resposta inversa. No caso de *T. podisi*, nas soluções Eher3 e Pgui o inseto respondeu apenas para as concentrações de 0,01 mg/mL, enquanto que para Nvir houve resposta apenas na concentração de 0,1 mg/mL. Tilden e Bedard (1988) demonstraram que o aumento da concentração do terpeno verbenona liberado pelo pinheiro *Pinus ponderosa* (Lawson) é capaz de inibir o comportamento gregário e reprodutivo de *Dendroctonus brevicomis* (LeConte), mostrando uma relação inversamente proporcional e diminuindo a incidência

do inseto no local. No entanto, a razão de *T. podisi* não ser atraído quando apresentado a doses mais elevadas do feromônio sexual de seu hospedeiro não deve seguir o mesmo raciocínio observado na relação entre *P. ponderosa* e *D. brevicomis* tendo em vista a diferença nas relações ecológicas encontradas entre ambos os casos. Uma justificativa para o comportamento de *T. podisi* pode estar associado ao número de receptores de membrana e OBPs disponíveis para elicitar essa resposta na antena do inseto, sendo que a saturação dos mesmos pode impedir que o inseto consiga discriminar regiões mais ou menos concentradas de determinado volátil e tomar uma decisão de seguir a pluma de odor. Baker e Roelofs (1981) e Byers (2007, 2012) demonstraram em experimentos de campo que existe um limiar ótimo de dosagem de feromônio para captura de machos de lepidópteros, sendo que apesar de inicialmente o aumento da dosagem utilizada estar relacionado com o aumento de captura, após uma determinada dosagem os machos iniciam o comportamento de procura longe da fonte de odor.

CONCLUSÃO

Ambos os parasitoides estudados mostraram respostas seletivas em relação aos compostos avaliados e suas respectivas concentrações. No entanto, a resposta observada diferiu da hipótese inicial de que a resposta dos parasitoides aos compostos sintéticos estaria relacionada com a sua preferência de hospedeiros. Mais estudos são necessários a fim de compreender os mecanismos que regem os mecanismos de busca de hospedeiros e os estímulos envolvidos. Em relação à segunda hipótese de que a resposta aos feromônios sexuais é dose-dependente e pode variar segundo as espécies consideradas, pôde-se observar que houve diferença na concentração-ótima para cada uma das duas espécies observadas, podendo indicar diferenças entre os parasitoides na sensibilidade de percepção dos voláteis das espécies.

Capítulo 2

Análise da expressão de transcritos potencialmente relacionados à olfação de *Telenomus podisi* em função da estimulação feromonal de hospedeiros

INTRODUÇÃO

A recepção e processamento de moléculas de odores por um inseto constitui um mecanismo dinâmico de comunicação entre sistema nervoso periférico (recepção) e sistema nervoso central (processamento). Esse processo ocorre nas sensilas, que são estruturas pilosas e inervadas distribuídas por toda a superfície do corpo do inseto, principalmente nas antenas, e que apresentam funções sensoriais químicas (olfação e gustação) e mecânicas (térmica, mecanorreceptora, entre outras) (Schneider, 1964). No caso das sensilas que apresentam função sensorial química, elas podem ser diferenciadas através da presença de um poro em sua extremidade (gustação) ou de múltiplos poros espalhados por sua superfície (olfação) (Zacharuk, 1980; Isidoro et al., 2001; Rocha et al., 2007). Esses poros são os responsáveis por permitir a entrada de moléculas de odor ou gustação na linfa sensilar e possibilitar a elicitação de uma resposta neurológica.

A estrutura interna da sensila é diferenciada de acordo com sua função. Basicamente, qualquer sensila é composta por terminações nervosas que se ligam a ela para a interpretação de sinais provenientes da mesma, células-suporte que secretam a linfa sensilar e as proteínas envolvidas na percepção dos sinais recebidos. Em sensilas mecânicas as terminações nervosas se ligam à base da sensila e são estimuladas através de sua movimentação e/ou vibração. No caso de sensilas químicas os dendritos percorrem internamente o “corpo” da sensila a fim de receber as moléculas que desencadeiam uma resposta (Figura 2.1) (Chapman, 2013).

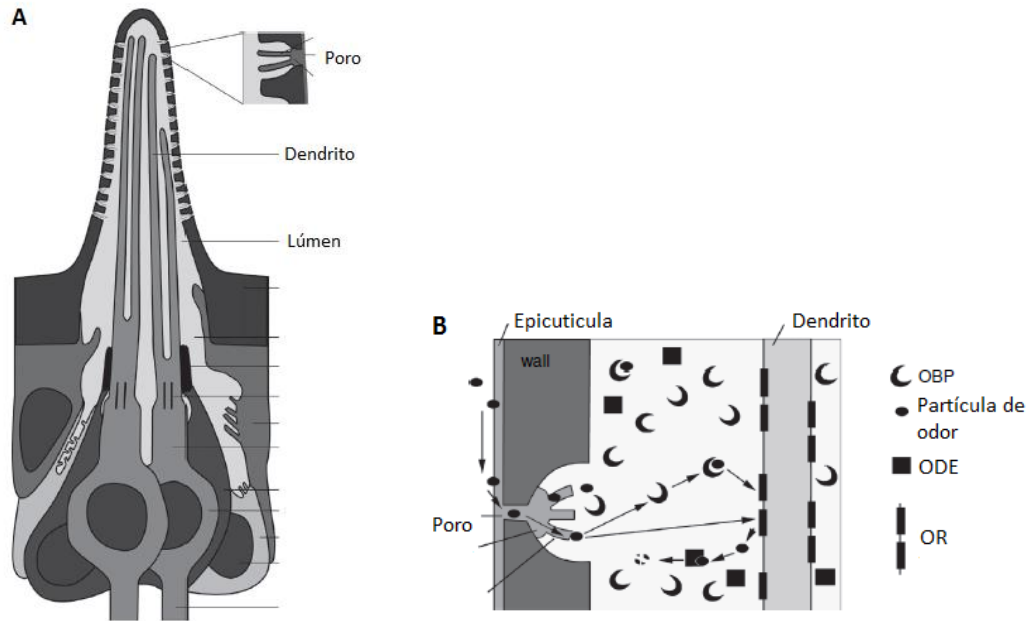


Figura 2.1 – Ilustração dos componentes ultraestruturais do sistema olfatório dos insetos (A) Representação de uma sensila multiporosa. (B) Representação do lúmen e proteínas responsáveis pela captação de moléculas de odor (OBP), elicitacão do sinal elétrico (OR) e degradação da partícula de odor (ODE). Fonte: Chapman (2013).

Assim que uma molécula de odor ultrapassa o poro da sensila e encontra a linfa sensilar (caracterizada pela sua polaridade e pH variado) uma classe específica de proteínas será responsável por interceptar essa partícula e transportá-la até proteínas de membrana, presentes nos dendritos dessa sensila chamadas Receptores de Odores – ORs (do inglês, *Odorant Receptor*), onde a resposta neurológica (potencial de ação) será desencadeada. Essas proteínas responsáveis pelo transporte são chamadas de Proteínas Ligantes de Odor – OBPs (do inglês, *Odorant Binding Proteins*) e podem ser diferenciadas funcionalmente entre OBPs gerais (por exemplo, ligantes a voláteis de plantas) ou PBPs (do inglês, *Pheromone Binding Proteins*) específicas (feromônios sexuais, alarme e cairomônios) (Figura 2.1B). A principal função destas proteínas é permitir que as moléculas de odor, que em sua maioria são compostos lipofílicos, não solúveis em água, atravessem a linfa sensilar e alcancem as proteínas de membrana (ORs). Além dessas proteínas ligantes, uma terceira classe é descrita na literatura como proteínas quimossensoriais – CSP (do inglês, *Chemosensory Protein*), caracterizada por algumas diferenças em sua estrutura primária e distribuição em outras partes do corpo do inseto além de antenas e palpos maxilares (i.e. pernas, asas e abdomen) (Ban et al., 2003). No entanto, a literatura recente sugere que apesar das diferenças na estrutura primária, as

CSPs desempenham um papel muito semelhante às OBPs (Pelosi et al., 2005; Lovinella et al., 2013).

A especificidade da resposta comportamental dos insetos em relação à identidade das moléculas de odores tem sido estudada nos últimos anos com a finalidade de compreender os mecanismos de recepção e processamento periférico de sinais químicos (Hua et al., 2012; Leal, 2012). Diversos estudos apontam a importância na identificação das OBPs a fim de compreender a discriminação de partículas de odores e mudanças comportamentais dos insetos no ambiente (Field et al., 2000; Justice et al., 2003). Steinbrecht (1996) propôs que as OBPs podem responder seletivamente aos odores do ambiente, discriminando moléculas relevantes de “ruídos”. Wojtasek et al., (1998) demonstraram que a associação entre as OBPs e outros componentes relacionados à olfação (ORs e neurônios envolvidos) poderiam ampliar a variedade de formas de percepção de moléculas químicas. Assim, a identificação e validação funcional tanto de OBPs quanto de ORs tem apresentado um novo paradigma para compreender a forma em que os insetos interpretam os estímulos químicos do meio ambiente e as causas proximais do seu comportamento.

De acordo com Fan et al. (2011) as OBPs são compostas por aproximadamente 150 resíduos de aminoácidos, possuem seis α -hélices, três pontes de dissulfeto, presença de peptídeo-sinal na extremidade amino-terminal e ponto isoelétrico (pI) geralmente ácido. Podem ser classificadas estruturalmente em quatro categorias, dependendo da quantidade de resíduos conservados de cisteína encontrados em sua estrutura protéica primária, sendo estas: (1) OBP clássica (seis resíduos de cisteína conservados), (2) *Plus-C* (um resíduo de prolina conservado mais dois resíduos adicionais de cisteína) (Zhou et al., 2003), (3) *Minus-C* (número de resíduos de cisteína menor que seis) (Li et al., 2013) e (4) OBP atípica (região C-terminal longa, comum em insetos hematófagos) (Xu et al., 2003). No caso das OBPs clássicas, seus seis resíduos conservados de cisteínas formam três pontes de dissulfeto, conferindo estruturação terciária da proteína adequada para interagir com os ligantes. O funcionamento das OBPs, também revisado por Fan et al. (2011), está associado à sua capacidade de ligar e liberar partículas de odor. Esse processo ocorre através da diferença de pH na linfa sensilar que permite alterações na estrutura tridimensional das OBPs. A ligação ocorre em pH mais básico (> 6), na linfa sensilar e a liberação em pH mais ácido ($< 4,9$) próximo aos dendritos das terminações nervosas.

Além das OBPs e ORs, existe uma terceira classe que degrada as moléculas de odor logo após seu contato com uma OR: as Enzimas Degradadoras de Odores – ODEs (do inglês, *Odorant Degrading Enzymes*) (Figura 2.1B). Essas enzimas são responsáveis por evitar que as moléculas de odor ligadas a uma OR continuem a estimulá-la, gerando uma interpretação defasada do ambiente em tempo e/ou espaço.

As mudanças comportamentais derivadas da experiência durante a vida das fêmeas de parasitoides, podem ser um fator decisivo no aumento da sua capacidade reprodutiva (Dauphin et al., 2009), por permitir: (1) redução do tempo de busca por hospedeiros com a consequente redução em gasto de energia e (2) reconhecimento e discriminação de sinais confiáveis dentro do contexto em que o inseto se encontra (Vet e Groenewold, 1990; Vet et al., 1990; Turlings et al., 1993). Essas mudanças comportamentais derivadas de experiências com recompensas positivas ou negativas, chamada de aprendizagem associativa, podem ser induzidas tanto a partir de estímulos químicos (olfativos e táteis) (Meiners et al., 2003) como visuais (van Nouhuys e Kaartinen, 2008). No entanto, a relação entre aprendizagem associativa e as alterações fisiológicas no sistema nervoso periférico do inseto permanecem incerta.

Várias ferramentas de bioquímica e de biologia molecular vem sendo utilizadas para identificar e estudar a função de OBPs e ORs (Hua et al., 2012; Li et al., 2014; Zhang et al., 2014). Dentro da biologia molecular, o estudo da população de transcritos (i.e. produto da transcrição do DNA, referindo-se, nesse caso, ao RNA mensageiro – mRNA) presentes em uma amostra biológica num dado momento, também conhecido como transcriptoma, têm sido utilizado como peça-chave na prospecção das moléculas-alvo. Devido ao fato das OBPs compreenderem a primeira etapa na captação de partículas de odor e por serem de fácil extração, constituem o componente molecular da olfação mais identificado. Até o presente momento foram identificadas mais de 5.180 OBPs em 40 espécies de insetos distribuídas em 10 ordens (Zhou et al., 2010), dentre essas, 217 foram identificadas em 36 espécies de himenópteros, principalmente em abelhas, formigas e vespas parasitoides, tal como *Nasonia vitripennis* (Vieira et al., 2012) e *Cotesia vestalis* (Nishimura et al., 2012). A identificação e validação desses transcritos ou de suas respectivas proteínas tem ajudado a esclarecer a forma que o inseto interpreta os sinais do meio ambiente e as causas proximais do seu comportamento.

OBJETIVO GERAL

Identificar transcritos relacionados à olfação em *T. podisi* e analisar a expressão gênica das potenciais OBPs encontradas.

Os objetivos específicos foram:

- (1.1) Identificar transcritos relacionados à olfação em *T. podisi* via análise transcriptômica.
- (1.2) Caracterizar potenciais OBPs identificadas e analisar sua similaridade com as demais OBPs identificadas em outras espécies de insetos, incluindo os hospedeiros preferenciais.
- (1.3) Analisar a expressão das potenciais OBPs em função da exposição de fêmeas de *T. podisi* a diferentes experiências olfativas frente a feromônios de seus hospedeiros.

HIPÓTESES

- (1.1) *T. podisi* expressa transcritos relacionados à captação de semioquímicos, tais como OBPs (incluindo CSPs), ORs e ODEs.
- (1.2) Diferentes OBPs identificadas a partir do transcriptoma de *T. podisi* podem apresentar similaridade com OBPs de outros insetos, principalmente com os hospedeiros, dependendo se captam os mesmos odores e da distância evolutiva.
- (1.3) A exposição aos componentes do feromônio sexual de hospedeiros pode modificar o perfil de expressão de OBPs do parasitoide.

MATERIAL E MÉTODOS

Todos os experimentos foram conduzidos na Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia (Cenargen) em Brasília – DF nos laboratórios de Semioquímicos e de Bioquímica e Biologia Molecular.

1. Prospecção e caracterização de transcritos relacionados à olfação

a) Preparo das amostras para análise transcriptômica

Fêmeas acasaladas sem qualquer experiência prévia de oviposição e machos com aproximadamente 20 dias de idade, contando a partir da emergência dos adultos, foram utilizados para a extração do RNA total através do reagente TRIzol (Invitrogen), baseado na metodologia descrita por Chomczynski e Sacchi (1987). Em seguida, foi realizada a purificação através do kit *PureLink RNA Mini Kit* e armazenagem a -80°C . Para análise transcriptômica, 1 μg de RNA total foi transferido para microtubo do tipo RNA *stable* (Biomatrix®) e, em seguida, feita a secagem em centrífuga a vácuo. A integridade e qualidade do RNA foram avaliadas utilizando o equipamento *2100 Bioanalyser* (Agilent), sendo o valor de integridade do RNA (RIN, do inglês – RNA Integrity Number) $\geq 7,0$. Tanto a construção da biblioteca de RNA-Seq quanto o serviço de sequenciamento (plataforma *Illumina* GAIIX, 1 *lane*, 100 pb, paired-end) foram executados pela empresa Beijing Genomics Institute (BGI), China.

b) Análise transcriptômica do parasitoide *T. podisi*

As sequências de DNA obtidas pelo sequenciamento do transcriptoma serão aqui mencionadas como *reads*, sendo que as mesmas foram obtidas em formato Fastq. Inicialmente, fez-se o controle de qualidade para retirar fragmentos de vetor, ambiguidades e fragmentos menores que o desejado através do programa *Trimmomatic* (<http://www.usadellab.org/cms/?page=trimmomatic>) utilizando-se os parâmetros: *leading* 3, *trailing* 3, *sliding Windows* 4:15 e tamanho mínimo de 36 pb (Bolger et al., 2014). Em seguida, antes de agrupar as *reads* sequenciadas e formar os *contigs* (conjunto de *reads* sobrepostas que representam uma região consenso de DNA), as mesmas foram submetidas ao programa *VelvetOptimizer* 2.2.5 (<http://bioinformatics.net.au/software.velvetoptimiser.shtml>) para estimar o melhor k-mer no intervalo de 15-47 k-mers para realizar a montagem. A montagem das *reads* foi

feita inicialmente pelo programa Velvet (versão 1.2.0.7) e, em seguida, o programa Oases (versão 0.2.0.8) foi utilizado em análise *de novo*, considerando que não havia um genoma de referência para auxiliar na montagem (Schulz et al., 2012).

Para procurar por transcritos relacionados à olfação e de potenciais genes de referência, os transcritos montados (*contigs*) foram contrastados no banco de dados não redundante do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) através do programa BLASTx (Conesa et al., 2005). A partir disso, utilizou-se o programa Blast2GO e o *GeneOntology* (GO) para que os *contigs* pudessem ser categorizados de acordo com a potencial função molecular (Ashburn et al., 2000). Os dados brutos do sequenciamento do transcriptoma e os resultados da montagem dos transcritos foram depositados no *GenBank* nos acervos *Sequence Read Archive* (SRA) e *Transcriptome Shotgun Assembly* (TSA), respectivamente. Adicionalmente, as potenciais OBPs foram depositadas individualmente no *GenBank* utilizando-se a ferramenta BankIT. Todos os códigos de acesso estão descritos em Resultados.

c) Caracterização *in silico* e análise de similaridade

As potenciais OBPs *full-length* (região codificante completa) foram submetidas a algumas análises *in silico* para prever a sequência deduzida de aminoácidos (*ExPASy Translate Tool* - <http://web.expasy.org/translate/>), ponto isoelétrico (pI) e massa molecular (MW) (para ambos foi utilizado o programa *Compute pI/Mw*, http://web.expasy.org/compute_pi/), peptídeo-sinal (*SignalP 4.1*, <http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) (Petersen et al., 2011) e estrutura secundária (*JPred*, <http://www.compbio.dundee.ac.uk/www-jpred/>) (Cole et al., 2008).

A busca por ortólogos no NCBI foi realizada utilizando o algoritmo BLASTx. Os ortólogos com função predita de OBP, sobreposição de alinhamento (área de cobertura) > 70% com identidade mínima de 30% e valor esperado de significância (valor-E) < 9e-20, foram selecionados para análise de similaridade no ClustalW2 (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>). Adicionalmente, foram também incluídas sequências deduzidas de aminoácidos de nove potenciais OBPs de percevejos pentatomídeos (Farias et al., dados não publicados), sendo quatro delas de *Chinavia ubica* (Rolston), uma de *Dichelops melachantus* (Dallas) e quatro de *E. heros*. A análise de

similaridade no ClustalW2 foi realizada utilizando-se os parâmetros padrões do programa.

A fim de traçar uma relação evolutiva das potenciais OBPs identificadas para *T. podisi* com as de outros himenópteros, fez-se a análise filogenética pelo programa MEGA 6.06 (Tamura et al., 2007) com mil réplicas de *bootstraps* utilizando-se o método de agrupamento de vizinhos (*neighbor-joining*) pela distância-p e deleção pareada de *gaps*. Para isso, foram obtidas 217 sequências deduzidas de aminoácidos das OBPs de himenópteros do *GenBank*, sendo 36 sequências de *Solenopsis* spp. (18 espécies), 90 sequências de *N. vitripennis* e 42 de *Apis* spp.

2. Análise da expressão gênica

a) Bioensaio de estimulação feromonal de fêmeas de *T. podisi*

Fêmeas de *T. podisi* foram transferidas para gaiolas (25 cm²) contendo papel filtro inoculado com 1 µL da solução de bioensaios e alimentadas com mel puro. Neste experimento foram utilizadas apenas as soluções mencionadas no Capítulo 1 (Tabela 1.1) nas quais as fêmeas de *T. podisi* responderam positivamente ao tratamento durante os bioensaios de olfatométrica, sendo elas: Nvir (0,1 mg/mL), Pgui (0,01 mg/mL), Eher3 (0,01 mg/mL) e dois controles negativos (CN - ausência de papel filtro e n-hexano e CP - papel filtro contendo 1 µL de n-hexano), totalizando cinco tratamentos. Para cada tratamento foram utilizadas 150 fêmeas de 12 a 24 horas de vida em um único grupo. Após 20 minutos o papel filtro foi retirado, deixando apenas o composto volatilizado dentro da gaiola para, em seguida, aguardar 24 horas antes do início da extração de mRNA.

b) Extração de mRNA e síntese de cDNA

A extração, purificação e quantificação do RNA total das fêmeas proveniente de cada um dos tratamentos e dos grupos-controle foram realizados conforme metodologia descrita no tópico 'a', item 1. O RNA total extraído foi quantificado por espectrofotometria a 260 nm em *NanoDrop 1000 Spectrophotometer* (Thermo Scientific®), avaliando-se a presença de contaminantes (fenol e proteínas) pela razão das absorvâncias 260/280 nm e 260/230 nm. O RNA total (3,6 a 5,8 µg) foi tratado com DNase I/RNase-free (Thermo Scientific) de acordo com manual do fabricante, utilizando

uma unidade de DNase para cada micrograma de RNA total, e armazenadas em ultrafreezer a -80°C. A síntese do DNA complementar (cDNA) para cada amostra foi realizada utilizando-se o kit *SuperScript® III First-Strand* (Synthesis Supermix), de acordo com o protocolo do fabricante, e armazenadas em freezer a -20°C. Para cada reação do kit foi convertido 0,5 µg de RNA total em 20 µL de volume final de cDNA, normalizando o produto final entre os tratamentos.

c) **Análise da expressão gênica**

A análise da expressão gênica nos diferentes tratamentos foi realizada por PCR quantitativo em Tempo-Real (RT-qPCR, do inglês *Real Time quantitative PCR*). Foram desenhados um par de oligonucleotídeos (*primers*) para cada potencial transcrito relacionado à olfação de *T. podisi* e para os candidatos a genes de referência, utilizando-se o programa Primer3 (<http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/primer3/>) e sua capacidade de anelamento no programa *Sequence Manipulation Suite* (<http://www.bioinformatics.org/sms2/>). Cinco candidatos a genes de referência foram selecionados por potencialmente possuírem expressão constitutiva e não sofrerem alteração da expressão gênica em função dos tratamentos à serem testados, sendo eles: actina, miosina, tubulina, ribossomo 40S e citocromo P450. As sequências de todos os oligos constam na Tabela 2.1.

Tabela 2.1 – Oligonucleotídeos desenhados para análise da expressão por RT-qPCR dos potenciais transcritos completos relacionados à olfação de semioquímicos e de genes de referência no parasitoide *T. podisi*. Produtos de amplificação de 100 pb.

Genes-Alvo	Produto de Amplificação	Sequência (5'-3')
Referência	Miosina <i>Forward</i>	GCTCTGCTGGACGAGGAATG
	Miosina <i>Reverse</i>	ACTTCGGATGCACGTTGTGT
	Ribossomo 40S <i>Forward</i>	CTGCTCTTCGTGCTTTGGCT
	Ribossomo 40S <i>Reverse</i>	ACCACCCTTTCTGCGAGTTG
	Citocromo P450 <i>Forward</i>	GCGGCCACTGAGAAACAAAC
	Citocromo P450 <i>Reverse</i>	CCGCACACTCGATGAGAATGT
	Tubulina <i>Forward</i>	CCATCAGGGTGAGAACTGC
	Tubulina <i>Reverse</i>	TGAATGACACAGAACGAAACCT
	Actina <i>Forward</i>	AAATCTCAGCGACCTCATCG
	Actina <i>Reverse</i>	GCCAGAGTCCTTATCCTTTGC
OBP	TpodOBP1 <i>Forward</i>	GGTCCAGATGGTACACGACC
	TpodOBP1 <i>Reverse</i>	TGGTCATCCGCTGGGAAGAT
	TpodOBP3 <i>Forward</i>	AGCACACAGAGCGGCAAATC
	TpodOBP3 <i>Reverse</i>	GTTGTAACATTTAAGACCCGAACGA
	TpodOBP2 <i>Forward</i>	TGATGAAGCAGCCAAAGCCA
	TpodOBP2 <i>Reverse</i>	ATTCACATTGGTCAGGGCCA

Os pares de oligonucleotídeos desenhados foram testados através da técnica de PCR em gradiente a fim de testar a temperatura ideal de anelamento (T_m) para cada um deles. Para cada reação de PCR foi utilizado 2,5 μ L de solução tampão 10X, 0,75 μ L de $MgCl_2$ a 50 mM, 0,5 μ L de dNTPs a 10 mM, 3 μ L do par de oligonucleotídeos (1pmol/ μ L), 1,5 μ L de cDNA, 0,75 μ L de Taq polimerase e 16 μ L de água filtrada, totalizando 25 μ L (Invitrogen). As reações de amplificação foram realizadas no termociclador *MyGenie 96 ThermalBlock* de acordo com o programa de desnaturação inicial a 95°C por dois minutos, 40 ciclos de desnaturação a 95°C por 30 segundos, anelamento com gradiente de temperatura de 45°C até 65°C por 45 segundos, extensão a 72°C por 45 segundos, e extensão final a 72°C por seis minutos. Os produtos de amplificação foram visualizados em eletroforese em gel de 1% de agarose e marcado com GelRed para visualização em fotodocumentador.

As reações para análise da expressão gênica propriamente dita foram montadas em placas de 96 poços para PCR de volume final de 0,1 mL. Em cada placa foram montadas reações para amplificação dos genes de referência (em triplicata técnica) e dos potenciais OBPs (em duplicata técnica) de todos os tratamentos. Em cada um dos poços

havia 6,2 μL de Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (2X) (ThermoScientific), 0,9 μL de oligonucleotídeo *forward*, 0,3 μL de oligonucleotídeo *reverse*, 1-2 μL de cDNA (exceto no NTC, do inglês *No Template Control*) e 2,6-3,6 μL de água livre de nuclease, totalizando 12 μL . As reações de amplificação foram realizadas no equipamento *Applied Biosystems Real Time PCR-system StepOne*TM com programa de desnaturação inicial a 95°C por 10 minutos, 40 ciclos de desnaturação à 95°C por 10 segundos, anelamento a 60°C por 30 segundos e extensão a 72°C por 30 segundos, e extensão final a 72°C por seis minutos.

Para cada reação foram obtidos os ciclos de amplificação cuja fluorescência foi superior ao ruído (também conhecido como Cq, do inglês *Quantification cycle*). Para a seleção dos genes de referência, os valores de Cq foram analisados nos programas *NormFinder* (Andersen et al., 2004) e *BestKeeper* (Pfaffl et al., 2004). Enquanto o programa *BestKeeper* faz uma análise comparada pareada dos Cq dos genes de referência em cada tratamento, através do coeficiente de correlação de Pearson (r) e do cálculo da média geométrica, o programa *NormFinder* hierarquiza um número de candidatos a genes de referência a partir de um valor de estabilidade na expressão gênica entre tratamentos em um determinado experimento, sendo que quanto mais próximo de 0 for o valor, maior a sua estabilidade. Ambos os métodos têm sido utilizados na validação de genes de referência de forma complementar (de Boer et al., 2009; Shen et al., 2010; Ponton et al., 2011).

Após a seleção dos genes de referência, os dados brutos de fluorescência (Rn), tanto dos genes de referência quanto dos genes OBPs-alvo em todos os tratamentos e grupo-controle, foram analisados no programa LinReg (Ramakers et al., 2003; Ruijter et al., 2009). O LinReg foi desenvolvido para realizar o cálculo de eficiência dos pares de oligonucleotídeos sem utilizar uma curva de calibração. Esse método estima a concentração inicial de RNA mensageiro na amostra (ou seja de cDNA, aqui também referido como N₀) e a eficiência de amplificação de um dado par de oligonucleotídeos através da regressão linear dos Rn obtidos por ciclo de amplificação na fase exponencial. A comparação da eficiência média de amplificação dos genes de referência e das potenciais OBPs, bem como do N₀ entre os tratamentos foi realizada pela ANOVA inteiramente casualizada e, no caso de diferença significativa entre pares de médias, pelo teste de Tukey, utilizando-se o programa Winks (v.7.0.6). A taxa relativa de expressão

entre pares de tratamentos com diferença significativa no nível de expressão gênica foi obtida pelo método de eficiência calibrada de Pfaffl (2001).

RESULTADOS

1. Análise do transcriptoma e prospecção de transcritos relacionados à olfação

O número total de *reads* de boa qualidade obtidos no sequenciamento do transcriptoma do parasitoide *T. podisi* foi de 10.519.096 (pareadas) e 11.282.464 (não pareadas). Essas *reads* foram utilizadas para reconstruir as sequências nucleotídicas dos RNA originais presentes na amostra obtida de *T. podisi*, havendo a formação de 51.106 *contigs* com tamanho máximo de 12.696 pb. Os dados brutos do sequenciamento podem ser acessados no *GenBank* utilizando o código PRJNA246261, bem como o conjunto de *contigs* formados pelo código GBEU01000000.

A análise de categorização das funções moleculares dos transcritos identificados no transcriptoma de *T. podisi* revelou a existência de 13 tipos de atividade molecular, (Figura 2.2). As de maior abundância foram as de ligação (p.ex. a íons e odores) e catalíticas.

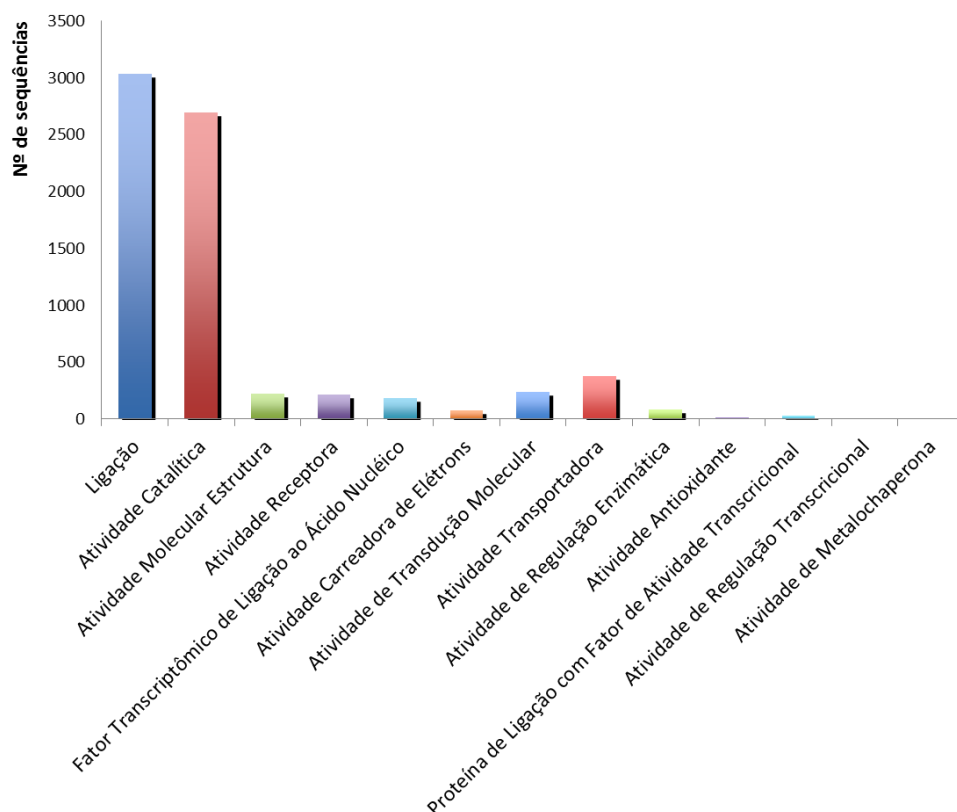


Figura 2.2 – Categorização das funções moleculares dos transcritos identificados no transcriptoma de *T. podisi* (categorização de nível 2) pela análise do *GeneOntology* (GO) do corpo inteiro de fêmeas com vinte dias (n= 7.171 *contigs*).

Vários himenópteros, dentre outras espécies, apresentaram similaridade de transcriptoma com *T. podisi*. A maior similaridade foi observada com a vespa parasitoide *Nasonia vitripennis* (Pteromalidae) (Figura 2.3).

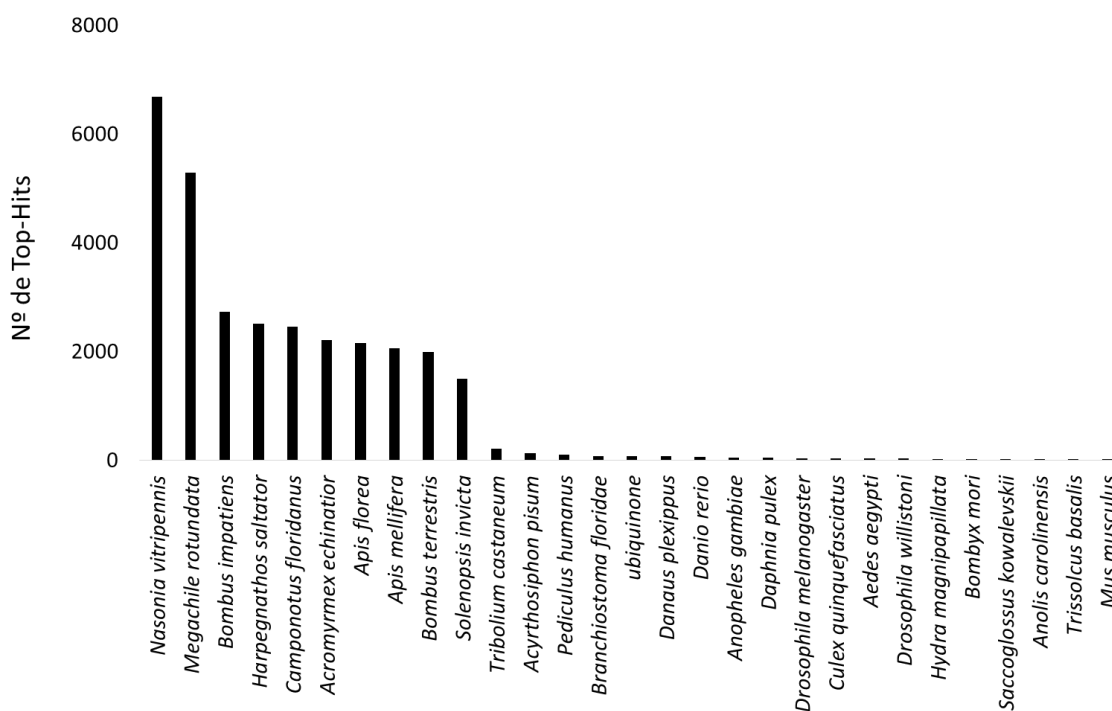


Figura 2.3 – Espécies com maior similaridade com o transcriptoma de *T. podisi* de fêmeas com 20 dias de idade. As barras indicam o número de *hits* de similaridade (n= 31.619, 10,4%, BLASTx hits).

Ao todo foram identificadas no transcriptoma de *T. podisi* sete potenciais transcritos OBPs, cinco CSPs e sete ORs. Os *contigs* correspondentes a todas essas sequências olfativas obtidas estão apresentados na Tabela 2.2.

Tabela 2.2 – Regiões consenso identificadas no transcriptoma do parasitoide *T. podisi* (20 dias) com similaridade para genes relacionados à olfação. As regiões consenso que continham as OBPs *full-length* estão representados com o código de acesso em negrito.

Código de Acesso	Similaridade	Tamanho (pb)	Hits	Valor-E Mínimo	Similaridade Média (%)
GBEU01002338	CSP	1039	10	1,6E-17	71,1
GBEU01000146	CSP1	425	1	6,4E-9	75,0
GBEU01044678	CSP1	301	10	2,5E-10	79,9
GBEU01046987	CSP1	416	2	4,0E-16	62,0
GBEU01043137	CSP2	392	10	2,5E-10	53,5
GBEU01036727	OBP	472	5	1,7E-62	66,8
GBEU01002747	PBP1	727	10	6,7E-15	67,8
GBEU01004571	PBP3	522	10	6,1E-20	66,1
GBEU01026442	PBP3	496	10	1,3E-14	49,6
GBEU01046281	PBP3	606	7	1,0E-11	51,6
GBEU01005726	OBP4	541	10	4,2E-44	66,6
GBEU01035794	OBPa10	781	10	2,9E-38	79,9
GBEU01035690	OR2-like	618	2	4,9E-9	53,0
GBEU01036816	OR13a	365	2	3,2E-16	81,0
GBEU0104899	OR13a-like	395	10	3,9E-14	62,8
GBEU01050959	OR63a-like	352	10	9,2E-16	59,7
GBEU01046354	OR257	399	10	1,1E-11	58,3
GBEU01049919	OR289	314	3	6,9E-24	65,3
GBEU01050340	OR289	349	3	2,3E-14	56,3

Das sete potenciais OBPs identificadas, apenas três estavam com a sequência codificante completa. Isso pode ter ocorrido pela: (1) presença de RNA mensageiros com a região inicial (5') ou terminal (3') faltante(s), (2) baixa cobertura de sequenciamento ou (3) erros de montagem dos *contigs*. As três sequências completas foram nomeadas pela primeira letra do gênero em letra maiúscula, seguida das três primeiras letras do nome da espécie em minúsculo e um numeral em ordem crescente (TpodOBP1, TpodOBP2 e TpodOBP3) e estão apresentadas na Figura 2.4.

TpodOBP1

```
atgaagtcactacacgtcttgtgcctcctaggggtcttcgcgctcgcctcgggagttgag
M K S L H V L C L L G V F A L A S G V E
ataccggatgaactgaaagagatgggtccagatggtacacgaccaatgtacaggggaaact
I P D E L K E M V Q M V H D Q C T G E T
ggagcaagtaatgatgcaatcgaagcaacaaaaaaggaatcttcccagcggatgaccaa
G A S N D A I E A T K K G I F P A D D Q
aaattaaagtgctattttaaataatgcatttatggcaacatgggtgcgatttcagacgaaggt
K L K C Y L K C I Y G N M G A I S D E G
gaattagatgctgaagcattttcatccgtgatgccagaagaattaggggctgttttaaat
E L D A E A F S S V M P E E L G A V L N
ccaatgattaataaatgcaaaggagtcactgggtgcagatggttgtgaattggccttcaac
P M I N K C K G V T G A D G C E L A F N
ttcaacatttgcttgtacaatgcagatcctaagaactacctcgtcatataa
F N I C L Y N A D P K N Y L V I -
```

TpodOBP2

```
atgaaggggaatcacaactgtttttgcggttaactttggtgctcactaccataaaggctgaa
M K G I T T V F A V T L V L T T I K A E
gaaagtttaaaaaacaaaaataatgagagtttttaataactgtaaggaaaagaatcctatc
E S L K T K I M R V F N N C K E K N P I
acggatgctgaacttgcagcatttaggagtgatagatataagttttggttactcacatgat
T D A E L A A F R S A D I S F G Y S H D
gcaaagtgtatgctctcatgtatgcttgaagagggaaaaatgcttaaagatggaagatat
A K C M L S C M L E E G K M L K D G R Y
ttgaaagataatgccttaataatggccgatgtttttcatatggatgattttgatgaagca
L K D N A L I M A D V F H M D D F D E A
gccaaagccagaaaagtaattgaaaattgcgcaaccgaagttcctgaagttggcctgac
A K A R K V I E N C A T E V P E V G P D
caatgtgaatttgcctatgaaatcgctgtatgtggagcaaatgaagctaaaaaacttggga
Q C E F A Y E I A V C G A N E A K K L G
atgaaggagcagcatttttttgaataa
M K E H D F F E -
```

TpodOBP3

```

atgaaaaattcaactaggctgtctgtttggttgatcattggtccttcaaattgcagcaata
M K N S T R L S V W L I I G L Q I A A I
tattgcaaattatcaatcaaagatttaagtgaatgaccaaacgattggggcaagcaaaa
Y C K L S I K D L S E M T K R L G Q A K
tgtttaaaagaaagtggagctaaactcgaacaagttgtagcagcccgatctggaacattt
C L K E S G A K L E Q V V A A R S G T F
gccaatgataataagttaaaatgttactacaaatgtattttggaaacaaatgaaaatgatg
A N D N K L K C Y Y K C I L E Q M K M M
aaagatggctcgatttcaagtagagcacacagagcggcaaatacaaaaacgttatgaaggat
K D G R F Q V E H T E R Q I K N V M K D
tcattacatgaaccattaattcgttcgggtcttaaatgttacaacaaaagaacaaagtct
S L H E P L I R S G L K C Y N K R T K S
gaaccttgatgaattatcttttgaggctgtaaaatggttggtacaactcgaatccttcgtac
E P C E L S F E A V K C W Y N S N P S Y
ttcttttttctaa
F F F -

```

Figura 2.4 – Sequência nucleotídica das três potenciais OBPs identificadas para o parasitoide *T. podisi* e sequência deduzida de aminoácidos correspondente.

A caracterização *in silico* das TpodOBPs está descrita na Tabela 2.3. As três potenciais OBPs apresentaram características físico-químicas e estruturais de outras OBPs identificadas em outros insetos, sendo TpodOBP3 a única exceção pelo ponto isoelétrico básico. A modelagem tridimensional *in silico* das TpodOBPs obtidas não pôde ser realizada devido à ausência de homólogos com similaridade maior que 50% em algum banco de dados.

Tabela 2.3 – Características preditivas das potenciais OBPs identificadas no transcriptoma de *T. podisi*. pI – ponto isoelétrico; MW – massa molecular (Da); pb – Pares de base.

Nome GenBank	Código de Acesso	Cisteínas Conservadas	Aminoácidos	pb	pI	MW	Peptídeo-Sinal	α-hélice
TpodOBP1	KM213237	6	136	411	4,46	14627,9	Amino-Terminal	6
TpodOBP2	KM213238	6	148	447	5,02	16547,1	Amino-Terminal	6
TpodOBP3	KM212339	6	143	432	9,41	16592,5	Amino-Terminal	6

As OBPs de outras espécies de insetos depositadas no *GenBank* de maior similaridade com as identificadas em *T. podisi* estão apresentadas na Tabela 2.4. Das sequências retiradas pôde-se observar que em TpodOBP1 (n=11) 63% delas eram provenientes de coleópteros, 18% para hemípteros, 9% ortópteros e 9% tisanópteros. No

caso de TpodOBP2 (n=10) todas as sequências eram provenientes de hemípteros e, por último, TpodOBP3 (n=6) apresentou 50% de sequências de himenópteros e 50% de sequências de coleópteros. A variação dos valores de identidade foi de 30% (*Osmia cornuta* (Latreille) – Hymenoptera para TpodOBP3) até 89% (*E. heros* – Hemiptera para TpodOBP1) (Tabela 2.4) e apresentaram média de 43% para todas as sequências observadas.

Tabela 2.4 – Sequências selecionadas para análise de similaridade com as TpodOBPs.

	Ordem	Acesso GenBank	Legenda	Espécie	Área de Cobertura (%)	Valor-E	Identidade (%)	
TpodOBP1	Thysanoptera	AEP27187.1	Focc_PBP	<i>Frankliniella occidentalis</i>	86	5E-26	42	
	Orthoptera	AEX33161.1	Lmig_OBP5	<i>Locusta migratoria</i>	80	2E-22	41	
	Hemiptera	ADO24165.1	Eher_OBP2	<i>Euschistus heros</i>	70	6E-55	89	
	Hemiptera	ACZ58030.1	Alin_OBP4	<i>Adelphocoris lineolatus</i>	85	1E-38	57	
	Coleoptera	BAC07270.1	Hpic_OBP1	<i>Heptophylla picea</i>	83	9E-20	35	
	Coleoptera	AAC63437.1	Aosa_PBP	<i>Anomala osakana</i>	83	1E-20	38	
	Coleoptera	EFA04687.1	Tcas_OBP8	<i>Tribolium castaneum</i>	99	6E-22	36	
	Coleoptera	AAQ96921.1	Rpal_OBP4'	<i>Rhynchophorus palmarum</i>	83	5E-26	40	
	Coleoptera	EFA04594.1	Tcas_OBP6	<i>Tribolium castaneum</i>	84	3E-27	46	
	Coleoptera	EFA04593.1	Tcas_OBP7	<i>Tribolium castaneum</i>	96	2E-27	42	
	Coleoptera	AGZ93682.1	Acor_PBP	<i>Anomala corpulenta</i>	99	7E-21	36	
	TpodOBP2	Hemiptera	ADJ18275.1	Eher_OBP	<i>Euschistus heros</i>	99	8,00E-79	82
		Hemiptera	ACZ58027.1	Alin_OBP1	<i>Adelphocoris lineolatus</i>	86	1,00E-35	49
		Hemiptera	ACZ58034.1	Alin_OBP16	<i>Adelphocoris lineolatus</i>	86	2,00E-34	48
Hemiptera		ACZ58033.1	Alin_OBP15	<i>Adelphocoris lineolatus</i>	85	4,00E-34	49	
Hemiptera		AHF71035.1	Llin_OBP8	<i>Lygus lineolaris</i>	86	9,00E-32	45	
Hemiptera		AHF71036.1	Llin_OBP9	<i>Lygus lineolaris</i>	87	7,00E-26	41	
Hemiptera		AFJ54048.1	Aluc_OBP7	<i>Apolygus lucorum</i>	86	7,00E-26	39	
Hemiptera		AHF71033.1	Llin_OBP6	<i>Lygus lineolaris</i>	81	2,00E-26	42	
Hemiptera		AEQ19907.1	Lstr_OBP1	<i>Laodelphax striatellus</i>	77	1,00E-11	31	
Hemiptera		AHF71034.1	Llin_OBP7	<i>Lygus lineolaris</i>	72	3,00E-17	38	
TpodOBP3	Hymenoptera	XP_001603497.1	Nvit_GOBP83	<i>Nasonia vitripennis</i>	84	1,00E-13	32	
	Hymenoptera	AGI05201.1	Ocor_OBP2	<i>Osmia cornuta</i>	83	1,00E-12	30	
	Coleoptera	EFA04594.1	Tcas_OBP6	<i>Tribolium castaneum</i>	81	5,00E-13	36	
	Coleoptera	AAQ96921.1	Rpal_OBP4	<i>Rhynchophorus palmarum</i>	81	4,00E-12	32	
	Coleoptera	EFA04593.1	Tcas_OBP7	<i>Tribolium castaneum</i>	95	2,00E-13	31	
	Hymenoptera	NP_001035316.1	Amel_OBP11	<i>Apis mellifera</i>	91	6,00E-13	35	

O alinhamento da sequência deduzida de aminoácidos das três potenciais TpodOBPs evidenciou a baixa similaridade entre si (de 16,3 a 27,5%), e adicionalmente mostrou o posicionamento conservado de seis cisteínas e padrão de estrutura primária M-K-X38-C-X12-A-X12-K-C-X3-C-X9-D-X31-C-X11-C-E-X7-C-X2-N (Figura 2.5).

```

TpodOBP1  MK-----SLHVLCLLGVFALASGVEIPDELKEMVQMVHDDCTGETGASNDATIEATKKG-I 54
TpodOBP3  MKNSTRLSVWLIIGLQIAATYCKLSIKDLSEMTKRLGQAKCLKESGAKLEQVVAARSG-T 59
TpodOBP2  MKG-----ITTVEAVTLVLTTIKAEESLTKTKIMRVFNCKEKNPITDAELAFRRSADI 53

TpodOBP1  FPADDQKLKCYLKCITYGNMGATSD---EGELDAEAFSSVMPPEELGAVLNP--MINKCKG- 108
TpodOBP3  FANDN-KLKCYYKCIIEQMKMMKDGFRFQVEHTEHQIKNVKDSLHEPLIR--SGLKCYNK 116
TpodOBP2  SFGYSHDAKCMLEEGKMLKDGRYLKDNALIMADVFMDDFDEAAKARKVIENCATE 113

TpodOBP1  VTGADG--CELAFNFNICLYNADPKN-----YLVI- 136
TpodOBP3  RTKSEP--CELSFEAVKWCWYNSNPSY-----FFF-- 143
TpodOBP2  VPEVGPDCCEFAYEIAVCGANEAKKLGMKEHDFE-- 148

```

Figura 2.5 - Alinhamento da sequência deduzida de aminoácidos das três TpodOBPs identificadas em *T. podisi* de 20 dias de idade (ClustalW2). As setas indicam os resíduos conservados de cisteína.

O alinhamento das sequências deduzidas de aminoácidos de cada TpodOBP com as de OBPs que apresentaram maior valor de identidade no *GenBank* (>30%) e com as nove OBPs de percevejos, confirmaram sua similaridade pelo posicionamento conservado dos seis resíduos de cisteínas. Esse padrão clássico de uma OBP sugere que as TpodOBPs são proteínas distintas e produzidas por genes diferentes, descartando a hipótese de *splicing* por possuírem baixa identidade entre si (Figura 2.6)

```

→ Tpod_OBP1      VQMV-HDQCCTGETGASND-----AIEATKKGIF-PADDQKLK----CYLKCITYGNMGAI 76
Eher_OBP2      -----GATDD-----AIQATKKGVF-PADDQKLK----CYLKCITYSNMGAI 36
Alin_OBP4      AQGL-HDSCVEETGVNDG-----LIAPCAKGNF--ADDAKLR--CYFKCVFNGLVI 73
Aosa_PBP      AKQL-HNDCVAQTGVDEA-----HITTVKDQKG-FPDDEKFK----CYLKLCLMTEMAIV 56
Acor_PBP      AKQL-HNDCVAQTGVDEA-----HITTVKDQKG-FPDDEKFK----CYLKLCLMTEMAIV 75
Hpic_OBP1     AKQL-HDDCVGQTVGDEA-----HIGTVKDQKG-FPDDEKFK----CYLKLCLMTEMAIV 54
Tcas_OBP8     VNQL-HSTCVAVETGVSE-----LINKVNSDKV-MIDDEKLLK----CYLKLCLTETGCI 73
Tcas_OBP6     ANTL-HATCVDETVGSED-----AIESARKGN--FAPDDKLLK----CYMKCLMEQMGAI 73
Rpal_OBP4     AQQ-LHNTCVSETGTTED-----AITNARAGT--FTDDEKFK----CYLKLCLLDQMAIV 53
Tcas_OBP7     INNL-HNTCTGETGATDD-----QIENARKGN--FAEDDSFK--CYFKCVFDQMGCM 77
Focc_PBP      MKQL-RSACMAETGVDEA-----TIDACKTGQ--FADDPKLLK----CYLKCITYQQMTVM 78
Lmig_OBP5     MDQL-HQTCVGVESGVSSE-----NIDAARKGN--FIDDGNLK----CYMKCIFVQMTCM 105
CubiOBP3     LRSQ-LEECRSSFNVTD-----EVKGITLQKA--PASQEGK----CYLHCFISRMDVM 71
EherOBP3     LRSQ-LEECRSSFNVSE-----EIKGITLQKP--PSSHEGK----CYLHCFISRMDVM 71
→ Tpod_OBP2     IMRV-FNNCKEKNPTDA-----ELAAFRSADISFGYSHDAK----CMLSCMLEEGKML 75
Eher_OBP      IMKV-FNTCKEKHPVTDD-----ELAARFADIGFGYSHDAK----CMLACMLEEGKML 75
Alin_OBP1     VAKA-FNKCREEFPIISD-----EIGGVREKTT-IPESHNAK----CLMACMLREGKML 73
Alin_OBP16    VAKA-FNKCREEFPIISD-----EIGGVREKTT-IPESHNAK----CLMACMLREGKML 73
Alin_OBP15    VAKA-FNKCREEFPIISD-----EIGGVREKTT-IPESHNAK----CLMACMLREGKML 86
Llin_OBP8     VAKA-FNKCHGEFFPIGDD-----EMKGVREKST-VPDSHNAK----CLMACMLKEGKIL 73
Llin_OBP9     VAKA-FNKCHGEFFPIGDD-----EMKGVREKST-VPDSHNAK----CLMACMLKEGKIL 73
Aluc_OBP7     VAKA-FNKCFGEFFPLGDD-----EMKEVVDKST-VPSSHNAK----CLMACMLKEGRIL 73
Llin_OBP6     VTEI-FNKCKETWPTDE-----EIEQVKQK-QSIPESKNVK----CILACMLKEAKIL 75
Llin_OBP7     VTEI-FNKCKETWPTTR-----GNXTSENRSRAFNPKNVK----CILACMLKEAKIL 60
Lstr_OBP1     MLTV-FNKCRDETSATED-----DIKTFRAQQI--PSTTTGK----CMLACMFNHSGLM 54
CubiOBP1     PRQP-PNCCDQPYPTDHMRKQLVACIRQYGAPSSAVLTEKSIRERRSVEECVYRSAGFI 91
EherOBP6     PRQP-PNCCDQPYPSDEMRKHLVSCIRQFVAPTSVAVLTEKSIRERRSVEECVYRSAGFI 90
Amel_OBP11_PREC_ TSKY-RKKCIGETKTIE-----DVEATEYGEF--PEDEKLLK----CYFNCVLEKFNVM 82
→ Tpod_OBP3     TKRLGQAKCLKESGAKLE-----QVVAARSGTF--ANDNKLK----CYYYKCIIEQMKMM 80
Ocor_OBP2     AKGM-RNVCLQKIHTTEA-----MVDGLRRGEF--PEDENLK----CYTHCIMKTMRSF 78
CubiOBP2     IKVA-VDECKNQHNIDSD-----QIKTAFDKKK-IPETANGK----CFMSCVMEKMGVL 72
CubiOBP4     LEHKIFLKCMAADGNITES-----AVESIFKKLE-IPDTRS IK----CLLGCYMKMGYGL 76
EherOBP4     VITA-VTTCAKEHNAELK-----DILEIMRQNK-LPETKEQK----CVVGCFFEKMEYV 75
DmelOBP3     MKTL-RNMCMPKSGVSK-----ALASMKEGNF-DDDDRKLK----CYLGCIMNMMQV 81
EherOBP5     IKQALLQEALEVLGEPKE-----KIRREKRATFSNEERRVAG----CLLQCIYRKMAL 95

```

→ Tpod_OBP1	SDE-GELDAEAFSSVMP-----EELGAVLNPMINKCKGVTG-----ADGCELAF 119
Eher_OBP2	SDD-GELDAEAFSSVMP-----EDLGAVLNPMIEKCKGVTG-----PDSCELAF 79
Alin_OBP4	SDE-GELDAEAFSGILP-----DSMQELL-PTIKSCGGTTG-----SDPCDLAM 115
Aosa_PBP	GDD-GVVDIEAAVGVMP-----DEYKAKAEPVIRKCGVIPG-----ANPCDNVY 99
Acor_PBP	GDD-GVVDVEAAVGVLP-----DEYKAKAEPVIRKCGVKPG-----ANPCDNVY 118
Hpic_OBP1	GDD-GVVDVEAAVGVLP-----DEFKDKAEPIMRKCCKGVPK-----ANPCDNVY 97
Tcas_OBP8	SDD-GVVDVEATIALLP-----EDMKAKTTPVIRSCGAKMG-----ANPCESAW 116
Tcas_OBP6	DDE-GI LDVEATIAVLP-----EYQAKAEPVIRKCGTKIG-----ANACDNF 116
Rpal_OBP4	DEE-GRIDVEAMIAVLP-----EEFQDSLPPVIRKCDTIIG-----ANACDNVW 96
Tcas_OBP7	TDD-GKVDSEAVIAVMP-----PELADKIASTVRGC-TEVG-----ANPCETAW 119
Focc_PBP	DDD-GVVDADMLLTMLP-----EETQPKAEPVVNACKEMRG-----ADACDNAM 121
Lmig_OBP5	SDD-GVFDADTAIAMPL-----DNLKDVASKALNACKGEKG-----SDACDTAF 148
CubiOBP3	TEE-GQMNSEGKGLVREIPDIKETELKKLEQVADKCGEVP-----LGEDRCENAV 121
EherOBP3	TEE-GKMNAEGMKGVVREIPNIKESDLKKLEKVDKCEVSEV-----LGEDRCENAV 121
→ Tpod_OBP2	KD--GRYLKDNALIMADVFMDDFDEAAKARKVIENCATEVP-E-----VGPDQCEFA 126
Eher_OBP	KD--GKYLKENALIMADVFIHDDFDEAAKARKVIENCSEVSEV-E-----VGPDQCEFA 126
Alin_OBP1	RD--GKYEKENALIMADVLNKDDPASADKAKQLVETCAGKVGTD-----AGGDECEFA 125
Alin_OBP16	RD--GKYEKENALIMADVLNKDDPATADKAKQLVETCAGK---D-----AGGDECEFA 122
Alin_OBP15	RD--GKYEKENALIMADVLNKDDPASADKAKQLVETCAGKVGTD-----AGGDECEFA 138
Llin_OBP8	RD--GKYEKENAIVMADVLNKDDPAADKAKQLVETCATQVGS-----ASADECEFA 125
Llin_OBP9	RD--GKYEKENAIVMADVLNKDDPAADKAKQLVETCATQVGS-----ASADECEFA 125
Aluc_OBP7	RG--GKYELENAIIMADVLNKDNHAATDKAKQLIETCAAQVGT-----ASADECEFA 125
Llin_OBP6	RD--GEYNKENAELMADVLYKDEPEHAEXSKQIEMCSAELGK-----TEGDDCEFA 127
Llin_OBP7	RD--GEYNKENAELMADVLYKDEPEHAEXSKQIEMCSAELGK-----TEGDDCEFA 112
Lstr_OBP1	KD--GKYDSEGALKLVGVFADNP1KLGKARQLINGCTDEVK-----NENDECEFA 104
CubiOBP1	NKEDSVLQREAEIEQLKSVAG--DSWEKAISESLNACFKAEAEI-----EDSLSASSSV 143
EherOBP6	NKDDNVLQREAEIEQLKSVAG--KSWGKAITASLDACFKAEAEEL-----EDSDSASSSV 142
Amel_OBP11_PREC_	DKKNGKIRYNLLKKVIP----EAFKEIGVEMIDSCSNVDS-----SDKCEKSF 126
→ Tpod_OBP3	KD--GRFQVEHTERQIKN-----VMKDSLHEPLIRSGLKCYNKR-----TKSEPCELSF 127
Ocor_OBP2	KN--GAIDFNMTMKQIDMSMP--ADMATRMKETVRKCSLEIT-----GDPCHITF 125
CubiOBP2	KD--GKVDLDRILELNRKFK-DEPNLKGKADIANRCANVES-----PDNKECSLAT 121
CubiOBP4	ADD-GKIDWKKLDEINKVEYLD-PEQEKKALEVSVTCSKSVQ-----NLGNICDAGY 127
EherOBP4	TDN--KVDWEKVKALNPQKYDT-PELVEKVNQVTDECAKVVVG-----KYSIDICELGT 125
DmelOBP3	KN--GKISMTMVKNQITKMVD--PTWGAKLVATFESCSNVEG-----SDNCDLAY 127
EherOBP5	DGS-NLPKATGLVELFTEGVTDKNYLTIQGVQCMKEIKQINANGTFTEGYTCVAV 154
→ Tpod_OBP1	N-----FNICLYNA--DPKNYLVI----- 136
Eher_OBP2	N-----FNICLYNA--DNKNYLVI----- 96
Alin_OBP4	N-----FNKCLQKA--DPVNFLVI----- 132
Aosa_PBP	Q-----THKCYDYD--DPQSYMIV----- 116
Acor_PBP	Q-----THKCYDYD--DPQSYMIV----- 135
Hpic_OBP1	Q-----THKCYDYD--DPNSYMIV----- 114
Tcas_OBP8	L-----THKCYLET--SPADYVLI----- 133
Tcas_OBP6	L-----TNKQWYEE--DPEDYFLV----- 133
Rpal_OBP4	L-----TQQCYEKE--NPEHYFLI----- 113
Tcas_OBP7	L-----ANKCYQKS--NPDMYFVP----- 136
Focc_PBP	M-----FNKCLYEK--APDYVMVV----- 138
Lmig_OBP5	K-----INQCLFKQ--APKDYILV----- 165
CubiOBP3	T-----IYDCINS--VADELGVKGS----- 140
EherOBP3	T-----IYNCINT--ESDQLGVKGPENWCT----- 145
→ Tpod_OBP2	E-----IAYCGAN--EAKKLGKMEH----- 144
Eher_OBP	K-----MAVCGAN--ESKKGKMEH----- 144
Alin_OBP1	K-----MAVCAAE--EAKKLGVRP----- 142
Alin_OBP16	K-----MAVCAAG--EAKKLGVRP----- 139
Alin_OBP15	K-----MAVCAAE--EAKKLGVRP----- 155
Llin_OBP8	K-----MAVCAAG--EAKKLGVRP----- 142
Llin_OBP9	K-----MAVCAAAWSSSTRFLKTHPFLQLCTHRSTWHTFKYEYL 165
Aluc_OBP7	K-----MALCASD--EAKKLGVRP----- 142
Llin_OBP6	K-----MS--VCASKHAKELGVKTP----- 145
Llin_OBP7	QGGQ-----LKIMENSFTLRSLADCLNRRYP----- 139
Lstr_OBP1	K-----IADCTVK--MSSQVGLS----- 120
CubiOBP1	EEESSCSSIPERLTFCLSRQLFLNCPEDTWKNTQECQVVKRMEECKQLLPPPPPIRFIRP 203
EherOBP6	EEESSCSSIPERLTFCLSRNLFLNCPEDVWNTQECQIVKNRMEECKQLLPPPPPIRFIRP 202
Amel_OBP11_PREC_	M-----FMKMYEV--NPIAFIAP----- 143
→ Tpod_OBP3	E-----AVKQWYNS--NPSYFFF----- 143
Ocor_OBP2	E-----YLKCMYRT--DPETFFF----- 142
CubiOBP2	E-----LAKCALKNAFELKLEVPKDEI----- 143
CubiOBP4	A-----AGKFLDEAKKIGLHIFTPAVQE----- 152
EherOBP4	P-----AIKCLKEEAEKIQLPKPDVKFDLKH----- 151
DmelOBP3	IS-----ESVFMKL--TKMHL----- 141
EherOBP5	D-----LFMCVSKQIEICGILP----- 172

Figura 2.6 – Alinhamento parcial das regiões de *Tpod*OBP3, OBP2 e OBP1 obtidas no *GenBank* (identidade >30%) obtidas pelo BLASTx (ClustalW2) e de percevejos. As colunas destacadas com fundo negro demonstram a similaridade entre elas pela representação dos

resíduos de cisteína conservados. As setas em vermelho indicam a localização das TpodOBPs. Eher – *Euschistus heros*; Alin – *Adelphocoris lineolatus*; Focc – *Frankliniella occidentalis*; Lmig – *Locusta migratoria*; Aosa – *Anomala osakana*; Acor – *Anomala corpulenta*; Hpic – *Heptophylla picea*; Tcas – *Tribolium castaneum*; Rpal – *Rhynchophorus palmarum*; Llin – *Lygus lineolaris*; Aluc – *Apolygus lucorum*; Lstr – *Laodelphax striatellus*; Amel – *Apis mellifera*; Ocor – *Osmia cornuta*.

A relação filogenética para *T. podisi* foi feita a partir da comparação de 217 OBPs hipotéticas de 36 espécies com grande representação de *Solenopsis* spp. (18 espécies), *N. vitripennis* (90 sequências) e *Apis* spp. (42 sequências) (Anexo II). As três TpodOBPs foram alocadas em diferentes partes da árvore filogenética e provavelmente são produtos de genes diferentes e estão associadas ao reconhecimento de odores diferentes. Os valores obtidos de Bootstrap para as relações cladísticas mais próximas (TpodOBP1 – 27, TpodOBP2 – 60 e TpodOBP3 – 56) não foram suficientes para se estabelecer alguma relação entre as OBPs obtidas por *T. podisi* e as demais sequências utilizadas (Figura 2.7). A história evolutiva das OBPs de *T. podisi* deve ter ocorrido de forma independente às outras OBPs identificadas em himenópteros.

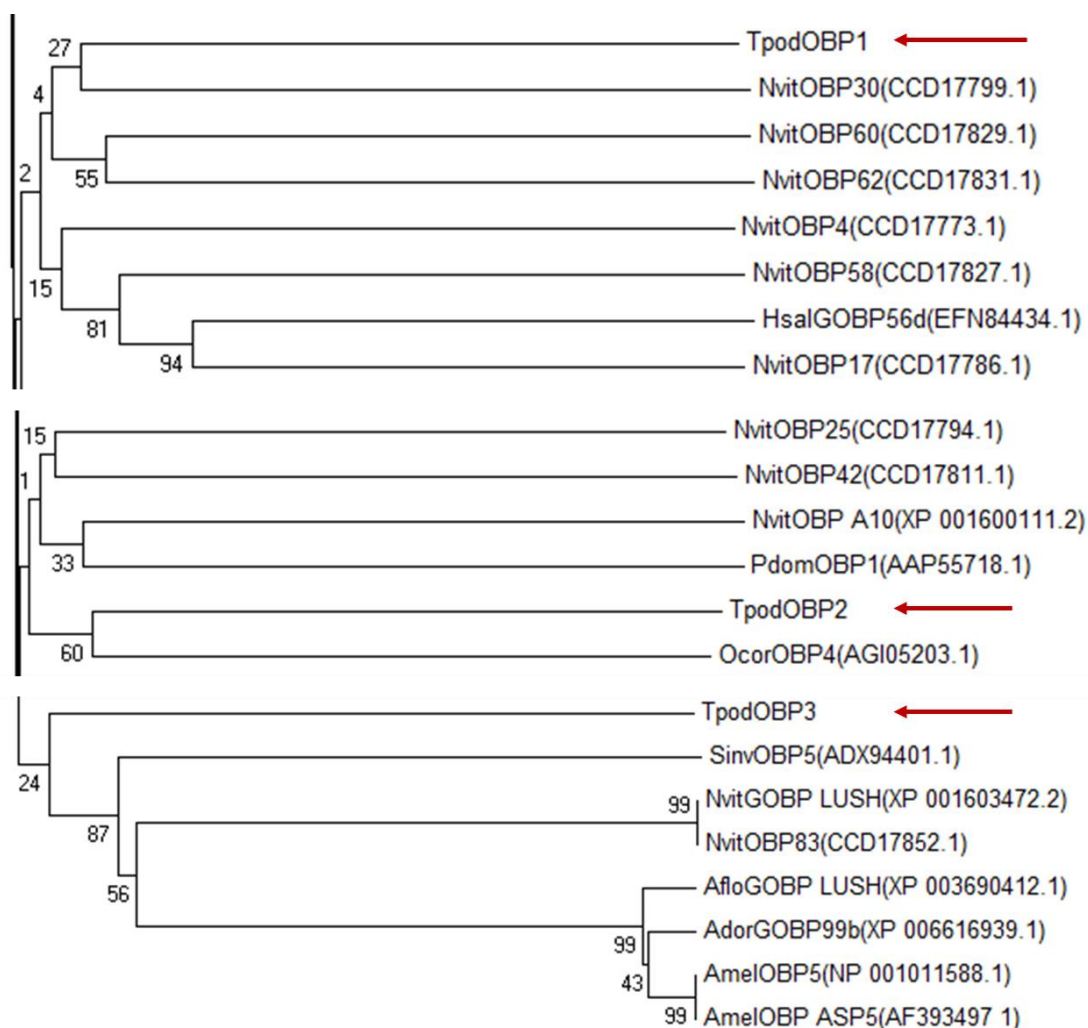


Figura 2.7 – Árvore parcial das relações filogenéticas entre as potenciais OBPs de *T. podisi* e de outras 217 OBPs de himenópteros. A árvore foi construída utilizando o método de *neighbor-joining* (MEGA 6.06). Os números de acesso do *GenBank* estão incluídos entre parentêses logo após o nome das OBPs.

2. Expressão das TpodOBPs em função das experiências olfativas

Os genes de referência selecionados foram: Tubulina, Actina, Miosina e Ribossomo 40S. No entanto, a análise para validação dos genes de referência utilizando os programas *BestKeeper* e *NormFinder* demonstrou que os melhores candidatos para análise de expressão relativa foram Miosina e Actina (Tabela 2.5). Além disso, a eficiência média de todos os pares de oligonucleotídeos foram: Tubulina – 1,468; Actina – 1,414; Miosina – 1,433; Ribossomo 40S – 1,677; TpodOBP1 – 1,542; TpodOBP2 – 1,493; TpodOBP3 – 1,536.

Tabela 2.5 – Dados obtidos através dos programas *BestKeeper* e *NormFinder* para validação de genes de referência.

	<i>BestKeeper</i>					<i>NormFinder</i>
	N	Média Geométrica (Cq)	Desvio-Padrão	Coeficiente de Determinação	P	Valor de Estabilidade
Tubulina	30	31,07	0,61	0,29	0,002	0,021
Actina	30	32,18	0,35	0,41	0,001	0,005
Miosina	30	24,03	0,28	0,6	0,001	0,005
Ribissomo 40S	30	19,77	0,43	0,21	0,01	0,022

Em relação ao nível de expressão das três TpodOBPs não houve diferença no de expressão em nenhum dos tratamentos pela ANOVA (TpodOBP1 – $F_{4,4} = 2,11$; $P = 0,2438$; TpodOBP2 – $F_{4,4} = 1,15$; $P = 0,4478$; TpodOBP3 - $F_{4,4} = 2,56$; $P = 0,1926$).

DISCUSSÃO

No presente trabalho foram prospectados transcritos relacionados à olfação do parasitoide de ovos *T. podisi* de adultos com 20 dias de idade com foco na obtenção de potenciais OBPs. O transcriptoma apresentou categorização funcional equivalente com os demais transcriptomas de insetos e similaridade mais alta com transcriptomas de himenópteros. Ao todo foram obtidos 51.106 *contigs*, dos quais foram identificados 19 transcritos potencialmente associados à olfação (sete OBPs, cinco CSPs e sete ORs, sendo três OBPs completas). Nishimura et al. (2012) obtiveram 17.238 *contigs* para a vespa parasitoide *Cotesia vestalis* (Hymenoptera: Braconidae) através do pirosequenciamento das antenas e encontraram 22 OBPs e 6 ORs. O número de OBPs obtidas no presente trabalho também foi menor do que a análise genômica de outros himenópteros, como no caso de *Solenopsis invicta* (Hymenoptera: Formicidae) com 12 OBPs hipotéticas (Wurm et al., 2012), *Apis mellifera* 21 OBPs (Hymenoptera: Apidae) (Foret e Maleszka, 2006) e o parasitoide *N. vitripennis* 90 OBPs (Hymenoptera: Pteromalidae) (Vieira et al., 2012). No entanto, o número encontrado para *T. podisi* foi maior do que o obtido no sequenciamento do transcriptoma de *Osmia cornuta* (Hymenoptera: Megachilidae) (Yin et al., 2013), por exemplo, no qual de 85.143 *contigs*, apenas seis OBPs hipotéticas foram identificadas. Os resultados obtidos podem ser justificados pela idade dos parasitoides utilizados que pode ter afetado a expressão de genes relacionados à olfação e/ou ao fato de não ter sido utilizada uma biblioteca de sequenciamento de RNA das antenas do parasitoide, tendo em vista que seu tamanho diminuto dificultou esse processo.

A caracterização *in silico* das TpodOBPs completas mostrou que apresentam características físico-químicas e estruturais da família protéica das OBPs, seguindo padrão clássico de seis resíduos de cisteína em posições conservadas na estrutura primária (Vogt et al., 1991; Pikielny et al., 1994; Pelosi e Maida, 1995; Pelosi et al., 1996; Maibeche-Coisne et al., 1998).

A comparação intraespecífica das TpodOBPs mostrou que elas apresentam baixa similaridade entre si, indicando baixa probabilidade de serem produtos do mesmo gene, como variedades de *splice* e que provavelmente reconhecem diferentes partículas de odor. De modo geral, a identidade das OBPs analisadas nesse trabalho variou consideravelmente. Hua et al. (2012) também reportou ampla variedade de homologia entre OBPs (8% até 98%), o que de acordo com Steinbrecht (1996) se deve ao fato das OBPs se ligarem aos compostos químicos de estrutura semelhantes ou não, ou seja, ao

contexto ecológico e não necessariamente apenas ao histórico evolutivo. Vale ressaltar que a similaridade entre as TpodOBPs e as OBPs encontradas em outras espécies mostra que elas podem reconhecer odores idênticos ou similares (TpodOBP1 x EherOBP2: 88,5% e TpodOBP2 x EherOBP1: 82,4%), evidenciando molecularmente a possibilidade de que o parasitoide perceba pistas químicas dos hospedeiros. Os resultados de homologia funcional das OBPs do inimigo natural e do hospedeiro foram corroborados pela análise filogenética, tendo em vista que as TpodOBPs não apresentaram valores de *Bootstrap* significativos (>95) com as OBPs de 36 espécies de himenópteros, dentre as quais estavam OBPs de vespas parasitoides.

A maioria dos ortólogos (Tabela 2.4) com alguma similaridade com as potenciais TpodOBPs ainda não foi validada funcionalmente, dificultando a predição funcional mais detalhada. A validação funcional de potenciais OBPs tem sido realizada através de ensaios de ligação com potenciais ligantes (alomônios e sinomônios, p.ex.) (Ban et al., 2002; Tegoni et al., 2004; Biessmann et al., 2010). No entanto, para isso é necessário realizar a clonagem, a expressão heteróloga e a purificação de tais OBPs-alvo, o que excederia o prazo de conclusão do mestrado. Dos 19 transcritos selecionados, apenas três foram validados funcionalmente (Wojtasek et al., 1998; Nagnan-Le et al., 2004; Ji et al., 2013), no entanto a similaridade entre elas e as TpodOBPs não foi alta o suficiente (< 60%) para poder realizar tal associação. Apesar das análises preditivas sugerirem fortemente que as potenciais TpodOBPs de *T. podisi* são relacionadas à olfação, não observou-se alteração na expressão gênica de tais TpodOBPs quando as fêmeas foram expostas aos compostos feromonais dos hospedeiros. Três hipóteses podem ser traçadas para justificar esse resultado. A primeira estaria relacionada à nenhuma das TpodOBPs estarem relacionadas à percepção de feromônios sexuais desses hospedeiros, a segunda que o inseto não associou o volátil presente no bioensaio a alguma recompensa que poderia alterar sua expressão e, por último, que a utilização do corpo inteiro do inseto para identificação de OBPs pode ter reduzido as chances de identificar aquelas relacionadas à olfação de pistas liberadas pelos seus hospedeiros. Considerando as duas primeiras hipóteses sugeridas, Farias et al. (2014) demonstraram através de RT-qPCR que a expressão de EherOBP1 e EherOBP2 é maior em percevejos machos do que fêmeas, sugerindo que a função ecológica dessas proteínas não esteja associada à percepção de algum dos compostos do feromônio sexual de *E. heros*, considerando que são os machos que liberam o feromônio sexual e as fêmeas interpretam esses sinais. Assim sendo,

TpodOBP1 e TpodOBP2 poderiam estar relacionadas ao reconhecimento de um feromônio de alarme.

Justice et al. (2003) demonstraram que experiências prévias em *Anopheles gambiae* (Giles) (Diptera: Flebotomidae) podem alterar o perfil de expressão de algumas OBPs, associando-o a aspectos comportamentais da espécie. No entanto, ainda não foram realizados trabalhos que mostrem mudanças no perfil de expressão de OBPs para estímulos que não estejam associados a uma recompensa.

CONCLUSÃO

Como esperado, *T. podisi* produz transcritos relacionados potencialmente à olfação, dentre os quais, essas OBPs tiveram similaridade maior com as de hospedeiros em potencial do que as identificadas em outros parasitoides, sugerindo a capacidade do mesmo em captar pistas relacionadas aos hospedeiros preferenciais. No entanto, as OBPs identificadas não estão relacionadas a olfação de compostos feromonais dos hospedeiros.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente trabalho observou a resposta olfativa de duas vespas parasitoides, *T. podisi* e *Tr. basalis*, em relação ao feromônio sexual de hospedeiros (*E. heros*, *P. guildinii* e *N. viridula*) em bioensaios de olfatometria. Os resultados demonstraram que os parasitoides são atraídas pelos feromônios sexuais de possíveis hospedeiros, dependendo da sua concentração ou do componente utilizado na mistura e que essas espécies respondem diferencialmente a cada um dos tratamentos. O parasitoide *T. podisi* possui genes que potencialmente estão relacionados à olfação de semioquímicos. No entanto, ainda não foram identificados aqueles relacionados a olfação de alguns compostos feromonais dos hospedeiros preferenciais.

BIBLIOGRAFIA

ANDERSEN CL, JENSEN JL e ORNTTOFT TF (2004) Normalization of Real-Time Quantitative Reverse Transcription-PCR Data: A Model-Based variance estimation approach to identify genes suited for normalization, applied to bladder and colon cancer data sets. *Cancer Research*. 64: 5245-5250.

ASHBURNER M, BALL CA, BLAKE JA, BOTSTEIN D, BUTLER H, CHERRY M, DAVIS AP, DOLINSKI K, DWIGHT SS, EPPIG JT, HARRIS MA, HILL DP, ISSELTARVER L, KASARSKIS A, LEWIS S, MATESE JC, RICHARDSON JE, RINGWALD M, RUBIN GM, e SHERLOCK G (2000) Gene Ontology: tool for the unification of biology. *Nature Genetics*. 25: 25-29.

AUSTIN AD, JOHNSON NF e DOWTON M (2005) Systematics, evolution, and biology of scelionid and platygastriid wasps. *Annual Review of Entomology*. 50: 553-582.

BAKER R, BORGES M, COOKE NG e HERBERT RH (1987) Identification and synthesis of (Z)-(1'S,3'R,4'S)(-)-2-(3',4'-Epoxy-4'-methylcyclohexyl)-6-methylhepta-2,5-diene, the sex pheromone of the southern green stinkbug, *Nezara viridula* (L.). *Journal of Chemical Society*. 414-416.

BAKER TC e ROELOFS WL (1981) Initiation and termination of oriental fruit moth male response to pheromone concentrations in the field. *Entomological Society of America*. 10 211-218.

BAN L, ZHANG L, YAN Y e PELOSI P (2003) Binding properties of a locust's chemosensory protein. *Biochemical and biophysical research and communications*. 293: 50-54.

BIESSMANN H, ANDRONOPOULOU E, BIESSMANN MR, DOURIS V, DIMITRATOS SD, ELIOPOULOS E, GUERIN PM, IATROU K, JUSTICE RW, KROBER T, MARINOTTI O, TSITOURA P, WOODS DF e WALTER MF (2010) The *Anopheles gambiae* Odorant Binding Protein 1 (AgamOBP1) mediates indole recognition in the antennae of female mosquitoes. *PLoS ONE*. 5 (3).

BOLGER AM, LOHSE M e USADEL B (2014) *Trimmomatic*: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics*. 1-7.

BORGES M, COSTA MLM, SUJII ER, CAVALCANTI MG, REDÍGOLO GF, RESCK IS e VILELA EF (1999) Semiochemical and physical stimuli involved in host recognition

by *Telenomus podisi* (Hymenoptera: Scelionidae) toward *Euschistus heros* (Heteroptera: Pentatomidae). *Physiological Entomology* 24: 227-233.

BORGES M, MILLAR JG, LAUMANN RA e MORAES MCB (2007) A male-produced sex pheromone from the neotropical redbanded stink bug, *Piezodorus guildinii* (W.). *Journal of Chemical Ecology*. 33 (6): 1235-1248.

BORGES M, MORAES MCB, LAUMANN RA, PAREJA M, SILVA CC, MICHEREFF MFF e PAULA DP (2011) Chemical ecology studies in soybean crop in Brazil and their application to pest management. *Soybean – Biochemistry, Chemistry and Physiology*. Cap. 4.

BORGES M, MORI K, COSTA MLM e SUJII ER (1998b) Behavioural evidence of methyl-2,6,10-trimethyltridecanoate as a sex pheromone of *Euschistus heros* (Pentatomidae). *Journal of Applied Entomology* 122: 335-338.

BORGES M, SCHIMIDT FGV, SUJII ER, MEDEIROS MA, MORI K, ZARBIN PHG e FERREIRA JTB (1998a) Field responses of stink bugs to the natural synthetic pheromone of the Neotropical brown stink bug, *Euschistus heros* (Heteroptera: Pentatomidae). *Physiological Entomology* 23: 202-207.

BORROR DJ e DELONG DM (2011) Estudo dos insetos. 7ª ed. Ed. São Paulo: Cenagage Learning. 809p.

BRUNI R, SANT'ANA J, ALDRICH JR e BIN F (2000) Influence of host pheromone on egg parasitism by scelionid wasps: Comparison of phoretic and nonphoretic parasitoids. *Journal of Insect Behaviour*. 13 (2): 165-173.

BYERS JA (2007) Simulation of mating disruption and mass trapping with competitive attraction and camouflage. *Environmental Entomology*. 36(6): 1328-1338.

BYERS JA (2013) Modelling female mating success during mass trapping and natural competitive attraction of searching males or females. *Entomologia Experimentalis et Applicata*. 145: 228-237.

CHABI-OLAYE A, SCHULTESS F, POEHLING HM e BORGERMEISTER C (2001) Host location and host discrimination behavior of *Telenomus isis*, an african parasitoid of the african cereal stem borer *Sesamia calamistis*. *Journal of Chemical Ecology*. 27 (4). 663-678.

CHAPMAN RF (2013) *The insects: structure and function*. Cambridge University Press. 5th edition. p. 771-857.

CHOMCZYNSKI P e SACCHI N (1987) Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Analytical Biochemistry* 162: 156-159.

CINGOLANI MF, GRECO NM e LILJESTHRÖM GG (2013) Multiparasitism of *Piezodorus guildinii* eggs by *Telenomus podisi* and *Trissolcus urichi*. *Biological Control*. 58: 37-44.

COLAZZA S, ROSI C e CLEMENTE A (1997) Response of egg parasitoid *Telenomus busseolae* to sex pheromone of *Sesamia nonagrioides*. *Journal of Chemical Ecology*. 23(11): 2437-2444.

COLAZZA S, SALERNO G e WAJNBERG E (1999) Volatile and contact chemicals released by *Nezara viridula* (Heteroptera: Pentatomidae) have a kairomonal effect on the egg parasitoid *Trissolcus basal*s (Hymenoptera: Scelionidae). *Biological Control*. 16: 310-317.

COLE C, BARBER JD e BARTON GJ (2008) The Jpred 3 secondary structure prediction server. *Nucleic Acids Research*. 36: 197-201.

CONAB – Companhia Nacional de Abastecimento. 2014. Acompanhamento da safra brasileira: grãos, Décimo primeiro levantamento, Agosto, 2014. Brasília – DF. <http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/14_08_07_08_59_54_boletim_graos_agosto_2014.pdf>.

CONESA A, GOTZ S, GARCÍA-GOMEZ JM, TEROL J, TALÓN M, e ROBLES M (2005) Blast2GO: a universal tool for annotation, visualization and analysis in functional genomics research. *Bioinformatics Applications Note*. 21: 3674-3676.

CORRÊA-FERREIRA BS (2002) *Trissolcus basal*s para o controle de percevejos da soja. In: *Controle Biológico no Brasil, Parasitoides e predadores*. São Paulo: Ed. Manole. 449-476.

CORRÊA-FERREIRA BS e MOSCARDI F (1994) Seasonal occurrence and host spectrum of egg parasitoids associated with soybean stink bugs. *Biological Control* 5: 196-202.

- DAUPHIN G, COQUILLARD P, COLAZZA S, PERI E e WAJNBERG E (2009) Host kairomone learning and foraging success in an egg parasitoid: a simulation model. *Ecological Entomology*. 34: 193-203.
- De BOER ME, de BOER TE, MARIEN J, TIMMERMANS MJTN, NOTA B, van STRAALLEN NM, ELLERS J e ROELOFS D (2009) Reference genes for QRT-PCR tested under various stress conditions in *Folsomia candida* and *Orchesella cincta* (Insecta, Collembola). *BMC Molecular Biology*. 10: 54.
- DICKE M (2009) Behavioural and community ecology of plants that cry for help. *Plant, Cell and Environment*. 32: 654-665.
- EGGLETON P e BELSHAW R (1992) Insect parasitoids: an evolutionary overview. *Philosophical Transactions of the Royal Society*. 337: 1-20.
- FAN J, LIU FY, CHEN JL e CHENG DF (2011) An overview of odorant-binding protein functions in insect peripheral olfactory reception. *Genetics and Molecular Research* 10(4): 3056-3069.
- FARIAS LR, PAULA DP, ZHOU JJ, LIU R, PAPPAS JR. GR, MORAES MCB, LAUMANN RA, BORGES M, BIRKETT MA, PICKET JA, FIELD LM e BÁO SN (2014) Identification and expression profile of two putative odorant-binding proteins from the neotropical stinkbug, *Euschistus heros* (Fabricius) (Hemiptera: Pentatomidae). *Neotropical Entomology*. 43: 106-114.
- FIELD LM, PICKETT JA e WADHAMS LJ (2000) Molecular studies in insect olfaction. *Insect Molecular Biology*. 9(6): 545-551.
- FORÊT S e MALESZKA R (2006) Function and evolution of a gene family encoding odorant binding-like proteins in a social insect, the honey bee (*Apis mellifera*). *Genome Research*. 16: 1404-1413.
- GANDOLFI M, MATTIACCI L e DORN S (2003) Preimaginal learning determines adult response to chemical stimuli in a parasitic wasp. *Proceedings of the Royal Society: Biological Sciences*. 270: 2623-2629.
- GODFRAY HCJ (1994) Parasitoids, Behavioural and Evolutionary Ecology. Princeton University Press, Princeton, New Jersey, 1994. 473 pp.

- GUTIÉRREZ-IBÁÑEZ C, VILLAGRA CA e NIEMEYER HM (2007) Pre-pupation behaviour of the aphid parasitoid *Aphidus ervi* (Haliday) and its consequences for pre-imaginal learning. *Naturwissenschaften*. 94(7): 595-600.
- HEIL M (2014) Relevance versus reproducibility—solving a common dilemma in chemical ecology. *Journal of Chemical Ecology*. 40: 315-316.
- HILKER M e MEINERS T (2010) How do plants “notice” attack by herbivorous arthropods?. *Biological Reviews – Cambridge Philosophical Society*. 85: 267-280.
- HOBALLAH MEF, TAMÒ C e TURLINGS TCJ (2002) Differential attractiveness of induced odors emitted by eight maize varieties for the parasitoid *Cotesia marginiventris*: is quality or quantity important?. *Journal of Chemical Ecology*. 28(5): 951-968.
- HUA JF, ZHANG S, CUI JJ, WANG DJ, WANG CY, LUO JY e LV LM (2012) Identification and binding characterization of three Odorant Binding Proteins and one Chemosensory Protein from *Apolygus lucorum* (Meyer-Dur). *Journal of Chemical Ecology* 38:1163-1170.
- HUH HS, PARK KH, CHOO HY e PARK CG (2006) Attraction of *Piezodorus hybneri* to the aggregation pheromone components of *Riptortus clavatus*. *Journal of Chemical Ecology*. 32(3): 681-691.
- ISIDORO N, ROMANI R e BIN F (2001) Antennal multiporous sensilla: their gustatory features for host recognition in female parasitic wasps (Insecta, Hymenoptera: Platygastroidea). *Microscopy Research and Technique*. 55: 350 – 358.
- JUSTICE RW, DIMITRATOS S, WALTER MF, WOODS DF e BLESSMANN H (2003) Sexual dimorphic expression of putative antennal carrier protein genes in the malaria vector *Anopheles gambiae*. *Insect Molecular Biology*. 12 (6): 581 – 594.
- LAUMANN RA, AQUINO MFS, MORAES MCB, PAREJA M e BORGES M (2009) Response of the egg parasitoids *Tr. basalis* and *Telenomus podisi* to compounds from defensive secretions of stink bugs. *Journal of Chemical Ecology* 35: 8-19.
- LAUMANN RA, COKL A, LOPES APS, FERREIRA JBC, MORAES MCB e BORGES M (2011) Silent singers are not safe: selective response of a parasitoid to substrate-borne vibratory signals of stink bugs. *Animal Behaviour* 82: 1175-1183.
- LEAL W (2012) Odorant reception in insects: roles of receptors, binding proteins and degrading enzymes. *Annual Review of Entomological Society* 58: 373-391.

- LEAL WS, KUWAHARA S, SHI X, HIGUCHI H, MARINO CEB, ONO M e MEINWALD J (1998) Male-released sex pheromone of the stink-bug *Piezodorus hybneri*. *Journal of Chemical Ecology*. 24(11): 1817-1829.
- LI Z, ZHANG S, LUO J, CUI J, MA Y e DONG S (2013) Two Minus-C odorant binding proteins from *Helicoverpa armigera* display higher ligand binding affinity at acidic pH than neutral pH. *Journal of Insect Physiology*. 59(3): 263-272.
- LOPES APS, DINIZ IR, MORAES MCB, BORGES M e LAUMANN RA (2012) Defesas induzidas por herbivoria e interações específicas no sistema tritrófico soja-percevejos-parasitoides de ovos. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 47(6): 875-878.
- LOVINELLA I, BOZZA F, CAPUTO B, DELLA TORRE e PELOSI P (2013) Ligand-binding study of *Anopheles gambiae* chemosensory proteins. *Chemical Senses*. 28: 409-419.
- MASNER L (1993) Superfamily Platygastroidea. In *Hymenoptera of the World: An Identification Guide to Families*. Agriculture Canada, p. 558–65, Ottawa.
- McBRIEN HL, MILLAR JG, RICE RE, McELFRESH, CULLEN E e ZALOM FG (2002) Sex attractant pheromone of the red-shouldered stink bug *Thyanta pallidovirens*: a pheromone blend with multiple redundant components. *Journal of Chemical Ecology*. 28(9).
- MEDEIROS MA, LOIÁCONO MS, BORGES M e SCHIMIDT FVG (1998) Incidência natural de parasitoides em ovos de percevejos (Hemiptera: Pentatomidae) encontrados na soja no Distrito Federal. *Notas Científicas*, Embrapa, Brazil. 33(8).
- MEDEIROS MA, SCHIMIDT FVG, LOIÁCONO MS, CARVALHO VF e BORGES M (1997) Parasitismo e predação em ovos de *Euschistus heros* (Fab.) (Heteroptera: Pentatomidae) no Distrito Federal, Brasil. *Anais da Sociedade Entomológica do Brasil* 26(2): 397-401.
- MEINERS T, WÄCKERS F e LEWIS WJ (2003) Associative learning of complex odours in parasitoid host location. *Chemical Senses*. 28: 231-236.
- MICHEREFF MFF, BORGES M, LAUMANN RA, DINIZ IR e MORAES MCB (2013) Influence of volatile compounds from herbivore-damaged soybean plants on searching behavior of the egg parasitoid *Telenomus podisi*. *Entomologia Experimentalis et Applicata*. 147: 9–17.

- MORAES MCB, BORGES M, PAREJA M, VIEIRA HG, SERENO FTP e LAUMANN R (2008b) Food and humidity affect sex pheromone ratios in the stinkbug, *Euschistus heros*. *Physiological Entomology*. 33: 43-50.
- MORAES MCB, LAUMANN RA, OLIVEIRA MWM, WOODCOCK CM, MAYON P, HOOPER A, PICKET JA, BIRKETT MA e BORGES M (2012) Sex Pheromone communication in two sympatric neotropical stink bug species *Chinavia ubica* and *Chinavia impicticornis*. *Journal of Chemical Ecology*. 38: 836-845.
- MORAES MCB, LAUMANN RA, SUJII ER, PIRES C e BORGES M (2005) Induced volatiles in soybean and pigeon pea plants artificially infested with the Neotropical brown stink bug, *Euschistus heros*, and their effect on the egg parasitoid, *Telenomus podisi*. *Entomologia Experimentalis et Applicata*. 115: 227-237.
- MORAES MCB, MAGALHÃES DM, COKL A, LAUMANN RA, SILVA JP, SILVA CCA e BORGES M (2014) Vibrational communication and mating behavior of *Dichelops melacanthus* (Hemiptera: Pentatomidae) recorded from loudspeaker membranes and plants. *Physiological Entomology*. 39: 1-11.
- MORAES MCB, PAREJA M, LAUMANN RA e BORGES M (2008a) The chemical volatiles (Semiochemicals) produced by neotropical stink bugs (Hemiptera: Pentatomidae). *Neotropical Entomology* 37(5): 489-505.
- NISHIMURA O, BRILLADA C, YAZAWA S, MAFFEI ME e ARIMURA G (2012) Transcriptome pyrosequencing of the parasitoid wasp *Cotesia vestalis*: genes involved in the antennal odorant-sensory system. *Plos One*. 7 (11).
- OTTE D (1974) Effects and functions in the evolution of signaling systems. *Annual Review of Entomology* 5:385-417
- PACHECO DJP e CORRÊA-FERREIRA BS (1998) Potencial reprodutivo e longevidade do parasitoide *Telenomus podisi* Ashmead, em ovos de diferentes espécies de percevejos. *Anais da Sociedade Entomológica do Brasil*. 27 (4): 585-591.
- PAREJA M, BORGES M, LAUMANN RA, MORAES MCB (2007) Inter- and intraspecific variation in defensive compounds produced by five Neotropical stinkbug species (Hemiptera: Pentatomidae).
- PELOSI P e MAIDA R (1995) Odorant-binding proteins in insects. *Comparative Biochemistry and Physiology*. 111B: 503-514.

- PELOSI P, CALVELLO M e BAN L (2005) Diversity of Odorant-Binding Proteins and Chemosensory proteins in insects. *Chemical senses*. 30(1): 291-292.
- PENNACCHIO F e STRAND MR (2006) Evolution of developmental strategies in parasitic Hymenoptera. *Annual Review of Entomology*. 51: 233-258.
- PETERSEN TN, BRUNAK S, HEIJNE G e NIELSEN H (2011) SignalP 4.0: discriminating signal peptides from transmembrane regions. *Nature methods*. 8: 785-786.
- PFAFFL MW, TICHOPAD A, PRGOMET C e NEUVIANS TP (2004) Determination of stable housekeeping genes, differentially regulated target genes and sample integrity: BestKeeper – Excel-based tool using pair-wise correlations. *Biotechnology Letters*. 26: 509-515.
- PICKET JA, WADHAMS LJ e WOODCOCK CM (1992) The chemical ecology of aphids. *Annual Review of Entomology* 37:67-90.
- PIKIELNY CW, HASAN G, ROUYER F e ROSBACH M (1994) Members of a family of drosophila putative Odorant-Binding proteins are expressed in different subsets of olfactory hair. *Neuron*. 12: 35-49.
- PONTON F, CHAPUIS MP, PERNICE M, SWORD GA e SIMPSON SJ (2011) Evaluation of potential reference genes for reverse transcription-qPCR studies of physiological responses in *Drosophila melanogaster*. *Journal of Insect Physiology*. 57: 840-850.
- PUENTE M, MAGORI K, KENNEDY GG e GOULD F (2008) Impact of herbivore-induced plant volatiles on parasitoid foraging success: a spatial simulation of the *Cotesia rubecula*, *Pieris rapae*, and *Brassica oleracea* system. *Journal of Chemical Ecology*. 34(7): 959-970.
- R Development Core Team (2009) R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0, URL <http://www.R-project.org>.
- RAMAKERS C, RUIJTER RM, DEPREZ RHL e MOORMAN AFM (2003) Assumption-free analysis of quantitative real-time polymerase chain reaction (PCR) data. *Neuroscience letters*. 339: 62-66.

- RUIJTER JM, RAMAKERS C, HOOGAARS WMH, KARLEN Y, BAKKER O, van den HOFF MJB e MOORMAN AFM (2009) Amplification efficiency: linking baseline and bias in the analysis of quantitative PCR data. *Nucleic Acid Research*. 37 (6): 45.
- SCHNEIDER D (1964) Insect Antennae. *Annual Review of Entomology* 9: 103-122.
- SCHULZ MH, ZERBINO DR, VINGRON M e BIRNEY E (2012) Oases: Robust de novo RNA-seq assembly across the dynamic range of expression levels. *Bioinformatics Advance Access*.
- SHEN GM, JIANG HB, WANG XN e WANG JJ (2010) Evaluation of endogenous references for gene expression profiling in different tissues of the oriental fruit fly *Bactrocera dorsalis* (Diptera: Tephritidae). *BMC Molecular Biology*. 11: 76.
- SILVA CC, MORAES MCB, LAUMANN RA e BORGES M (2006) Sensory response of the egg parasitoid *Telenomus podisi* to stimuli from the bug *Euschistus heros*. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*. 41(7): 1093-1098.
- STEIDLE J.L.M. e VAN LOON J.J.A. (2002) Chemoecology of parasitoid and predator oviposition behaviour. Em: *Chemoecology of insect eggs and egg deposition*. Blackwell Publishing, Berlin, Alemanha. pp. 291- 317.
- STEINBRECHT RA (1996) Are Odorant-binding Proteins Involved in Odorant Discrimination?. *Oxford University Press*. 21(6): 719-727.
- SUJII ER, COSTA MLM, PIRES CSS, COLAZZA S e BORGES M (2002) Inter and intra-guild interactions in egg parasitoid species of the soybean stink bug complex. *Pesquisa Agropecuaria de Brasília* 37(11): 1541-1549.
- SZNAJDER B, SABELIS MW e EGAS M (2010) Response of predatory mites to a herbivore-induced plant volatile: genetic variation for context-dependent behaviour. *Journal of Chemical Ecology*. 36: 680-688.
- TAMURA K, PETERSON D, PETERSON N, STECHER G, NEI M e KUMAR S (2006) MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Research resource*. 28(10): 2731-2739.
- TEGONI M, CAMPANACCI V e CABBILLAU C (2004) Structural aspects of sexual attraction and chemical communication in insects. *Biochemical Sciences*. 29(5): 257-264.

- TILDEN PE e BEDARD WD (1988) Effect of verbenone on response of *Dendroctonus brevicomis* to exo-brevicommin, frontalin, and myrcene. *Journal of Chemical Ecology*. 14(1): 113-122.
- TOGNON R, SANT'ANA J e JAHNKE SM (2013) Aprendizagem e memória de *Telenomus podisi* (Hymenoptera, Platygasteridae). *Série Zoológica*. 103(3): 266-271.
- TOMONORI A e MISHIRO K (2004) Development of *Allotropa citri* Muesebeck (Hymenoptera: Platygasteridae) and *Anagyrus subalbipes* Ishii (Hymenoptera: Encyrtidae) on *Pseudococcus cryptus* Hempel (Homoptera: Pseudococcidae). *Applied Entomology and Zoology*. 39 (3): 505–510.
- TURLINGS TCJ, WÄCKERS FL, VET LEM, LEWIS WJ e TUMLINSON JH (1993) Learning of host-finding cues by hymenopterous parasitoids. *Insect learning: Ecology and Evolutionary perspectives*. 1st ed. Chapman e Hall. p. 51-78.
- van NOUHUYS S e KAARTINEN R (2008) A parasitoid wasp uses landmarks while monitoring potential resources. *Proceedings of the Royal Society*. 275: 377-385.
- VET LEM e GROENEWOLD AW (1990) Semiochemical and learning in parasitoids. *Journal of Chemical Ecology*. 16(11): 51-78.
- VET LEM, LEWIS WJ, PAPA J DR e van LENTEREN JC (1990) A variable-response model for parasitoid foraging behavior. *Journal of Insect Behavior*. Vol. 3, No. 4.
- VET LEM, WÄCKERS FL e DICKE M (1991) How to hunt for hiding hosts: The reliability-detectability problem in foraging parasitoids. *Netherlands Journal of Zoology*. 41 (2-3): 202-213.
- VIEIRA FG, FIRET S, HE X, ROZAS J, FIELD LM e ZHOU JJ (2012) Unique features of Odorant-Binding Proteins of the parasitoid wasp *Nasonia vitripennis* revealed by genome annotation and comparative analyses. *PLoS ONE*. 7(8).
- VINSON SB (1998) The general host selection behaviour of parasitoid Hymenoptera and a comparison of initial strategies utilized by larviphagous and oophagous species. *Biol. ConTr*. 11:79-96.
- VOGT RG, RYBCZYNSKI R e LERNER MR (1991) Molecular cloning and sequencing of general Odorant-Binding Proteins GOBP1 and GOBP2 from the tobacco hawk moth *Manduca sexta*: Comparisons with other insects OBPs and their signal peptides. *The journal of neuroscience*. 11(10).

- WASHCKE N, MEINERS T e ROSTÁS M (2013) Foraging strategies of parasitoids in complex chemical environments. Em: *Chemical Ecology of Insect Parasitoids*, 1ª Edição. pp 37-63.
- WEISSBECKER B, van LOON JJA, POSTHUMUS MA, BOUWMEESTER HJ e DICKE M (2000) Identification of volatile potato sesquiterpenoids and their olfactory detection by the two-spotted stinkbug *Perillus bioculatus*. *Journal of Chemical Ecology*. 26(6).
- WHEELER DL, BARRET T, BENSON DA, BRYANT SH, CANESE K, CHETVERNIN V, CHURCH DM, DICUCCIO M, EDGAR R, FEDERHEN S, GEER LY, KAPUSTIN Y, KHOVAYKO O, LANDSMAN D, LIPMAN DJ, MADDEN TL, MAGLOTT DR, OSTELL J, MILLER V, PRUITT KD, SCHULER GD, SEQUEIRA E, SHERRY ST, SIROTKIN K, SOUVOROV A, STARCHENKO G, TATUSOV RL, TATUSOVA TA, WAGNER L e YASCHENKO E. (2006) Database resources of the National Center for Biotechnology Information. *Nucleic Acids Research*. Vol. 35.
- WITZGALL P, STELINSKI L, GUT L e THOMSON D (2008) Codling moth management and chemical ecology. *Annual Review of Entomology* 53: 503-522.
- XU PX, ZWIEBEL LJ e SMITH DP (2003) Identification of a distinct family of genes encoding atypical odorant-binding proteins in the malaria vector mosquito, *Anopheles gambiae*. *Insect Molecular Biology*. 12(6): 549 – 560.
- YIN WY, IOVINELLA I, MARANGONI R, CATTONARO F, FLAMINI G, SAGONA S, ZHANG L, PELOSI P e FELICOLI A (2013) Odorant-binding proteins and olfactory coding in the solitary bee *Osmia cornuta*. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 70: 3029-3039.
- ZHANG A, BORGES M, ALDRICH J e CAMP M (2003) Stimulatory male volatiles for the neotropical brown stinkbug, *Euschistus heros* (F.)(Heteroptera: Pentatomidae). *Neotropical Entomology*. 32(4): 713-717.
- ZHOU J, HUNG W, ZHANG G, PICKETT JA e FIELD LM (2003) “Plus-C” odorant-binding protein genes in two *Drosophila* species and the malaria mosquito *Anopheles gambiae*. *Gene*. 327: 117-129.
- ZHOU JJ, VIEIRA FG, HE XL, SMADJA C, LIU R, ROZAS J, and FIELD LM (2010) Genome annotation and comparative analyses of the odorant-binding proteins and

chemosensory proteins in the pea aphid *Acyrtosiphon pisum*. *Insect Molecular Biology*. 19: 113-122.

ROCHA L, MOREIRA GRP e REDAELLI LR (2007) Morphology and distribution of antennal sensilla of *Gryon gallardoi* (Brèthes) (Hymenoptera: Scelionidae) females. *Neotropical Entomology*. 36(5): 721-728.

ANEXO I

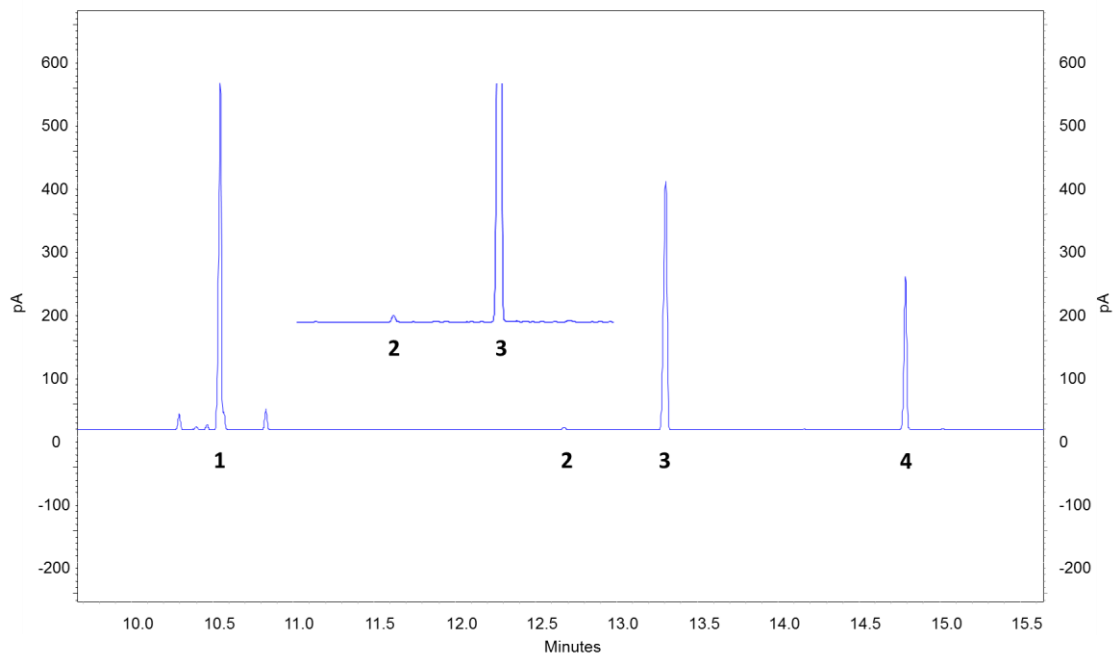


Figura 3.1 – Cromatograma (GC-FID) representando a mistura feromonal completa de *E. heros* (Eher1). 1 - (2E,4Z)-decadienoato de metila (53%), 2 - 2,6,10- trimetil dodecanoato de metila (3%), 3 - 2,6,10- trimetil tridecanoato de metila (44%) e 4 – Padrão Interno (PI) para quantificação Hexadecanolideo.

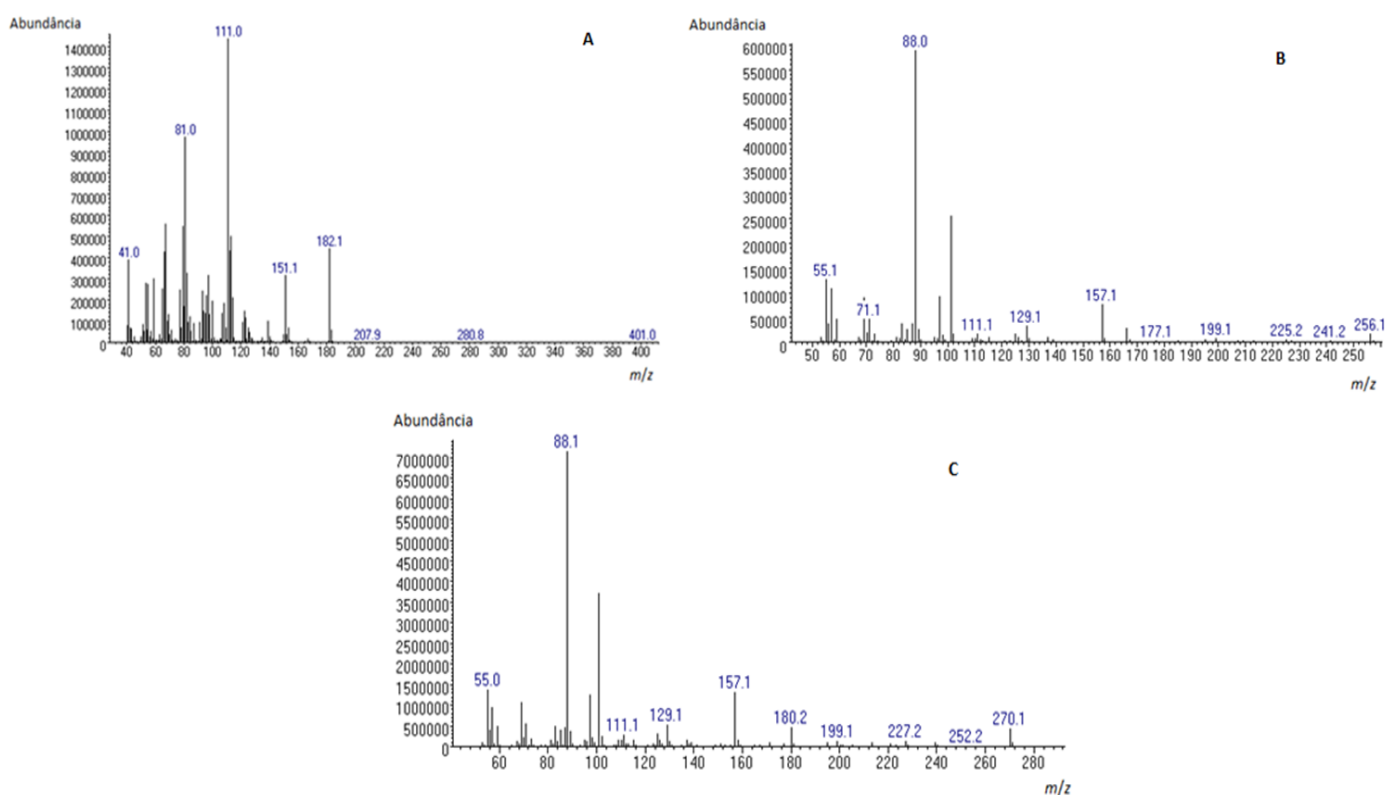


Figura 3.2 – Espectro de massas dos compostos sintéticos utilizados na mistura feromonal de *E. heros*. **A** - (2E,4Z)-decadienoato de metila (53%) (Índice de Kovàts: 1399), **B** - 2,6,10- trimetil dodecanoato de metila (3%) (Índice de Kovàts: 1660), **C** - 2,6,10- trimetil tridecanoato de metila (44%) (Índice de Kovàts: 1745).

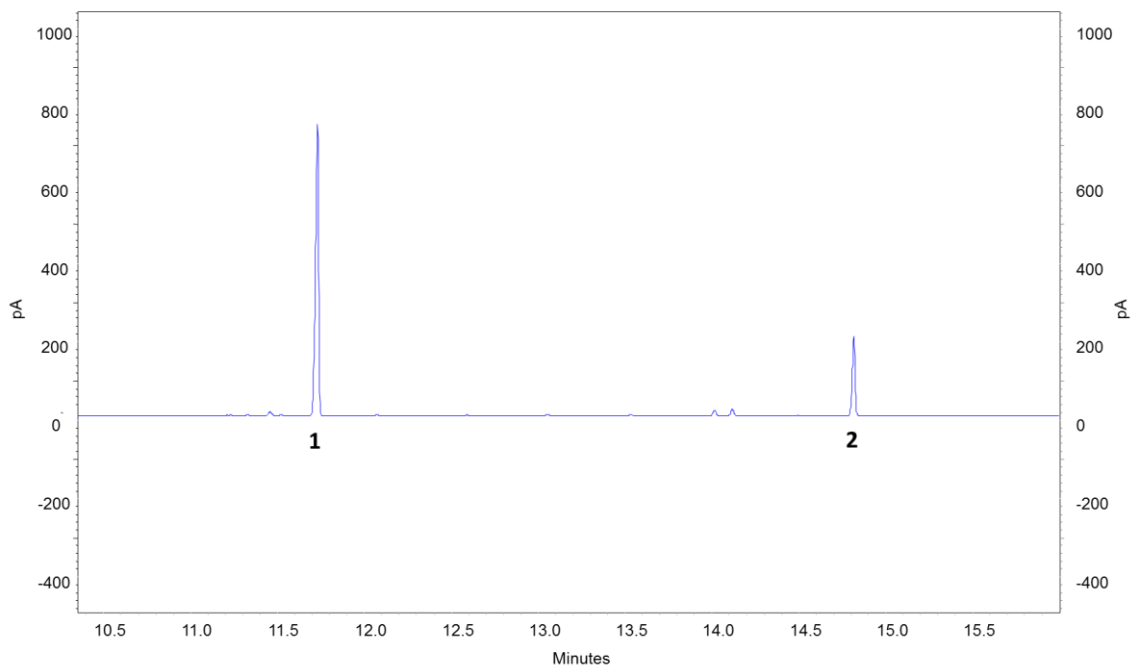


Figura 3.3 – Cromatograma representando a solução Pgui. 1 - 7R-(+)- β -sesquifelandreno e 2 – Padrão Interno (PI) para quantificação Hexadecanolídeo.

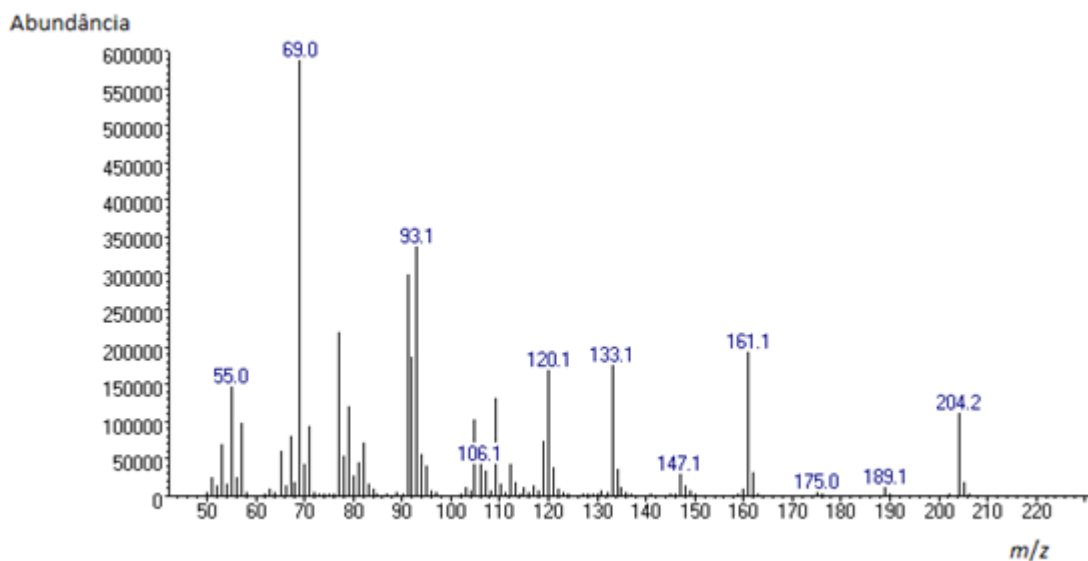


Figura 3.4 – Espetro de massas do feromônio sintético de *P. guildinii* 7R-(+)- β -sesquifelandreno (Índice de Kovàts: 1537).

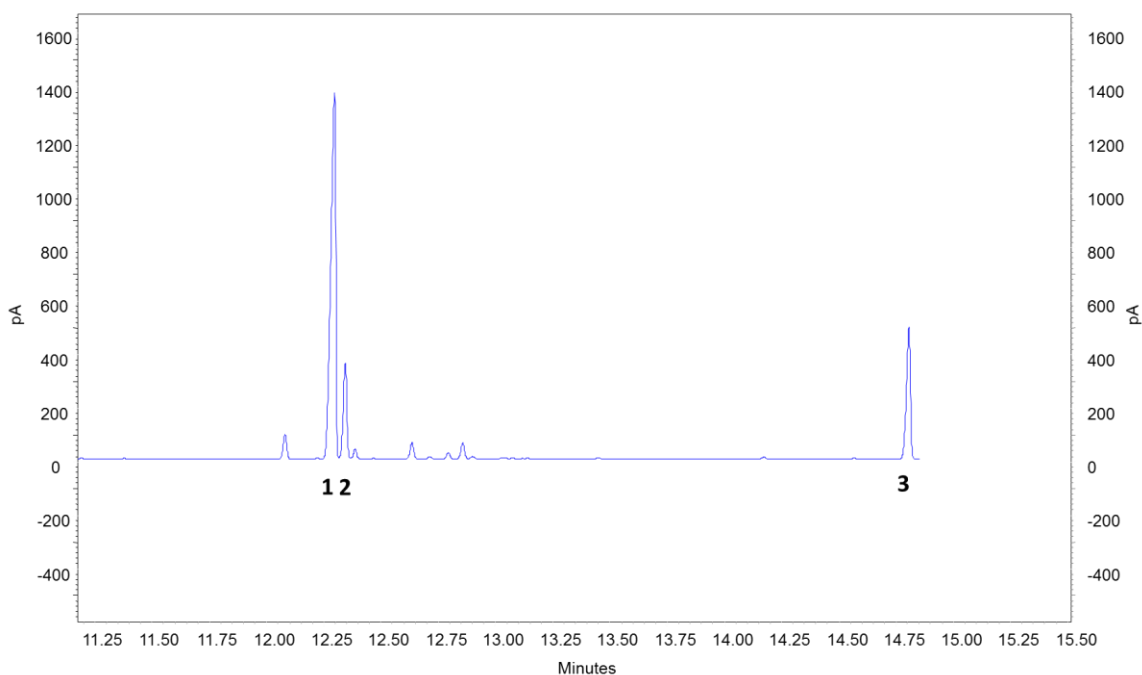


Figura 3.5 – Cromatograma (GC-FID) representando a solução Nvir. **1** – trans (Z) – epoxibisaboleno, **2** – cis (Z) – epoxibisaboleno e **3** - Padrão Interno (PI) para quantificação Hexadecanolídeo.

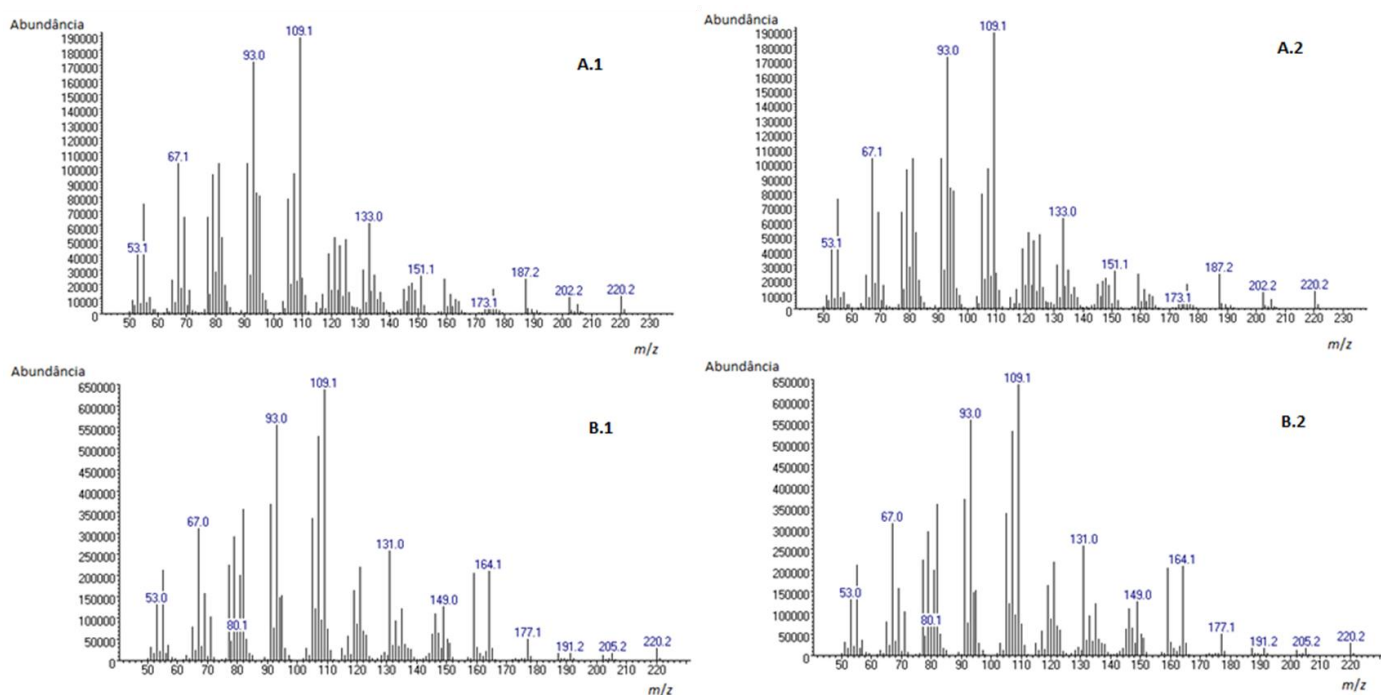


Figura 3.6 – Espectro de massas dos compostos feromônais de *N. viridula* obtidos por aeração de machos (A.1 e B.1) comparados com espectro de massas dos compostos sintéticos (A.2 e B.2) – **A** trans (Z) – epoxibisaboleno (Índice de Kovàts: 1607) e **B** cis (Z) – epoxibisaboleno (Índice de Kovàts: 1617).

ANEXO II

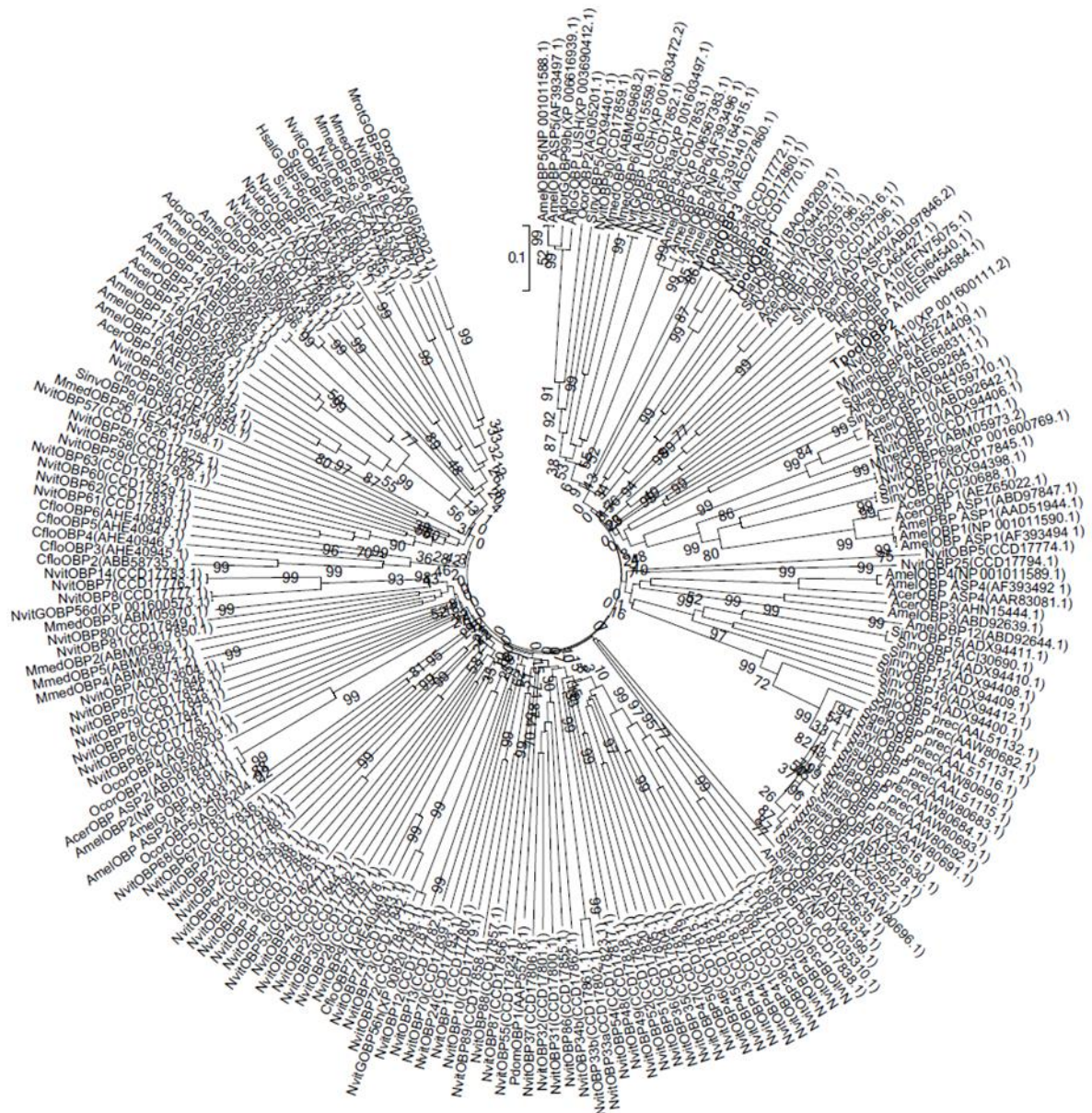


Figura 3.7 - Árvore total das relações filogenéticas entre as potenciais OBPs de *T. podisi* e de outras 217 OBPs de himenópteros. A árvore foi construída utilizando o método de neighbor-joining (MEGA 6.06). Os números de acesso do GenBank estão incluídos entre parentêses logo após o nome das OBPs.