



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
**DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS**

**Análisis metatranscriptómico de *Drosophila melanogaster* durante su interacción con *Spiroplasma* y avispas parasitoides**

**TESIS**

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
DOCTOR EN CIENCIAS

**PRESENTA:**

**VICTOR MANUEL HIGAREDA ALVEAR**

**DIRECTOR DE TESIS**

**DRA. ESPERANZA MARTÍNEZ ROMERO**  
CENTRO DE CIENCIAS GENÓMICAS, UNAM

**COMITÉ TUTOR**

**DR. DIEGO CORTEZ QUESADA**  
CENTRO DE CIENCIAS GENÓMICAS, UNAM

**DR. LUIS EDUARDO SERVÍN GARCIDUEÑAS**  
ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS SUPERIORES,  
ENES, UNAM

Cuernavaca, Morelos , Junio, 2021



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

# Índice

## RESUMEN

## ABSTRACT

<b>1.0 INTRODUCCIÓN</b> .....	1
1.1 Simbiosis.....	1
1.2 Simbiosis en insectos .....	2
1.3 Clasificación de las bacterias simbiotes de insectos .....	2
1.4 <i>Spiroplasma</i> simbiote de plantas y animales.....	4
<i>Spiroplasma</i> simbiote de <i>Drosophila</i> spp .....	5
<b>2.0 ANTECEDENTES</b> .....	6
2.1 Protección de <i>Spiroplasma</i> contra el ataque de nematodos.....	6
2.2 Protección de <i>Spiroplasma poulsonii</i> contra el ataque de avispas parasitoides .....	6
2.3 Posibles mecanismos de protección de <i>S. poulsonii</i> .....	8
2.4 Producción de toxinas por <i>S. poulsonii</i> . .....	9
2.5 Respuesta inmune de <i>D. melanogaster</i> en contra de avispas parasitoides	10
2.6 Estrategias de las avispas parasitoides .....	12
<b>3.0 HIPÓTESIS</b> .....	13
<b>3.1 OBJETIVO GENERAL</b> .....	13
<b>3.1 OBJETIVO PARTICULAR</b> .....	13
<b>4.0 METODOLOGÍA</b> .....	14
4.1 Insectos y bacterias .....	13
4.2 Generación de tratamientos .....	13
4.3 Colecta de muestras y extracción de ARN .....	15
4.4 Análisis bioinformático .....	16
4.5 Expresión diferencial.....	16
4.6 Expresión de genes RIP en el transcriptoma.....	17
4.7 Depuración de secuencias ribosomales de avispas .....	17
4.8 RT-qPCR de genes RIP .....	18
4.9 Representación gráfica y disponibilidad de datos.....	20

<b>5.0 RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b> .....	21
5.1 Estadísticas de secuenciación .....	21
5.2 Análisis exploratorio de agrupación de tratamientos.....	21
<b>Sección 1:</b> Expresión diferencial de <i>D. melanogaster</i> en presencia de avispas parasitoides .....	26
Parasitismo por <i>L. heterotoma</i> .....	26
Parasitismo por <i>Ganaspis sp.</i> .....	30
<b>Sección 2:</b> Expresión diferencial de <i>D. melanogaster</i> en presencia de <i>S. poulsonii</i> y avispas parasitoides .....	33
Interacción <i>S. poulsonii</i> - <i>L. heterotoma</i> .....	33
Interacción <i>S. poulsonii</i> - <i>Ganaspis sp.</i> .....	42
<b>Sección 3:</b> Expresión de <i>S. poulsonii</i> durante el parasitismo .....	45
Efectos de RIP en secuencias ribosomales de avispas.....	49
<b>6.0 CONCLUSIÓN</b> .....	51
<b>7.0 PERSPECTIVAS</b> .....	52
<b>8.0 MATERIAL SUPLEMENTARIO</b> .....	53
<b>9.0 REFERENCIAS</b> .....	58
<b>10.0 ANEXOS</b> .....	65

## Anexo 1

**Higareda-Alvear VM**, Mateos M, Cortez D, Tamborindeguy C, Martinez-Romero E. 2021. Differential gene expression in a tripartite interaction: *Drosophila*, *Spiroplasma* and parasitic wasps. PeerJ 9:1–30. DOI: 10.7717/peerj.11020.

## Índice de figuras

<b>Figura 1.</b> Actividad de las proteínas inactivadoras de ribosomas (RIP).....	10
<b>Figura 2.</b> Respuesta inmune satisfactoria de <i>D. melanogaster</i> al parasitismo por la avispa <i>L. boulandi</i> .....	11
<b>Figura 3.</b> Tratamientos generados y flujo de trabajo para el análisis de expresión diferencial.....	21
<b>Figura 4.</b> Número de secuencias correspondientes a <i>D. melanogaster</i> a las 24 (T1) o 72 horas (T2) post parasitismo.....	22
<b>Figura 5.</b> Número de secuencias del metatranscriptoma correspondientes a <i>Spiroplasma poulsonii</i> (sMel-Uganda). ....	23
<b>Figura 6.</b> Gráfica multidimensional de la expresión de <i>D. melanogaster</i> a las 24 y 72h post-parasitismo. ....	25
<b>Figura 7.</b> Respuesta transcripcional de <i>D. melanogaster</i> al parasitismo .....	26
<b>Figura 8.</b> Genes de <i>D. melanogaster</i> diferencialmente expresados durante parasitismo por <i>L. heterotoma</i> . ....	28
<b>Figura 9.</b> Genes expresados diferencialmente por el parasitismo de <i>Ganaspis sp</i> .....	30
<b>Figura 10.</b> Log2FC de los genes inducidos por el parasitismo de <i>Ganaspis sp</i> ....	31
<b>Figura 11.</b> Expresión diferencial de <i>D. melanogaster</i> en presencia de <i>S. poulsonii</i> y <i>L. heterotoma</i> a las 24h. ....	33
<b>Figura 12.</b> Expresión de los 19 genes presentes en la intersección. ....	34
<b>Figura 13.</b> Expresión diferencial de <i>D. melanogaster</i> en presencia de <i>S. poulsonii</i> y <i>L. heterotoma</i> a las 72 h. ....	35
<b>Figura 14</b> Genes únicos y compartidos durante la interacción <i>Drosophila-S. poulsonii-L. heterotoma</i> a las 72h post parasitismo.....	36
<b>Figura 15.</b> Análisis de los genes diferenciales durante la interacción <i>Spiroplasma-L. heterotoma</i> a las 72 post parasitismo.....	39
<b>Figura 16.</b> Análisis de los genes diferenciales durante la interacción <i>Spiroplasma-L. heterotoma</i> a las 72h post parasitismo.....	40
<b>Figura 17.</b> Diagramas de Venn de los genes expresados diferencialmente durante el parasitismo por <i>Ganaspis sp.</i> a las 24 y 72 horas post parasitismo .....	42
<b>Figura 18.</b> Patrones de expresión de genes sub expresados únicos a la interacción <i>S. poulsonii-Ganaspis sp.</i> ....	43
<b>Figura19</b> Análisis de los genes diferenciales durante la interacción <i>S. poulsonii-Ganaspis sp</i> a las 72h post parasitismo. ....	44
<b>Figura 20.</b> Valores de expresión de los genes más expresados de <i>S. poulsonii</i> a las 72h post parasitismo.....	46
<b>Figura 21.</b> Valores de expresión del transcriptoma para los cinco genes codificantes para toxinas RIP en <i>S. poulsonii</i> .....	47
<b>Figura 22.</b> Valores de expresión de los cinco genes codificantes para toxinas RIP presentes en <i>S. poulsonii</i> (sMel Uganda y Brasil), a las 24 y 72 horas post parasitismo.....	48
<b>Figura 23.</b> Depurinación en secuencias del 28S ribosomal de avispas.....	49

## Índice de tablas

<b>Tabla 1.</b> Porcentajes de moscas sobrevivientes al ataque de avispas parasitoides, en presencia de <i>S. poulsonii</i> (S+) o ausencia de <i>S. poulsonii</i> (S-). Resultados obtenidos de diferentes publicaciones. ....	7
<b>Tabla 2.</b> Secuencias y eficiencia de los oligonucleótidos utilizados para amplificar los 5 genes RIP más el gen control <i>rpoB</i> . ....	19
<b>Tabla S1.</b> Estadísticas de la secuenciación para todos los tratamientos y replicas .....	55
<b>Tabla S2.</b> Valores de depurinación en secuencias del 28S ARNr de las avispas <i>L. heterotoma</i> y <i>Ganaspis sp</i> .....	56
<b>Tabla S3</b> Valores de depurinación en el 28S ARNr de <i>Drosophila melanogaster</i> ..	57

# ABREVIATURAS

Ácido Desoxirribonucleico	ADN
Ácido Desoxirribonucleico complementario	cADN
Ácido Ribonucleico	ARN
Ácido Ribonucleico Ribosomal	ARNr
Megabases	Mb
Pares de bases	pB
Proteína Inactivadora de Ribosomas	RIP
Umbral de ciclo, del inglés, Cycle threshold	CT

El presente trabajo de investigación se realizó en el Laboratorio de Ecología Genómica del Centro de Ciencias Genómicas de la UNAM.

Victor Manuel Higareda Alvear recibió una beca para estudios de doctorado otorgada por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), con número de becario 512028488. Realizó una estancia de investigación en la Universidad de Texas A&M, con apoyos del Programa de Apoyo a los Estudios del Posgrado UNAM (PAEP) y una Beca de Movilidad 2018 para estancia en el extranjero otorgada por el CONACyT. También recibió financiamiento por parte de PAEP-UNAM para asistir a congresos nacionales e internacionales donde se presentaron los avances de este trabajo.

El Jurado de este trabajo estuvo conformado por los doctores: Esperanza Martínez Romero (CCG-UNAM), María Alejandra Bravo de la Parra (IBT-UNAM), Dra. Eria Alaide Rebollar Caudillo (CCG-IBT), Dra. Luisa Isaura Falcón Álvarez (Instituto de ecología-UNAM) y Dr. Lorenzo Patrick Segovia (IBT-UNAM).



# AGRADECIMIENTOS

A mis padres, Francisco, Elena y a mi hermana America por su continuo apoyo durante todos estos años.

A la Dra. Esperanza Martínez Romero, con quien llegué hacer mi tesis de maestría y doctorado. Agradezco a la Dra. por nunca limitarnos en el desarrollo de nuestros proyectos y por su apoyo.

A la Dra. Mariana Mateos, por compartir su experiencia y enseñarme a ser más organizado al desarrollar experimentos. Por siempre estar disponible para discutir sobre el proyecto, pese a la distancia.

A Monica Rosenblueth por sus consejos académicos y no académicos, por su confianza y amistad.

A todos mis profesores por compartir su conocimiento, y a los miembros de mi comité tutorial. Luis Servin y Diego Cortez

A mis amigos de laboratorio, Violeta, Arturo, Tonalli, Rafa, Pilar, Diana, Lorena, Leslie, Julio, Susy y Pepe. Agradezco haber coincidido en tiempo y espacio con ustedes ya que favorecieron un ambiente de trabajo agradable.

A los miembros del jurado de por sus observaciones y hacer esta tesis más entendible.

**¡Vivimos en un planeta simbiótico!**

Lynn Margulis

# RESUMEN

En simbiosis con la mosca de la fruta *Drosophila melanogaster* se encuentra *Spiroplasma poulsonii*. Esta bacteria se transmite de manera vertical de la madre a los hijos. *S. poulsonii* confiere protección a su hospedero en contra del parasitismo de algunas especies de avispas parasitoides como son *Leptopilina heterotoma* y *L. boulardi*, pero no contra otras como son *Ganaspis* sp. Las primeras se denominan susceptibles y las segundas resistentes. El efecto negativo de *S. poulsonii* en las avispas susceptibles se ve reflejado en una mayor supervivencia de las moscas.

Tres hipótesis no excluyentes se han propuesto para explicar la protección de *S. poulsonii* en contra de las avispas parasitoides: 1. Activación del sistema inmune de *D. melanogaster* durante la interacción *S. poulsonii* -avispa 2. Producción de toxinas por *S. poulsonii* que afecten al parasitoide y 3. Competencia de nutrientes/recursos entre simbiote y avispa.

En esta investigación, se identificaron genes de *D. melanogaster* expresados diferencialmente como respuesta al parasitismo por las avispas *L. heterotoma* y *Ganaspis* sp., en presencia y ausencia de *S. poulsonii*. En ausencia de *S. poulsonii*, se detectó evidencia de activación del sistema inmune durante el parasitismo de *Ganaspis* sp. pero no por *L. heterotoma* cuyo parasitismo indujo una sub expresión de genes relacionados con desarrollo de gónadas.

Durante la interacción tripartita, *S. poulsonii* -*D. melanogaster*-*L. heterotoma*, se detectaron 21 genes sobre-expresados y 11 sub-expresados. Con excepción del gen codificante para atacina, ningún otro estuvo relacionados con funciones del sistema inmune. La presencia de *S. poulsonii* durante el parasitismo por *L. heterotoma* parece restaurar los valores expresión de algunos de los genes a niveles parecidos a los observados en tratamientos libres de *S. poulsonii* y avispa. Algunos de estos genes se expresan durante la transición de larva a pupa, lo que sugiere una posible influencia de *S. poulsonii* en los tiempos de desarrollo de las larvas parasitadas por la avispa *L. heterotoma*

Adicionalmente, mediante qPCR se evaluó la expresión de los cinco genes inactivadores de ribosomas (RIP), codificados en el genoma de *S. poulsonii*. Estos cinco genes se expresaron de manera constitutiva e independiente al parasitismo. Uno de estos genes (RIP2) fue el más expresado. Esto se observó en las dos cepas de *S. poulsonii* evaluadas. Adicionalmente se detectó daño ribosomal característico de las toxinas RIP únicamente en secuencias ribosomales de la avispa susceptible *L. heterotoma* no así en la resistente *Ganaspis* sp. Estos resultados sugieren que en la interacción *S. poulsonii*-*D. melanogaster*-*L. heterotoma*, el simbiote más que *D. melanogaster* pudiera ser el que más contribuye en la protección contra avispas parasitoides. Estos resultados descartan la hipótesis de activación del sistema inmune de *D. melanogaster* por *S. poulsonii*, al menos a nivel de transcripción de ARN.

# ABSTRACT

In symbiosis with the fruit fly *D. melanogaster* we found *Spiroplasma poulsonii*. This bacterium is transmitted vertically from the mother to the offspring. *S. poulsonii* confers protection to the host against parasitism of some species of parasitic wasps such as *Leptopilina heterotoma* and *L. boulardi*, but not against others as *Ganaspis* sp. The former are considered as susceptible and the latter resistant. The negative effect of *S. poulsonii* in the susceptible wasps is reflected in a larger fly survival.

Three non-exclusive hypotheses have been proposed to explain *S. poulsonii* protection against parasitic wasps. 1. Activation of *D. melanogaster* immune system during *Spiroplasma*-wasp interaction. 2. Production of toxins by *S. poulsonii* with harmful effects to the wasps. 3. Competition of nutrients/resources among symbiont and wasp.

In this research, we identified differentially expressed genes of *D. melanogaster* during wasp parasitism by *Leptopilina heterotoma* or *Ganaspis* sp., in the absence or presence of *S. poulsonii*. In the absence of *S. poulsonii*, immune activation of *D. melanogaster* was detected by *Ganaspis* sp., but not by *L. heterotoma*, in turn this wasp induced down-regulation of genes involved with male gonad development.

During the tripartite interaction *S. poulsonii*-*D. melanogaster*-*L. heterotoma* 21 genes were up-regulated and 11 down regulates. With the exception of attacin encoding gene, no other was involved with immune related functions. The presence of *S. poulsonii* during *L. heterotoma* parasitism seems to restore gene expression levels to those observed in *Spiroplasma* free and non-parasitized treatments. Some of these genes are known to be expressed during the larva-to pupa transition, which is suggestive of an influence of *S. poulsonii* on the development time of *L. heterotoma*-parasitized flies.

Additionally, through qPCR the expression level of the five *S. poulsonii* encoded Ribosomal inactivating protein (RIP) genes was evaluated. The five RIP genes were constitutively expressed, independently of wasp parasitism. One of these genes (RIP2) was the highest expressed. This was observed in the two evaluated sub strains of *S. poulsonii*. In addition, damage characteristic of RIP activity was detected exclusively in ribosomal sequences of the *S. poulsonii* susceptible wasp *L. heterotoma* but none in the *S. poulsonii*-resistant wasp *Ganaspis* sp. These results suggest that in the *S. poulsonii*-*D. melanogaster*-*L. heterotoma* interaction, the symbiont could have a higher contribution than the host in the protection against parasitic wasps. Our results discard the hypothesis of immune activation of *D. melanogaster* by *S. poulsonii* at least at a transcriptional level.

# 1.0 INTRODUCCIÓN

## 1.1 Simbiosis

El estudio de los microorganismos nos lleva al siglo XVII, cuando Anton Van Leeuwenhoek hizo las primeras observaciones bajo el microscopio óptico. Posteriormente, los descubrimientos de Pasteur y Koch en los años 1800's llevaron a la asociación de los microorganismos con algunas enfermedades (Opal, 2010). Actualmente se considera a los microorganismos no solo como posibles patógenos, sino también como piezas fundamentales y complemento de los seres vivos, esto se debe a los diferentes efectos benéficos que pueden tener algunos microorganismos en sus hospederos. A estas interacciones que se dan entre organismos de diferentes especies, como la que ocurre entre especies de bacterias y especies de eucariontes se le denomina simbiosis.

El término simbiosis surge entre 1877-1878 como una necesidad para explicar los recientes descubrimientos sobre la naturaleza de los líquenes. En esa época se determinó que los líquenes eran el resultado de la asociación de un hongo con un alga. El botánico Albert Frank propuso en 1877 el término "Symbiotismus", para referirse a la asociación entre organismos de diferentes especies, esto sin importar el rol ecológico de estos organismos. Un año más tarde, el botánico, Anton De Bary introdujo en una conferencia el término "Symbiosis", que es el empleado actualmente para denotar la interacción entre organismos de diferentes especies. El término simbiosis no debe confundirse con mutualismo, que es un tipo de simbiosis en el que ambos participantes reciben un beneficio (Sapp, 1994; Oulhen et al., 2016).

La relevancia ecológica de las interacciones simbióticas está plasmada en el evento que dio origen a la célula eucarionte, se estima que esto ocurrió hace dos mil millones de años, cuando una bacteria de vida libre relacionada con las actuales alfa-proteobacterias y una arquea se fusionaron. Esto dio origen a un nuevo tipo celular que posteriormente se diversificó y dio lugar a las formas de vida eucariontes tanto las existentes que conocemos como algunas extintas (López-García and Moreira, 2015).

## 1.2 Simbiosis en insectos

Los insectos representan el grupo más diverso de todos los animales, su origen se calcula alrededor de ~479 millones de años y se estima que colonizaron la tierra al mismo tiempo que las plantas (Misof et al., 2014). A partir de entonces, los insectos se han diversificado y especializado en el uso de diferentes recursos nutricionales, entre ellos, sangre, madera, floema, polen y néctar entre otros. En simbiosis con los insectos se han identificado diferentes bacterias, siendo la asociación entre la bacteria *Sulcia muelleri* y el grupo de insectos Auchenorrhynca (cigarras e insectos espina) una de las más antiguas, que se estima se originó hace ~260 millones de años (Moran et al., 2005).

Aunque algunas bacterias simbiotas de insectos son patógenas para sus hospederos (Glare et al., 2017) otras tienen efectos benéficos muy relevantes, entre los que destacan síntesis de vitaminas (Snyder and Rio, 2015) y aminoácidos (Sasaki and Ishikawa, 1995), protección contra patógenos y parásitos (Gerardo and Parker, 2014) y degradación de xenobióticos (Kikuchi et al., 2012). Adicionalmente, también confieren tolerancia a diferentes tipos de estrés abióticos como son temperatura o desecación (Lemoine et al., 2020). Las bacterias simbiotas de insectos también influyen en el desarrollo del sistema inmune (Weiss et al., 2011) y el reproductivo de sus hospederos (Werren et al., 2008) y aunque poco estudiado y aún controversial, es el papel de estas bacterias en algunos aspectos conductuales de los insectos (Hosokawa and Fukatsu, 2020).

## 1.3 Clasificación de las bacterias simbiotas de insectos

De acuerdo al grado de dependencia bacteria-insecto, los simbiotas se clasifican en obligados y facultativos. Los primeros generalmente habitan dentro de un órgano especializado del insecto denominado bacterioma y se caracterizan por tener genomas pequeños, de hasta 112 Kb (Bennett and Moran, 2013). Esta reducción genómica ha hecho difícil el cultivo de estos simbiotas en comparación con bacterias de vida libre. La eliminación de los simbiotas obligados (también

llamados primarios), mediante algún tratamiento, generalmente antibióticos afecta negativamente el desarrollo del hospedero y puede causar su muerte.

Un ejemplo de simbiote obligado es *Buchnera aphidicola* (~618 pb), que se encuentra en el bacterioma de diferentes especies de áfidos. *B. aphidicola* fue la primera bacteria obligada no cultivable (hasta ahora), en ser secuenciada en el año 2000 (Shigenobu et al., 2000). Esta bacteria les proporciona a los áfidos aminoácidos esenciales que ellos no pueden sintetizar ni adquirir a través de su alimentación, la cual se basa en el floema de plantas, ya que el floema carece de estos nutrientes (Shigenobu et al., 2000).

La segunda categoría agrupa a los simbioses facultativos (también llamados secundarios), estas bacterias son dispensables para la supervivencia de su hospedero. Sin embargo, su presencia les confiere nuevas habilidades. Estas bacterias colonizan diferentes órganos del insecto como lo son; intestino, hemolinfa, órganos reproductivos y cuerpo graso, aunque también se pueden encontrar de forma intracelular, como en el caso de *Wolbachia*, una bacteria que se estima pudiera estar presente en ~20-60% de las especies de insectos (Hilgenboecker et al., 2008; Medina et al., 2019). Un ejemplo de simbiote facultativo/secundario es *Hamiltonella defensa*, también presente en áfidos. En el genoma de *H. defensa* se encuentran secuencias de fagos codificantes para toxinas que le confieren resistencia al áfido en contra del ataque de avispas parasitoides (Oliver et al., 2003; Brandt et al., 2017).

.

#### 1.4 *Spiroplasma* simbiote de plantas y animales

*Spiroplasma*, del griego “speira” que significa espiral y “plasma” que se refiere a dar forma, es un género de bacterias perteneciente a la clase Mollicutes. Los integrantes de este género se caracterizan por su morfología helicoidal y por su ausencia de pared celular. Miden entre 100-200 nm de diámetro y 3-5  $\mu\text{m}$  de longitud. A nivel genómico, el género *Spiroplasma* se caracteriza por tener genomas pequeños entre 424 Kb-2.2 Mb con porcentajes bajos de GC (23-30%) (Bolaños et al., 2015; He et al., 2018). Metabólicamente, los *Spiroplasmas* pueden usar la glucosa como fuente de energía, ya que tienen la vía completa de glucólisis, pero carecen de ciclo de Krebs. Algunos *Spiroplasmas* pueden utilizar otros carbohidratos (fructosa, celobiosa, trehalosa y glicerol) ya que cuentan con estos transportadores (Bolaños et al., 2015).

Los integrantes del género *Spiroplasma* se han descrito en asociación con plantas, entre ellos destaca *S. citri* y *S. kunkelii*, ambos patógenos de cítricos y maíz respectivamente. *S. citri* fue el primero del género en ser descrito y cultivado en 1973 (Saglio et al., 1973). *S. citri* y *S. kunkelii*, habitan en el floema de la planta, pero necesitan de un insecto vector, generalmente un saltamontes para lograr su transmisión a un nuevo hospedero (Cisak et al., 2015). La mayor diversidad de especies de *Spiroplasma* se ha descrito en asociación con insectos, entre ellos, los saltamontes, áfidos (Fukatsu et al., 2001), hormigas (Ballinger et al., 2018), moscas (Haselkorn et al., 2009), escarabajos (Clark et al., 1982) y mariposas (Jiggins et al., 2000). Fuera de la clase Insecta, se ha identificado *Spiroplasma* en arañas (Zhang et al., 2018), garrapatas (Binetruy et al., 2019), pepino de mar (He et al., 2018) y cangrejos (Wang et al., 2011).

En insectos, algunos miembros del género *Spiroplasma* son patógenos, por ejemplo, *S. apis* que infecta abejas (Mouches et al., 1984). En crustáceos, *S. eriocheiris* que afecta a cangrejos (Wang et al., 2011). Otros fenotipos inducidos por *Spiroplasma* son la muerte de los machos (del inglés, male-killing), esto ocurre durante etapas tempranas del desarrollo embrionario en *D. melanogaster* (Cheng et al., 2016; Harumoto et al., 2016).



Otro efecto que se ha reportado de *Spiroplasma* es la protección que confiere contra algunos parásitos como el nematodo (*Howardula aoronymphium*) y algunas especies de avispas parasitoides (Xie et al., 2010, 2014).

### **1.5 *Spiroplasma* simbiote de *Drosophila* spp.**

Se han descrito diferentes infecciones de *Spiroplasma* en moscas del género *Drosophila*. Con base en filogenias del gen 16S rRNA se pueden distinguir 4 clados de *Spiroplasma*, denominados poulsonii, citri, ixodetes y tenebrosa. (Haselkorn et al., 2009). El *Spiroplasma* asociado con *D. melanogaster* se denomina *Spiroplasma poulsonii* (sMel) y se encuentra principalmente de forma extra-celular en la hemolinfa, sin embargo, durante su transmisión de la madre a los hijos coloniza el ovocito, en esa etapa es intracelular (Herren et al., 2013). *S. poulsonii* (sMel), induce el fenotipo de “male-killing”. Recientemente se determinó que la muerte de los machos es consecuencia de una desregulación en la expresión génica acompañado de apoptosis (Cheng et al., 2016; Harumoto et al., 2016). Adicionalmente se descubrió que una proteína de *S. poulsonii* denominada Spaid, y que está codificada en un plásmido contribuye en el fenotipo de male-killing (Harumoto and Lemaitre).

El origen de *S. poulsonii* proviene de moscas colectadas en Uganda, África (Pool et al., 2006) y de moscas colectadas en Brasil (Montenegro et al., 2005). Estas variantes se denominan sMel-UG (Uganda) y sMel-BR (Brasil). Durante varios años, *S. poulsonii* fue una bacteria que no se lograba cultivar en el laboratorio, pero en el 2018, se desarrolló un medio de cultivo líquido efectivo para *S. poulsonii* (sMelUG). Este medio tiene como base el medio Barbour-Stoenner-Kelly H (BSK-H), que se utiliza para crecer *Borrelia burgdorferi*, más una mezcla de lípidos entre ellos colesterol, ácido palmítico y esfingomielina, adicionalmente contiene extracto de moscas (Adultos de *D. melanogaster*) y se requiere de bajas concentraciones de oxígeno. Hasta la fecha no hay reporte de un cultivo en medio sólido (Masson et al., 2018).

## 2.0 Antecedentes

### 2.1 Protección de *Spiroplasma* contra el ataque de nematodos

*Drosophila neotestacea* es una especie de mosca que se desarrolla en el cuerpo fructífero de algunas especies de hongos y mantiene una asociación con una cepa de *S. poulsonii* denominada sNeo. En su ambiente, las larvas de *D. neotestacea* se enfrentan al parasitismo por el nematodo *Howardula aoronymphium*, este parásito reduce la fertilidad de las hembras y eventualmente es la causa de su muerte. En el 2010 se descubrió que la presencia de sNeo afecta de forma negativa el desarrollo del nematodo y restaura la fertilidad de las hembras (Jaenike et al., 2010).

### 2.2 Protección de *Spiroplasma* contra el ataque de avispas parasitoides

Durante su ciclo de vida *D. melanogaster* se enfrenta al ataque de avispas parasitoides, estas avispas depositan uno o más huevos dentro de las larvas de la mosca, de este huevo emerge una larva de avispa que se alimenta de los tejidos del huésped hasta completar su desarrollo (Schlenke et al., 2007). La relevancia ecológica de *S. poulsonii* en *D. melanogaster*, radica en que su presencia reduce el éxito de supervivencia de algunas especies de avispas parasitoides (**Tabla 1**). Esto se traduce como una menor o nula supervivencia de avispas y una mayor supervivencia de moscas (Xie et al., 2011; Herren et al., 2014; Mateos et al., 2016; Jones and Hurst, 2020). Las primeras observaciones de este fenotipo revelaron que la presencia de *S. poulsonii* afecta negativamente el crecimiento de algunas especies de avispas (Xie et al., 2014). Entre las especies de avispas susceptibles a *S. poulsonii* destacan (por ser las más estudiadas), *Leptopilina heterotoma* y *L. boulardi*.

El parasitismo por estas avispas hacia larvas de *D. melanogaster* infectadas con *S. poulsonii*, se refleja en una menor supervivencia las avispas y en una mayor supervivencia de la mosca (Xie et al., 2014; Mateos et al., 2016; Paredes et al., 2016). Para la avispa *L. heterotoma*, este efecto de protección conferido por *S. poulsonii*, medido en porcentaje de moscas sobrevivientes varía entre cepas de avispas (Jones and Hurst, 2020), sin embargo, siempre se refleja en la muerte de *L. heterotoma*. (**Tabla 1**).

En el caso de la avispa *Ganaspis* sp., la presencia de *S. poulsonii* no afecta la supervivencia del parasitoide, ya que las avispas emergen en el ~100% de las moscas parasitadas, estén o no infectadas con *S. poulsonii* (Mateos et al., 2016).

<i>Drosophila</i> sp.	<i>Spiroplasma</i>	% de supervivencia de moscas (S <sup>-</sup> )	% de supervivencia de moscas (S <sup>+</sup> )	Avispa	Referencia
<i>D. hydei</i>	S-Hyd	7.17	47.3	<i>L. heterotoma</i> (Lh14)	Xie et al 2010
<i>D. melanogaster</i>	sMel-BR	< 1	3.28	<i>L. heterotoma</i> (Lh14)	Xie et al 2014
<i>D. melanogaster</i>	sMel-UG	<1	5.1	<i>L. heterotoma</i> (Lh14)	Hust and Jones 2020
<i>D. melanogaster</i>	sMel-UG	<1	42.4	<i>L. heterotoma</i> (LhFr)	Hust and Jones 2020
<i>D. melanogaster</i>	sMel-UG	<1	39.7	<i>L. heterotoma</i> (Lh-Mad)	Hust and Jones 2020
<i>D. melanogaster</i>	sMel-BR	< 1	2.15	<i>L. boulandi</i> (Lb17)	Xie et al 2014
<i>D. melanogaster</i>	sMel-UG	15	60	<i>L. boulandi</i> (Lb17)	Paredes et al 2016
<i>D. melanogaster</i>	sMel-BR	< 1	34	<i>L. victoriae</i> (Haw)	Mateos et al 2016
<i>D. melanogaster</i>	sMel-BR	0	0	<i>Ganaspis</i> sp. G1F1	Mateos et al 2016
<i>D. melanogaster</i>	sMel-BR	0	8	<i>G. xantopoda</i> (Haw)	Mateos et al 2016

**Tabla 1.** Porcentajes de moscas sobrevivientes al ataque de avispas parasitoides, en presencia de *S. poulsonii* (S<sup>+</sup>) o ausencia de *S. poulsonii* (S<sup>-</sup>). Resultados obtenidos de diferentes publicaciones.

## **2.3 Posibles mecanismos de protección de *Spiroplasma***

Tres diferentes mecanismos no excluyentes, provenientes de observaciones realizadas en ecología de poblaciones de animales, pueden explicar el efecto protector de un simbiote en contra de un parásito (Gerardo and Parker, 2014).

### **1) Efecto del simbiote en el sistema inmune del hospedero.**

La presencia de una bacteria simbiote puede inducir una respuesta inmune en el hospedero, esta activación de la respuesta inmune, “prepararía” al hospedero para enfrentar una nueva infección. En mosquitos (*Aedes aegypti*), la presencia de *Wolbachia* (Wmel-Pop), disminuye la infección por virus dengue, así como el desarrollo del parásito *Plasmodium gallinaceum*, causante de la malaria de aves. Este fenotipo está ligado a la sobre expresión de algunos genes involucrados en la respuesta inmune del mosquito (Eleftherianos et al., 2013).

### **2) Competencia de nutrientes entre el simbiote y el parásito.**

Al compartir un nicho similar, el parásito y el simbiote pueden explotar un mismo recurso (nutriente), si el recurso es limitado esto puede afectar de forma negativa el crecimiento del parásito y del simbiote. En *D. melanogaster*, la resistencia a la infección por el Virus C conferida por *Wolbachia* está relacionada por una competencia por la obtención de colesterol entre la bacteria y el virus (Caragata et al., 2013).

### **3) Producción de toxinas por el simbiote.**

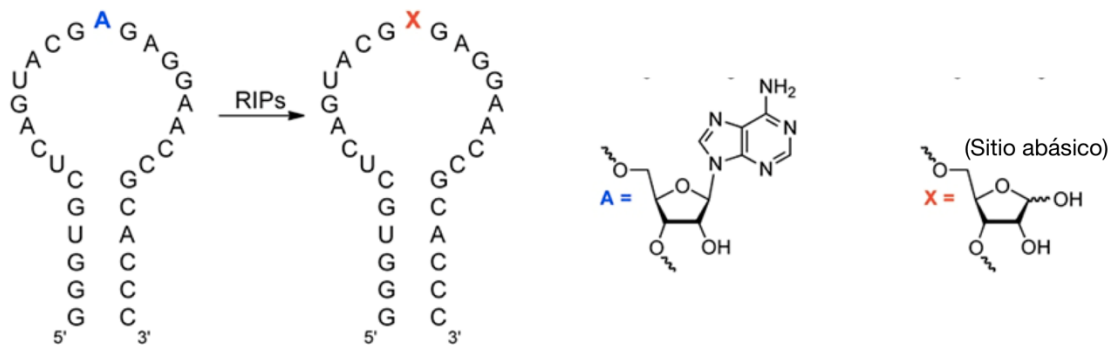
Las bacterias simbiotes de insectos pueden producir toxinas, antibióticos, anti fúngicos u otros compuestos que afectan de forma negativa a un patógeno/parásito. Un ejemplo son las avispas solitarias (Hymenoptera:Crabronidae), que han mantenido una relación de más de 70 millones de años con bacterias del género *Streptomyces*. Estas bacterias sintetizan antibióticos y antifúngicos que protegen a las avispas contra infecciones por microorganismos patógenos. Otro ejemplo es la bacteria *Hamilltonella defensa*, simbiote de áfidos. En el genoma de *H. defensa* están presentes secuencias de fagos que codifican para toxinas que afectan el desarrollo de avispas parasitoides (Oliver and Perlman, 2020).

## 2.4 Producción de toxinas por *Spiroplasma poulsonii* (sMel)

El primer genoma secuenciado de *S. poulsonii* en *D. melanogaster* reveló la presencia de cinco genes codificantes para toxinas (Hamilton et al., 2015; Paredes et al., 2015). Estos genes codifican para proteínas inactivadoras de ribosomas y se encuentran en ambas cepas de *S. poulsonii* (Uganda y Brasil). Las proteínas RIP remueven una adenina específica (depurinación), presente en un bucle de la subunidad menor de ribosoma (28S rARN). Esta depurinación afecta la posterior unión de factores de traducción al ribosoma, lo que inhibe la síntesis de proteínas y ocasiona la muerte de la célula (**Figura 1**). (Stirpe, 2004; Narayanan et al., 2005).

De acuerdo con su estructura, las toxinas RIP se clasifican en dos clases. La clase 1 agrupa a proteínas de ~30 kDa con un solo dominio catalítico y la clase 2, adicional a su grupo catalítico tienen una o varias cadenas B de ~35 kDa. La subunidad B tiene dominios de lectina, lo que favorece su unión a receptores presentes en la superficie celular. Esto se refleja en una mayor toxicidad de las RIP de clase 2 en comparación con las de clase 1. (Stirpe, 2004). Una de las RIP de clase 2 más conocida es el ricino, presente en las semillas de la planta *Ricinus communis* y muy conocida por sus efectos mortales (Stirpe, 2004).

Las proteínas RIP producidas por *S. poulsonii* pertenecen a la clase 1 (Hamilton et al., 2015; Ballinger et al., 2019). En el contexto de la protección por *S. poulsonii*, se han detectado daños ribosomales característicos de la actividad de RIP en secuencias de algunas especies de avispas parasitoides (Ballinger and Perlman, 2017), así como en nematodos (Hamilton et al., 2015).

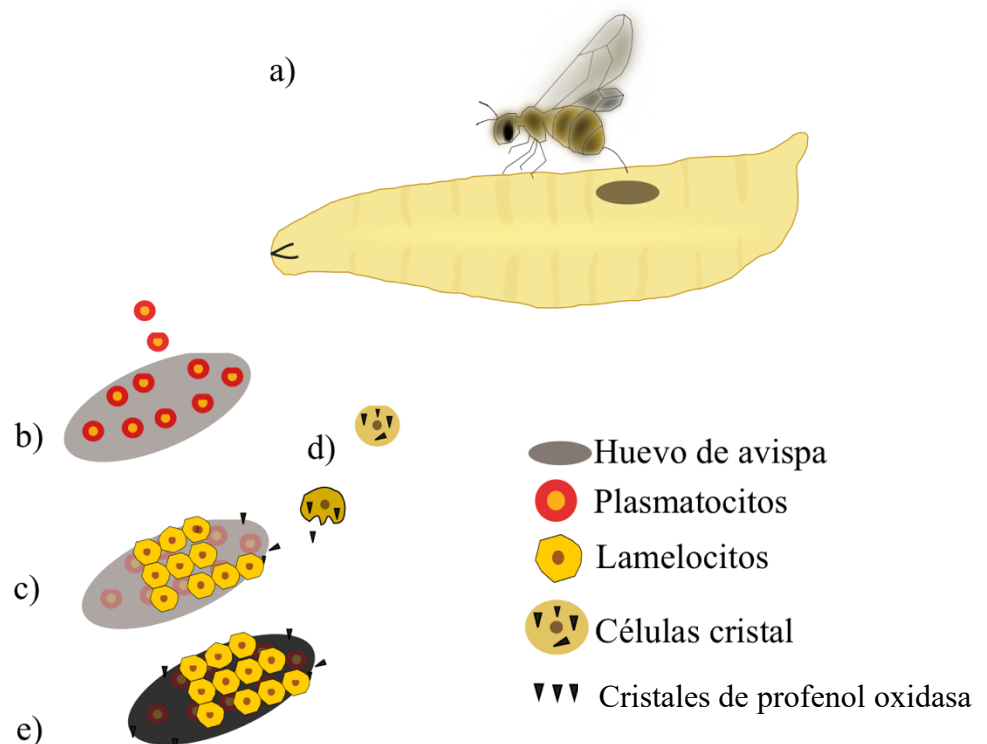


**Figura 1. Actividad de las proteínas inactivadoras de ribosomas (RIP).** Las proteínas RIP, son N-glicosidasas, remueven la adenina 4324 presente en el bucle del 28S ARNr, dejando un sitio abásico.

## 2.5 Respuesta inmune de *D. melanogaster* en contra de avispas parasitoides

Durante su ciclo de vida, *D. melanogaster* al igual que otros insectos o vertebrados se enfrenta al ataque de diferentes patógenos (bacterias, hongos, avispas y nematodos). En defensa contra estas infecciones, *D. melanogaster* inicia una respuesta inmune que se puede clasificar en humoral y celular. La respuesta humoral se caracteriza por la síntesis de péptidos antimicrobianos (AMPs). Estos péptidos son producidos en respuesta a la infección por bacterias y hongos. Los AMPs son sintetizados por un órgano denominado cuerpo graso y son secretados hacia la hemolinfa (Govind, 2008). En *D. melanogaster*, la respuesta celular se caracteriza por la participación de tres diferentes tipos celulares (hemocitos), todos ellos presentes en la hemolinfa. Los plasmaticos son los hemocitos más abundantes, representan el ~95% de las células circulantes en la hemolinfa y se encargan de fagocitar bacterias. El ~5% restante lo componen las células cristal. El tercer tipo celular son los lamelocitos, ellos están ausentes en larvas no parasitadas. Su presencia se da como respuesta al parasitismo por algunas especies de avispas por ejemplo, *L. boulardii*, (Williams, 2007), en donde se han detectado a partir de las 20h posterior al parasitismo. (Anderl, Vesala & Ihalainen, 2016).

Las avispas parasitoides mediante su afilado ovopositor penetran la cutícula de las larvas de *Drosophila* y depositan uno o más huevos. Dependiendo de la especie de avispa, estos huevos son reconocidos por los plasmátocitos, ellos se adhieren y forman una capa alrededor del huevo (Russo, 1996). Posteriormente ocurre una diferenciación de lamelocitos, estos se adhieren sobre los plasmátocitos formando capas. Los lamelocitos, en conjunto con las células cristal expresan enzimas conocidas como fenol oxidasas (Dudzic et al., 2015). Estas enzimas participan en la cascada de la melanización cuyo objetivo es la formación una cápsula de melanina alrededor del huevo del parasitoide. Un fenómeno conocido como encapsulación (Carton et al., 2008). La melanización junto con la producción de especies reactivas de oxígeno ocasiona la muerte del parasitoide (**Figura 2**) (Russo, 1996; Carton et al., 2008).



**Figura 2. Respuesta inmune satisfactoria de *D. melanogaster* al parasitismo por la avispa *L. boulardi*.** a) Una avispa hembra, introduce su aparato ovopositor atravesando la cutícula de la larva y deposita uno o mas huevos. b) Los plasmátocitos son las primeras células en reconocer y adherirse al huevo, formando una capa c) Ocurre una diferenciación de lamelocitos, ellos aparecen alrededor de las 24h posteriores al parasitismo, se adhieren sobre la capa inicial de plasmátocitos. c) Las células cristal sufren una lisis y liberan los cristales de la proteína pro-fenol oxidasa, que participa en la cascada de melanización cuya molécula final, la melanina se deposita sobre el huevo de la avispa contribuyendo con su muerte.

## 2.6 Estrategias de las avispas parasitoides para evadir la respuesta inmune del hospedero

En la interacción *D. melanogaster*-parasitoide, las avispas han desarrollado estrategias de defensa que les permiten interferir con la respuesta inmune del hospedero. Las hembras de la avispa *L. heterotoma* por ejemplo, junto con la inoculación del huevo, transfieren proteínas que destruyen a los lamelocitos (Schlenke et al., 2007). El veneno de la avispa *Ganaspis sp*, que también es inoculado durante la ovoposición contiene una ATPasa que interfiere con la homeostasis de calcio, esto previene la activación de los plasmátocitos (Mortimer et al., 2013). En la interacción *S. poulsonii*- *Drosophila*, el efecto protector del simbionte podría representar una estrategia del hospedero para contrarrestar el parasitismo. En otras palabras, *S. poulsonii* estaría incrementando las capacidades defensivas de su hospedero.

En este trabajo, mediante un enfoque meta-transcriptómico se evaluó la respuesta de *D. melanogaster* en presencia y ausencia de *S. poulsonii* al parasitismo por la avispa *L. heterotoma* y *Ganaspis sp.*, una resistente y la otra susceptible a *S. poulsonii*. Adicionalmente se evaluó la expresión de los genes RIP durante el parasitismo y su actividad en los ribosomas de las avispas mediante un acercamiento *in silico*



## 3.0 Objetivo General

Evaluar la respuesta transcripcional de *D. melanogaster* durante su interacción con *S. poulsonii* y dos especies de avispas parasitoides

### 3.1 Objetivos Particulares

Evaluar la respuesta transcripcional de *D. melanogaster* durante el parasitismo por *L. heterotoma* y *Ganaspis sp.*

Evaluar la respuesta transcripcional de *D. melanogaster* durante el parasitismo por *L. heterotoma* y *Ganaspis sp* en presencia de *S. poulsonii*

Evaluar la expresión de los cinco genes RIP de *S. poulsonii* durante el parasitismo por *L. heterotoma* y *Ganaspis sp.*

### 3.2 Hipótesis

La presencia de *S. poulsonii* durante el parasitismo por *L. heterotoma* induce un incremento en la respuesta inmune de *D. melanogaster* que contribuye con el mecanismo de protección contra esta avispa. Adicionalmente el parasitismo por *L. heterotoma* induce una sobre expresión de los genes RIP de *S. poulsonii*, lo que no ocurre en presencia de la avispa resistente *Ganaspis sp.*

## 4.0 Metodología

### 4.1 Insectos y bacterias

Dos diferentes líneas de *D. melanogaster* (Canton S y Oregon R) se utilizaron en el presente trabajo, ambas se mantuvieron a 25°C bajo un ciclo de luz y oscuridad de 12 h. La línea Canton S se mantuvo bajo una dieta compuesta de 10 g de agarosa, 85g de azúcar, 60g de extracto de maíz y 40g de extracto de levadura por litro de agua. La línea Oregon R se mantuvo en una dieta denominada “opuntia banana” compuesta de plátano, extracto de levadura y nopal (**Material S1**). En ambas dietas se adicionó metil p-hidroxibenzoato y ácido propiónico como conservadores. Las líneas Oregon R y Canton S no están infectadas naturalmente con *S. poulsonii*. Para tener moscas Canton S y Oregon R infectadas con *S. poulsonii*, se hizo una transferencia de hemolinfa con la ayuda de un tubo capilar, de moscas infectadas a moscas no infectadas. Las moscas Canton S se infectaron con una cepa de *S. poulsonii* proveniente de moscas colectadas en Brasil (sMel-BR) (Montenegro et al., 2005), estas moscas se utilizaron para la generación de los tratamientos para el metatranscriptoma (ver sección 4.2). Las moscas de la cepa Oregon R se infectaron con hemolinfa proveniente de moscas colectadas en Uganda, sMel-UG o Brasil sMel-BR (Pool et al., 2006). Los controles negativos corresponden a moscas Canton S o Oregon R no infectadas con *S. poulsonii*. La reproducción de las avispas parasitoides, *L. heterotoma* (Lh14) y *Ganaspis* sp. (G1FL), se realizó en moscas Canton S libres de *Spiroplasma*, para ello, se adicionaron avispas (macho y hembra) a viales con larvas (Canton S) de segundo estadio. Al emerger las avispas, se alimentaron con una mezcla de 50% miel comercial y 50% agua.

### 4.2 Generación de tratamientos

Aproximadamente 30 larvas (Canton S) de segundo estadio infectadas con *S. poulsonii* (S<sup>+</sup>) o no infectadas (S<sup>-</sup>), se colocaron por separado dentro de cajas Petri de 60 mm de diámetro. A estas cajas se les adicionó previamente dieta de mosca. Los tratamientos destinados a ser parasitados por avispas se generaron agregando un grupo de 6 avispas hembras y 5 machos de la especie *L. heterotoma* o únicamente 5 hembras de la especie *Ganaspis* sp., Las avispas estuvieron dentro de las cajas por 5 horas y previamente habían parasitado a otro grupo de larvas. Este “entrenamiento”

ha mostrado incrementar la frecuencia del parasitismo. Los números de avispas utilizadas provienen de la metodología utilizada en grupo de trabajo, con estos números se han observado frecuencias altas de parasitismo.

Las frecuencias de parasitismo se evaluaron colectando 5 larvas al azar para hacer una disección en busca de larva o huevo de avispa. Para los tratamientos destinados al meta-transcriptoma únicamente se colectaron larvas provenientes de cajas Petri cuya frecuencia de parasitismo fue de entre 90-100%. Adicionalmente se generaron tratamientos control sin avispas y sin *S. poulsonii* ( $S^-W^-$ ), así como tratamientos únicamente con *S. poulsonii* ( $S^+W^-$ ), tratamientos infectados con *S. poulsonii* y parasitadas por la avispa *L. heterotoma* ( $S^+Lh$ ) o *Ganaspis* sp ( $S^+Gh$ ). También se generaron tratamientos libres de *S. poulsonii*, pero parasitados (independientemente), con las avispas *L. heterotoma* ( $S^-Lh$ ) y *Ganaspis* sp ( $S^-Gh$ ).

Para cada tratamiento se establecieron dos tiempos, el primer tiempo (T1), se estableció a las 24 horas posteriores a la remoción de las avispas, mientras que el tiempo 2 (T2) corresponde a las 72 horas posteriores a la remoción de avispas. Representando 24 y 72h post parasitismo.

#### **4.3 Colecta de muestra y extracción de ARN**

Las larvas correspondientes a cada tiempo y tratamiento se colectaron dentro de un tubo Eppendorf. Para el T1 cada muestra consistió en 20-30 larvas, mientras que para T2 entre 10-20. Únicamente para un tratamiento del T2 se colectaron 3 larvas. En total se colectaron 4 réplicas por tratamiento.

A cada tubo Eppendorf (conteniendo las larvas) se le agregó 500  $\mu$ l de Trizol y con ayuda de un pistilo estéril se hizo una maceración mecánica. La extracción de RNA con Trizol se detuvo en el paso de lavado con etanol al 70%. Estos tubos fueron enviados a la unidad de bioinformática de la universidad de Texas A&M (Texas AgriLife Genomics and Bioinformatics Services facility), en donde se continuó con la purificación del RNA. En la unidad se verificó la calidad del ARN mediante un Bioanalyzer. Para muestras de insectos, el valor de integridad de ARN (RIN) reportado con el Bioanalyzer no es un valor confiable, ya que el 28S rRNA de insectos se fragmenta en dos partes, que migran semejantes al 18S rRNA (Deleo et al., 2018), algo que no contempla el programa del Bioanalyzer. Por lo que no se tomó en cuenta

el valor de RINI. En cambio, el resultado del bioanalyzer sirvió como referencia para determinar la eficacia en la remoción de secuencias ribosomales.

Para la generación de bibliotecas se utilizó el kit TruSeq stranded de Illumina. La remoción de secuencias ribosomales se realizó con el kit RiboZero Epidemiology gold, que incluye sondas para bacterias y eucariontes. La secuenciación fue de 125pb de un solo extremo (single-end), utilizando un equipo de Illumina Hiseq 2500.

#### **4.4 Análisis bioinformático**

Se evaluó la calidad de las secuencias obtenidas, así como la presencia de adaptadores con el programa FastQC (Andrews, S. 2010). Las secuencias de baja calidad (valor de phred < 15), así como adaptadores fueron removidos con Trimmomatic v.0.36 (Bolger et al., 2014), bajo los siguientes parámetros: ILLUMINACLIP:/adapters.fasta:2:30:10 LEADING:3 TRAILING:3 SLIDINGWINDOW:4:15 MINLEN:36. Las secuencias que pasaron el control de calidad fueron mapeadas con Hisat2 v.2.0.2-beta (Kim et al., 2015), utilizando el genoma de referencia de *D. melanogaster* (ensembl versión BDGP6). En caso de los tratamientos parasitados por *L. heterotoma*, el mapeo fue hacia un índice compuesto por el genoma de *D. melanogaster* más el de *L. heterotoma* (VOOK00000000). Al ser éste un mapeo competitivo aumenta la especificidad en la selección de secuencias del hospedero. Los tratamientos parasitados por *Ganaspis sp.*, fueron mapeados únicamente al genoma de *D. melanogaster*, ya que no hay genoma reportado para esta avispa. El archivo de salida de Hisat2 (archivo Sam), se utilizó como entrada para el programa featureCounts (Liao et al., 2014). FeatureCounts cuantifica el número de lecturas que mapearon con el genoma. Los parámetros usados fueron -s 2, -t exon, -g gene\_id. La salida de FeatureCounts es una tabla de conteos que corresponden al número de secuencias que alinearon para cada uno de los genes en los diferentes tratamientos.

#### **4.5 Expresión diferencial de *D. melanogaster***

La detección de genes expresados diferencialmente se realizó con la paquetería de edgeR (Robinson et al., 2009), mediante comparaciones pareadas y utilizando un parámetro robusto (robust=TRUE), para reducir la probabilidad de falsos positivos.

Los identificadores de los genes expresados diferencialmente se analizaron en la plataforma web flymine, que adicionalmente al nombre del gen, reporta enriquecimientos de GO, vías metabólicas, tejido entre otros, y está disponible en: <https://www.flymine.org/flymine/begin.do> (Lyne et al., 2007). Adicionalmente se utilizó flybase (Thurmond et al., 2019), <https://flybase.org/> al analizar genes individuales. El script utilizado para la obtención de genes diferenciales se reporta en la sección de Anexos.

#### **4.6 Expresión de genes RIP en el metatranscriptoma**

Dado que tenemos un metatranscriptoma, es posible detectar la expresión de genes de *S. poulsonii*, para ello las secuencias provenientes de los tratamientos infectados con *S. poulsonii* o *S. poulsonii*-avispa, se analizaron con kallisto v.0.43.1 (Bray et al., 2016), tomando como referencia el genoma de *S. poulsonii* MRSO-Uganda (GCF\_000820525.2). Kallisto mapea y cuantifica las secuencias de los tratamientos correspondientes a de *Spiroplasma* hacia la referencia. El resultado es una tabla que contiene el número de secuencias correspondientes a cada gen de *S. poulsonii*. La tabla de cuentas generada por kallisto, se analizó con edgeR, esto permitió obtener valores de cuentas normalizadas (TMM) para cada gen. Posteriormente se seleccionaron los cinco genes codificantes para proteínas RIP para evaluar su expresión con base en los números de cuentas normalizados.

#### **4.7 Depuración de secuencias ribosomales de avispas**

En publicaciones previas, utilizando secuencias de RNA-Seq se mostró que es posible detectar señales de depuración (remoción de adenina), en secuencias ribosomales (Hamilton et al., 2015). Esta estrategia radica en que la enzima transcriptasa reversa, encargada de convertir RNA en cDNA, al encontrar un sitio abásico (sin ninguna base), adiciona preferentemente una timina. Un sitio abásico es el resultado de la actividad de RIP.

La presencia de timina en lugar de adenina en el sitio exacto de la acción de la proteína RIP (bucle del 28S ribosomal), representa una señal de depuración (Hamilton et al., 2015). Para detectar señales de depuración en las secuencias ribosomales, las secuencias provenientes de tratamientos parasitados por *L. heterotoma* o *Ganaspis sp.*, en presencia o ausencia de *S. poulsonii* se mapearon con bowtie2 (Langmead and Salzberg, 2012) hacia un índice compuesto de secuencia parcial del 28S rRNA de *D. melanogaster* más secuencia parcial del 28S rRNA de avispa. A partir del archivo sam producido por bowtie2 se extrajeron las secuencias mapeadas al ribosomal de avispa. Las secuencias recuperadas se mapearon nuevamente (al ribosomal de avispa), pero ahora utilizando el programa gráfico Geneious v.11.1.2 (Biomatters Inc). Se permitió un 2% de mismatches, un tamaño de gap=3. y se iteró 25 veces. Posteriormente se contaron las secuencias que cubrieron la totalidad de la región TACG**A**GAGGAACC. Esta secuencia representa una región parcial del bucle del 28S rRNA en el que tiene acción RIP. La adenina en “negritas” representa el sitio exacto de depuración. Para estimar la frecuencia de depuración, se contó el número de adeninas presentes en esa posición. En ausencia de depuración se espera un 100% de adeninas en esa posición, en cambio la presencia de una timina u otra base en esa posición es una señal de actividad de RIP. Los resultados se analizaron estadísticamente en R, usando la función glmbayes contenida en el paquete “arm”. Siguiendo la misma metodología se analizó la depuración en las secuencias correspondientes al ribosomal de *D. melanogaster*. Dado el gran número de secuencias que mapearon al ribosomal de la mosca, solo un millón de secuencias por tratamiento fueron analizadas.

#### **4.8 RT-qPCR de genes RIP**

Para evaluar la expresión de los genes RIP de *S. poulsonii*, se generaron tratamientos parasitados o no por las avispas *L. heterotoma* o *Ganaspis sp.*, siguiendo la metodología descrita en sección 3.2 pero con moscas *D. melanogaster* de la línea Oregón R. Estas moscas estaban infectadas con *S. poulsonii* cepa Brasil o Uganda. Se colectaron 5 larvas por tratamiento, esto a las 24h (T1) y 72h (T2) horas post parasitismo. Estas larvas se lavaron con agua estéril, se secaron sobre una servilleta de papel y se colocaron dentro de tubos Eppendorf. Estos tubos se sumergieron en

nitrógeno líquido y se almacenaron a -70°C hasta su uso posterior. Al completar la colecta de todos los tratamientos se procedió con la extracción de ARN. Los tubos Eppendorf se extrajeron del ultracongelador y se introdujeron nuevamente en nitrógeno líquido. Las larvas de cada tubo fueron maceradas con ayuda de un pistilo estéril hasta pulverizarlas. La extracción de ARN se realizó con el kit All prep DNA/RNA mini kit (Qiagen, Germantown, MD), que permite extraer ADN y ARN de la misma muestra. 1ug de ARN total se utilizó como templado para sintetizar cADN, usando la enzima superscript II transcriptasa reversa (Invitrogen) y hexámeros aleatorios, siguiendo las instrucciones del fabricante.

Los RT-qPCR se realizaron utilizando el programa de 40 ciclos (30 seg a 95 °C; 1 min a 55 °C; 30 seg a 72 °C y 10 seg a 95 °C). La secuencia y eficiencia de cada primer se muestra en la Tabla 2. Los valores de Ct obtenidos, se corrigieron utilizando la eficiencia de los primers con la siguiente fórmula ( $Ct * (\text{Log}(\text{eficiencia}) / \text{Log}(2))$ ). La expresión relativa al gen *rpoB* de *S. poulsonii*, se obtuvo sustrayendo el valor corregido de *rpoB* ( $Ct_{rpoB}$ ) menos el valor corregido para cada gen RIP ( $Ct_{RIPx}$ ). El análisis estadístico se realizó en el programa JMP Pro v.15, usando un análisis factorial. La variable de respuesta fue deltaCt. Las variables independientes fueron: genes RIP (“RIP”: RIP1, RIP2 o RIP3-5), tratamiento (No\_avispa, Lh o Gh), *S. poulsonii* (Brazil o Uganda), Tiempo (24h o 72h). Los efectos significativos se determinaron mediante un análisis de Tukey. Dado que la secuencia nucleotídica de los genes codificantes para las proteínas RIP3-5 es idéntica, se analizaron solo dos genes de manera independiente (RIP1 y RIP2), ya que no es posible diferenciar entre RIP3-5.

Gen	Oligos	Eficiencia	Fuente
RIP1	F= 5'- AATCAGAGGGGCATTAGCTC-3' R=5'-CTTCGCTTGTGGTTCTTGAT-3'	99.5	(Ballinger and Perlman, 2017)
RIP2	F=TGGACTTCGAGCTGATGAAA R=GCTGTTGCCAAAATAACACG	92.1	Este trabajo
RIP3-5	F=TAATAACTAGACCATTAGTTAGACGAA R=CTGCCAAATTGTTCTATTATTCCTTCT	104.1	(Ballinger and Perlman, 2017)

rpoB	F=GTTTTTGATGGAATGACAAATGAAGAA TT R=CGAAACTGGATTATCAAATTTTTCACC	99.8	(Ballinger and Perlman, 2017)
------	--	------	-------------------------------

**Tabla 2.** Secuencias y eficiencia de los oligonucleótidos utilizados para amplificar los 5 genes RIP más el gen control *rpoB*.

#### 4.9 Representación gráfica y disponibilidad de datos

Todas las gráficas que se muestran en este trabajo fueron generadas en R utilizando la paquetería ggplot2 (versión 3.3.0). Los heatmaps se realizaron utilizando el paquete pheatmap versión 1.0.12 (Kolde 2019). Las secuencias del transcriptoma se pueden descargar desde el sitio de internet de NCBI con el identificador PRJNA577145 (BioProject) y SAMN13020352 (BioSample). Los archivos S1, S2 se encuentran libres para su descarga en

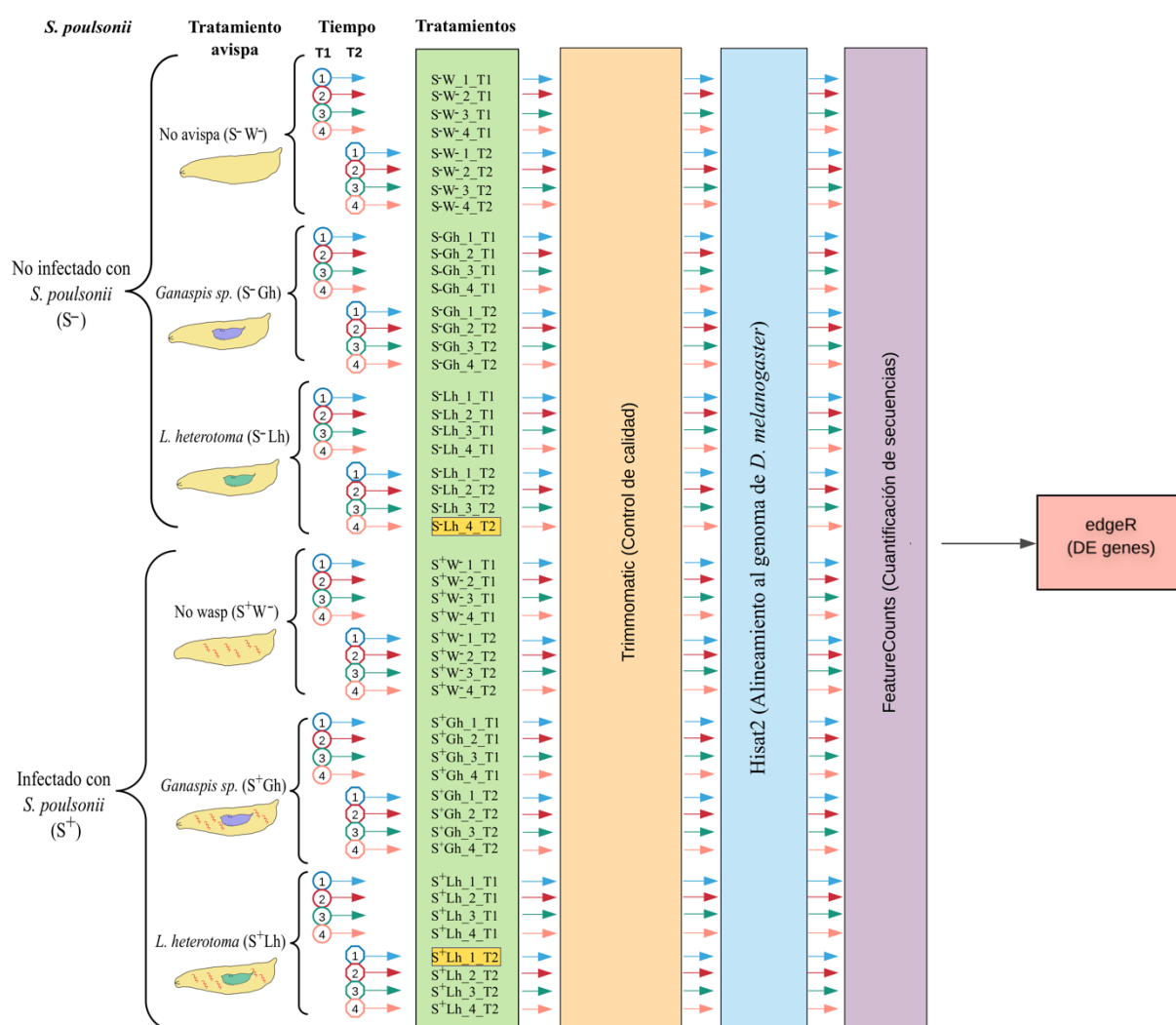
[https://figshare.com/projects/An\\_lisis\\_metatranscript\\_mico\\_de\\_Drosophila\\_melano\\_gaster\\_durante\\_su\\_interacci\\_n\\_con\\_Spiroplasma\\_y\\_avispa\\_parasitoides/100811](https://figshare.com/projects/An_lisis_metatranscript_mico_de_Drosophila_melano_gaster_durante_su_interacci_n_con_Spiroplasma_y_avispa_parasitoides/100811)



## 5.0 Resultados y Discusión

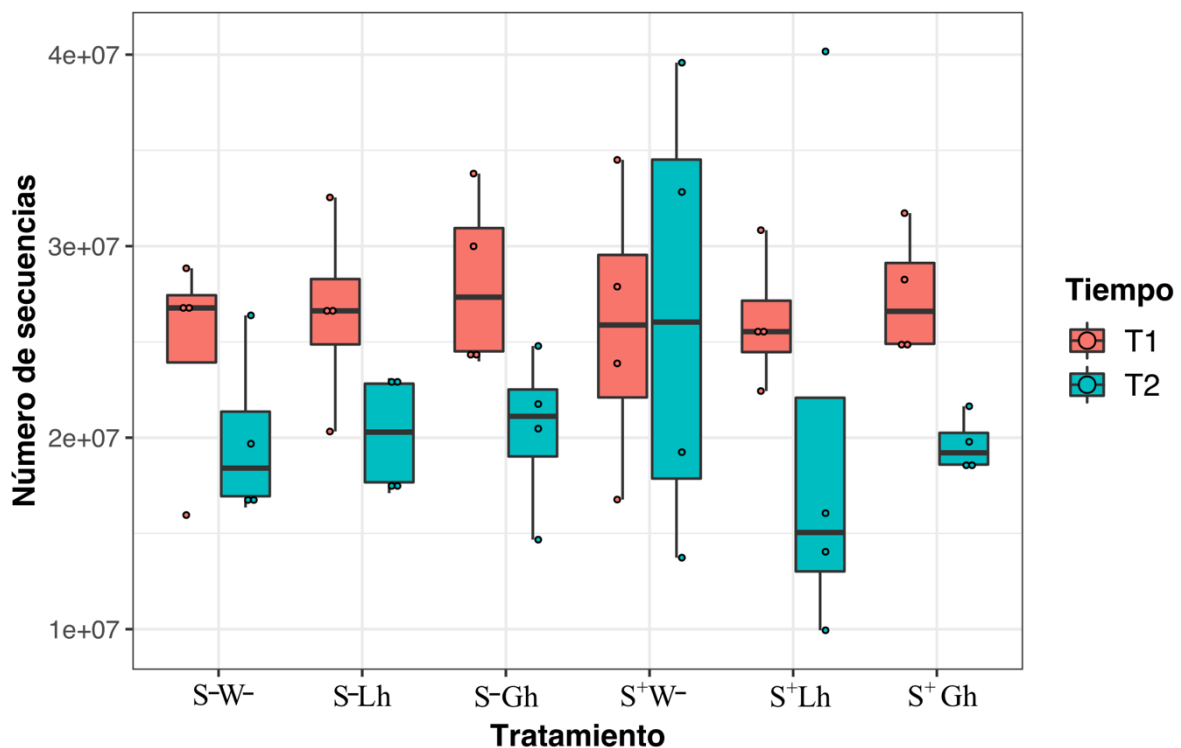
### 5.1 Estadísticas de secuenciación

El diseño experimental planteado resultó en la generación de doce tratamientos. Cada uno de ellos compuesto por cuatro réplicas biológicas (**Figura 3**). El análisis de calidad de la secuenciación reveló valores de phred de ~30, esto es un indicativo de buena calidad y se refiere a una probabilidad de que 1 de cada 1000 nucleótidos pueda estar mal asignado. Adicionalmente no se detectó la presencia de adaptadores.



**Figura 3.** Tratamientos generados y flujo de trabajo para el análisis de expresión diferencial. Los tratamientos se dividen por presencia ( $S^+$ ) o ausencia ( $S^-$ ) de *S. poulsonii*, seguidos de su estatus de parasitismo y tiempo post parasitismo T1=24h y T2 =72h. Los tratamientos en amarillo ( $S^-Lh_4_T2$  y  $S^+Lh_1_T2$ ) fueron removidos de los análisis, ver discusión en siguiente sección.

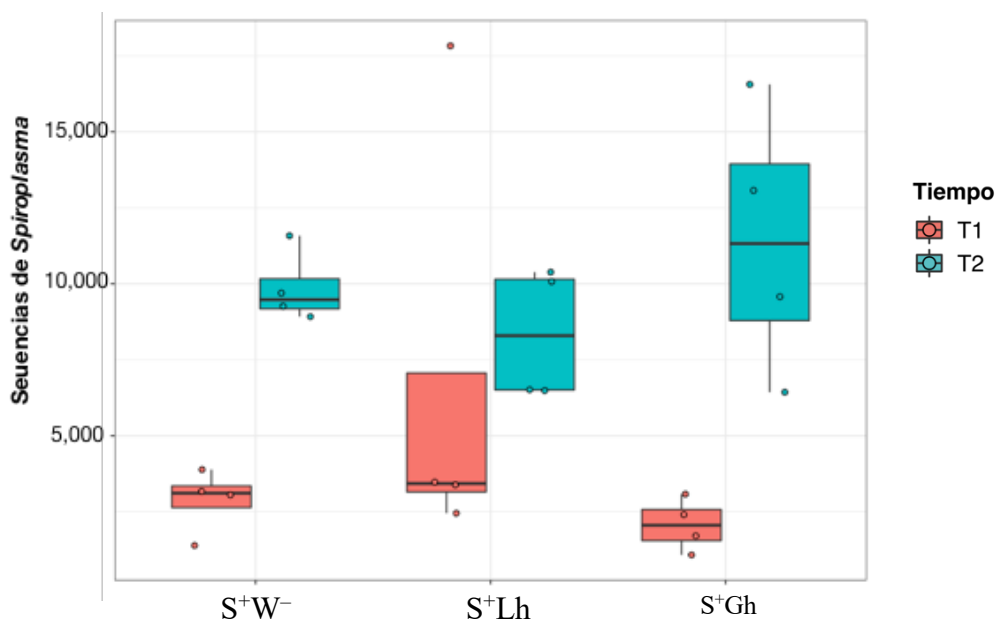
El número total de secuencias obtenidas por réplica estuvo en un rango de 34-50 millones (**Figura 4**). Al ser un metatranscriptoma no todas las secuencias corresponden al hospedero. El rango de secuencias exclusivas para *D. melanogaster* excluyendo secuencias ribosomales fue de entre 10-30 millones, (**Figura 4**). Un número considerable de secuencias, 3-78% del total de la secuenciación corresponde a secuencias ribosomales (18S y 28S rRNA) de *D. melanogaster*, (**Tabla S1**). La presencia de secuencias ribosomales indica una baja eficiencia en la remoción de estas secuencias, esto a pesar de que las especificaciones del kit ribozero, que fue el implementado para la remoción de ARNr indican que es compatible con *D. melanogaster*, sin embargo, las sondas que incluye este kit son 65-85% homologas hacia el ribosomal de *D. melanogaster*, lo que puede explicar su baja efectividad y la observación de patrones de mayor cobertura hacia algunas regiones específicas del ribosomal (**Figura S1**).



**Figura 4. Número de secuencias correspondientes a *D. melanogaster* a las 24 (T1) o 72 horas (T2) post parasitismo.** Ausencia de *S. poulsonii* (S<sup>-</sup>). Presencia de *S. poulsonii* (S<sup>+</sup>). Lh= *Leptopilina heterotoma*, Gh= *Ganaspis* sp, W<sup>-</sup> = Ausencia de parasitismo. Números de secuencias excluyendo las que alinearon al ribosomal

De manera general, un mayor número de secuencias alinearon al genoma de *D. melanogaster* en el Tiempo 1 (T1), en comparación con el tiempo 2 (T2), (**Figura 4**), aunque esto podría estar determinado por el número de secuencias generadas por el secuenciador, un mayor número de secuencias mapearon hacia genes ribosomales en T2 comparado con T1 (**Tabla S1**). Lo anterior podría estar influenciado esta diferencia entre ambos tiempos. Aunque la presencia de secuencias ribosomales redujo el número de secuencias de ARNm del hospedero, un análisis de poder determinó que se tiene poder de 91–100% para detectar genes que cambian su expresión con un fold change de 4, 75–99% para detectar genes con fold change de 3, 38–80% para genes con fold change de 2 y 16–37% para genes que estén cambiando en un fold change de 1.5.

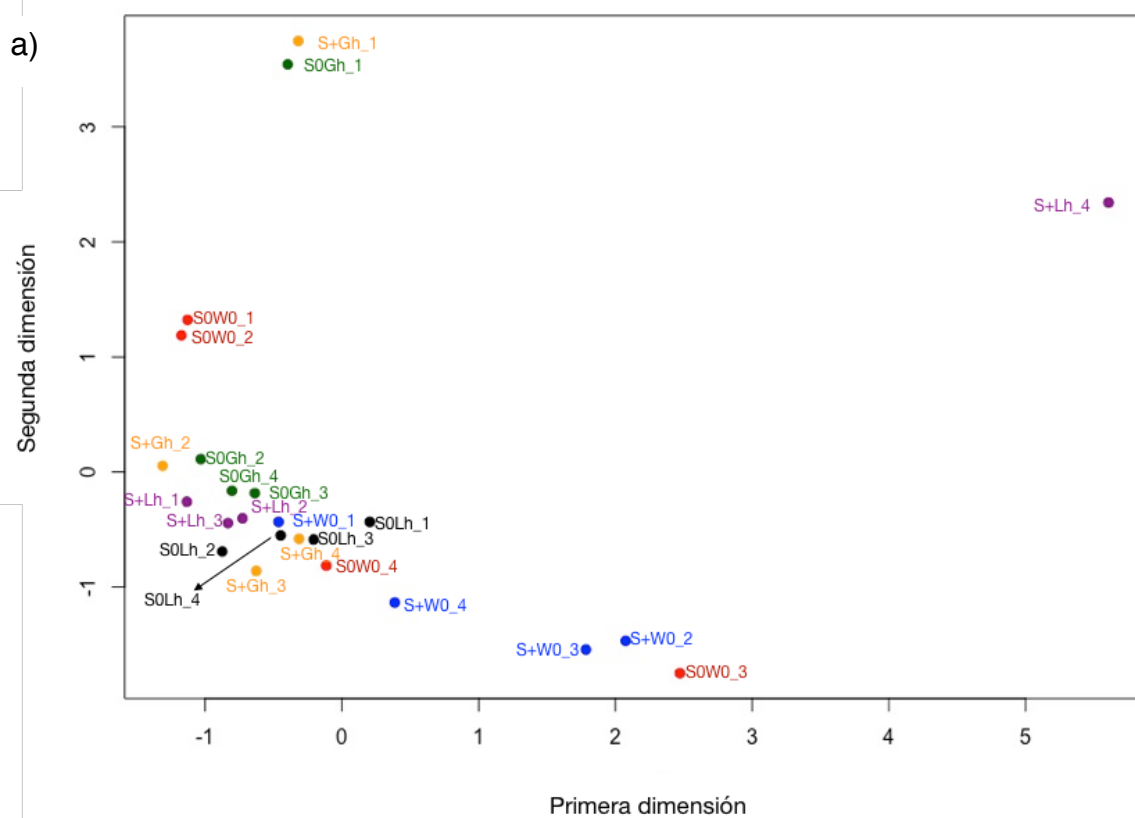
La ventaja de un metatranscriptoma es que adicional a recuperar secuencias del hospedero, también se recuperan secuencias de *S. poulsonii* o incluso de las avispas. En nuestros tratamientos, el número de secuencias correspondientes a *S. poulsonii* estuvo en un rango de 1390-17,826 secuencias por réplica (**Figura 5**).

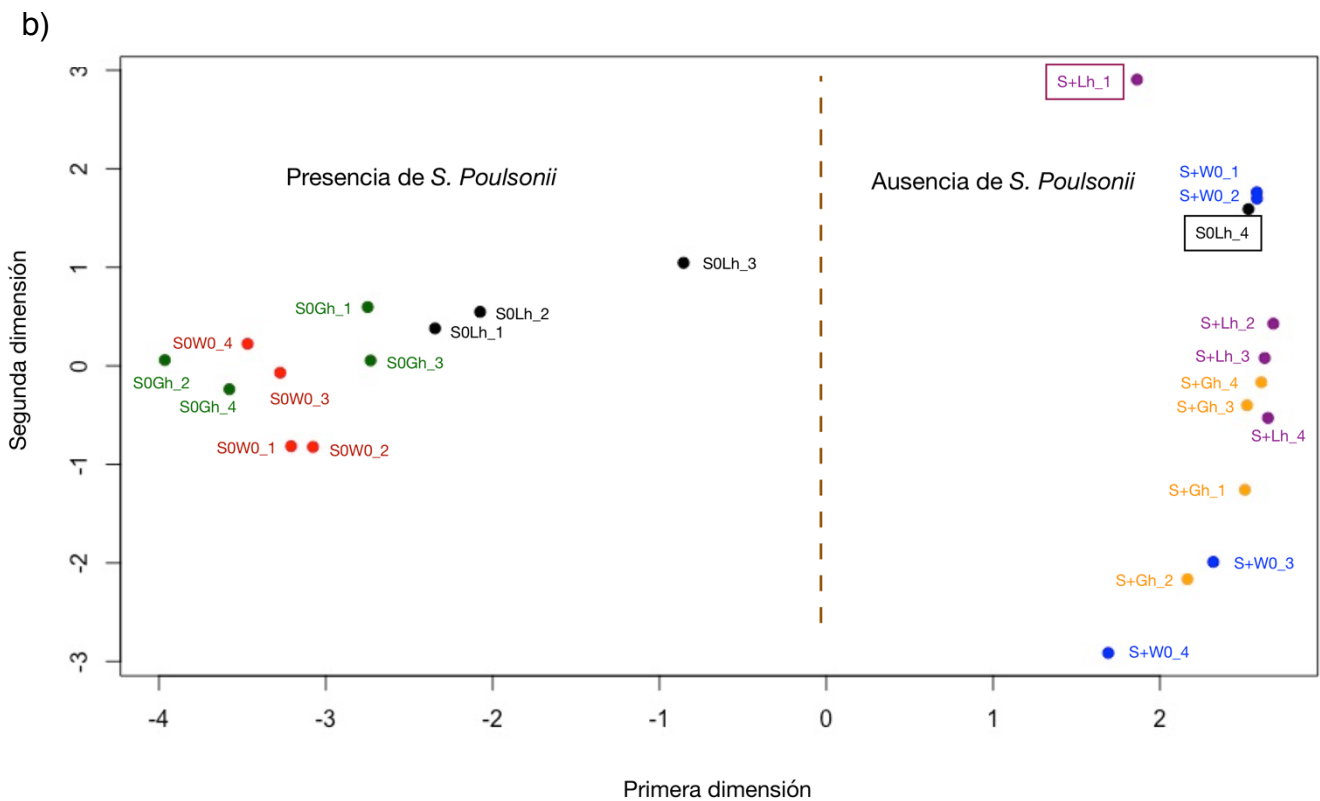


**Figura 5. Número de secuencias del metatranscriptoma correspondientes a *Spiroplasma poulsonii* (sMel-Uganda).** Tratamientos infectados con *S. poulsonii* y libres de parasitismo (S<sup>+</sup>W<sup>-</sup>), *Spiroplasma-L. heterotoma* (S<sup>+</sup>Lh) y *Spiroplasma-Ganaspis* sp. (S<sup>+</sup>Gh), a las 24h (T1) o 72 horas (T2), post parasitismo.

## 4.2 Análisis exploratorio de agrupación de tratamientos

Las gráficas de escalamiento multidimensional (MDS-plots) permiten agrupar tratamientos semejantes. Este análisis toma en cuenta las distancias de los valores de expresión entre tratamientos. El MDS-plot correspondiente al tiempo 1 post parasitismo (**Figura 6a**), no mostró un agrupamiento entre tratamientos, lo que sugiere que hay pocas diferencias en cuanto a los niveles de expresión. En el MDS-plot del tiempo 2 (72 horas), se observa una separación principal de tratamientos respecto a presencia/ausencia de *S. poulsonii* (**Figura 6b**). En este gráfico se identificaron dos muestras (S<sup>+</sup>Lh\_1 y S<sup>-</sup>Lh\_4) atípicas, ya que no se comportan como sus réplicas (**Figura 6b, muestras dentro de un rectángulo**). La muestra S<sup>+</sup>Lh\_1 a diferencia de sus otras tres réplicas, mostró una mayor expresión de algunos genes de respuesta inmune, lo que sugiere que tal vez alguna(s) de las larvas de esta réplica pudieron estar infectadas con alguna bacteria. Aunque no es posible determinar el origen de la infección, un contaminante común en los cultivos de *Drosophila* sp. son bacterias que producen un mucilago/moco, este moco forma una capa sobre la dieta y en ocasiones las larvas quedan atrapadas. Esto se observó en algunos de los viales, sin embargo, esos no se utilizaron para los experimentos.



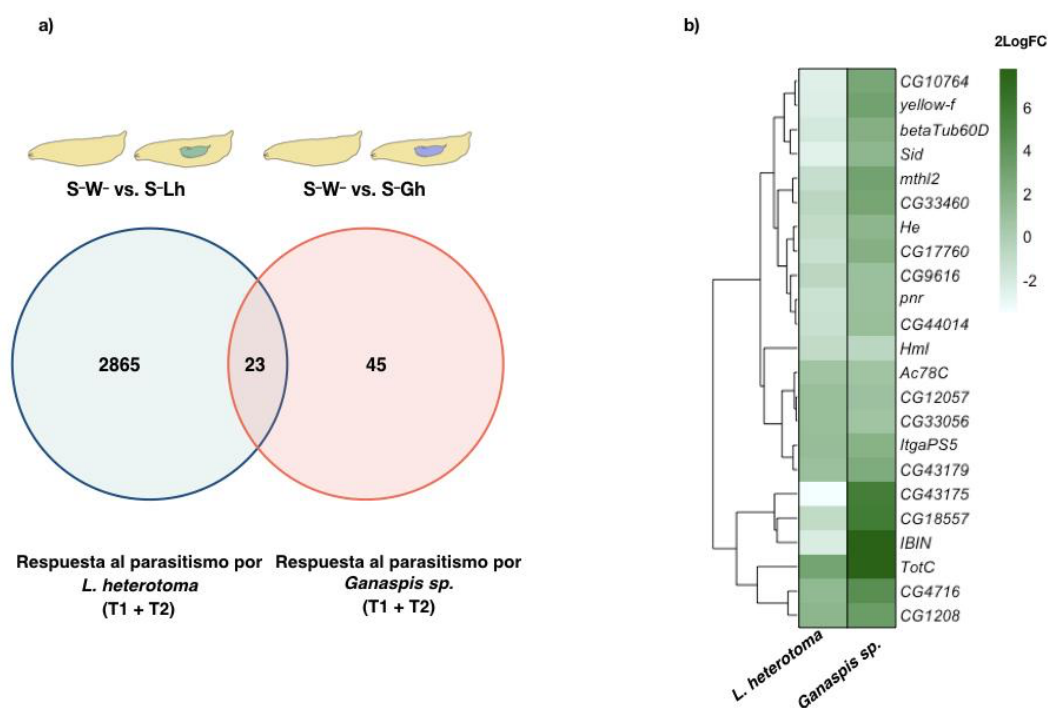


**Figura 6. Gráfica multidimensional de la expresión de *D. melanogaster*.** a) a las 24h y b) a las 72h post-parasitismo. Se muestran todos los tratamientos y réplicas generados. S-W<sup>-</sup> (rojo), S+W<sup>-</sup> (azul), S-Lh (negro), S+Lh (morado), S-Gh (verde) y S+Gh (amarillo). Las muestras atípicas están dentro de un rectángulo. La línea vertical café indica la separación entre presencia/ausencia de *S. poulsonii* Lh= *L. heterotoma*, Gh= *Ganaspis sp.* S<sup>-</sup>= Ausencia de *S. poulsonii*, S<sup>+</sup>= Presencia de *S. poulsonii* y W<sup>-</sup> = Ausencia de parasitismo

La réplica S-Lh\_4 (**Figura 6b, rectángulo negro**) se agrupó del lado de las muestras infectadas con *S. poulsonii*. Para descartar la posible presencia del simbionte, se mapearon las secuencias de este tratamiento al genoma de la bacteria, no se detectaron secuencias del simbionte. Una característica distintiva de esta réplica es que estuvo compuesta por tres larvas, si por azar esas larvas fueron hembras, explicaría su agrupación con muestras infectadas con *S. poulsonii*. En presencia de *S. poulsonii* se esperan que todas las larvas sean hembras, ya que los machos murieron durante la etapa embrionaria. Con base en estas observaciones se decidió no incluir ambas réplicas en los análisis posteriores.

## Sección 1: Expresión diferencial de genes en *D. melanogaster* en presencia de avispas parasitoides

En respuesta al parasitismo por *L. heterotoma* o *Ganaspis sp.*, las larvas de *D. melanogaster* expresaron genes de manera diferencial. El parasitismo por *L. heterotoma* indujo la expresión diferencial de 2,888 genes, mientras que el parasitismo por *Ganaspis sp.*, influenció 68 genes, ello al compararlo con sus controles no parasitados. En ambos casos esto representa la sumatoria de los dos tiempos analizados, 24h (T1) y 72h (T2) post parasitismo. En la siguiente sección se mostrarán los resultados de manera independiente por tiempo. Un grupo de 23 genes se expresaron en común por la presencia de ambas avispas (**Figura 7a**). Los valores de expresión (2LogFC) de estos 23 genes varían entre tratamientos. En general se observó una mayor expresión de estos genes por el parasitismo de *Ganaspis sp.* (**Figura 7b**).



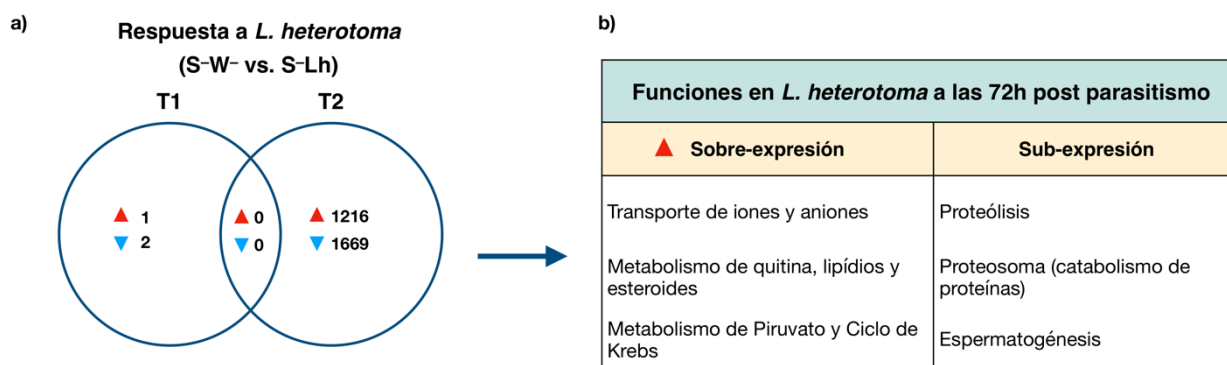
**Figura 7. Respuesta transcripcional de *D. melanogaster* al parasitismo.** a) Diagrama de Venn del número de genes expresados diferencialmente a las 24 + 72 horas por el parasitismo de *L. heterotoma* (S-W vs. S-Lh) y *Ganaspis sp.* (S-W vs. S-Gh) y b) Valores de expresión (2LogFC) de los 23 genes expresados diferencialmente en común por ambas avispas. La intensidad de color en el heatmap representa los valores de expresión

Los 23 genes en común (**Figura 7a**), pudieran representar una respuesta general al parasitismo por dos especies de avispas no relacionadas, sin embargo, como se observa en la (**Figura 7b**), los patrones de expresión para estos genes no siempre van en la misma dirección, lo que descarta una respuesta común.

Para algunos de esos 23 genes, existen reportes en contexto de parasitismo por avispa o de repuesta a estrés, entre ellos destaca; *IBIN* (*Induced by infection*), sobre expresado por *Ganaspis sp*, pero sub expresado por *L. heterotoma*. Se ha reportado la expresión de *IBIN* como respuesta a la infección por bacterias o por la avispa *L. boulandi*. La sobreexpresión de *IBIN* induce proliferación de hemocitos y un aumento de glucosa en hemolinfa (Valanne et al., 2019). Un gen sobre expresado por ambas avispas fue *TotC*, que es un gen de respuesta a condiciones de estrés (Ekengren and Hultmark, 2001).

### Sección 1.1 Parasitismo por *L. heterotoma*

El parasitismo por *L. heterotoma* tuvo una mayor respuesta en el hospedero a las 72h en comparación con las 24h post parasitismo (**Figura 8a**). Esto respecto al número de genes diferencialmente expresados. Para el tiempo 1 solamente 3 genes se expresaron diferencialmente. Uno sobre expresado (*Thor*) y dos sub expresados (*hml* y *mt:ATPase6*). (**Archivo S1**). En el segundo tiempo, 818 de los 1216 genes sobre expresados, se agruparon en 32 categorías ontológicas (GO), siendo genes involucrados en transporte la categoría más enriquecida (**Archivo S2**). Los genes sobre expresados estuvieron enriquecidos para funciones relacionadas con producción de energía (metabolismo lípidos, aminoácidos y ciclo de Krebs).



**Figura 8. Genes de *D. melanogaster* diferencialmente expresados durante parasitismo por *L. heterotoma*.** a) Diagrama de Venn del número de genes expresados diferencialmente a las 24h (T1) o 72 h (T2) post parasitismo. b) Enriquecimiento funcional de algunos de los genes expresados diferencialmente. W<sup>-</sup> = Ausencia de parasitismo. S<sup>-</sup> = Ausencia de *S. poulsonii* Lh= *Leptopilina heterotoma*

La sobre expresión de genes relacionados con producción de energía a las 72h post parasitismo, podrían reflejar una estrategia de la avispa para obtener mayores recursos del hospedero. Por otro lado, la activación de una respuesta inmune en insectos tiene un costo energético asociado (Dolezal et al., 2019). Nuestros resultados indican que el parasitismo por *L. heterotoma* no activa una respuesta inmune en *D. melanogaster*, por lo que no es claro si estos recursos energéticos están siendo dirigidos a un intento de activación de esta respuesta.

Respecto a los genes sub expresados, se identificaron únicamente dos a las 24h post parasitismo. Uno de ellos codifica para hemolectina (*hml*) y el otro para una sub unidad de la ATPasa mitocondrial (mt:ATPase6) (**ArchivoS1**). La proteína hemolectina es producida por los plasmotocitos y células cristal y está involucrada en coagulación (Goto et al., 2003). A las 24h, la avispa está en estadio de huevo, por lo que la sub-expresión de *hml* por *L. heterotoma* podría ser la respuesta de hospedero hacia algún tipo de efector inoculado por la avispa. Se han identificado diferentes proteínas en el veneno de la avispa, pero su función es poco conocida (Goecks et al., 2013).

En el tiempo 2 (72h) se identificaron 1669 genes sub expresados, de ellos 945 se agruparon en 25 categorías funcionales (términos GO), siendo proteólisis y espermatogénesis las categorías más enriquecidas (**Figura 8b** y **Archivo S2**). Schlenke et al., 2007 también reportó la sub-expresión de genes relacionados con desarrollo de gónadas por el parasitismo de *L. heterotoma*. Estas dos observaciones independientes sugieren un posible efecto de castración inducido por esta avispa. La castración del hospedero es un fenómeno que se ha reportado en algunas especies de avispas (Beckage and Gelman, 2004), pero no en *L. heterotoma*, lo que representa una oportunidad de investigación en el futuro.



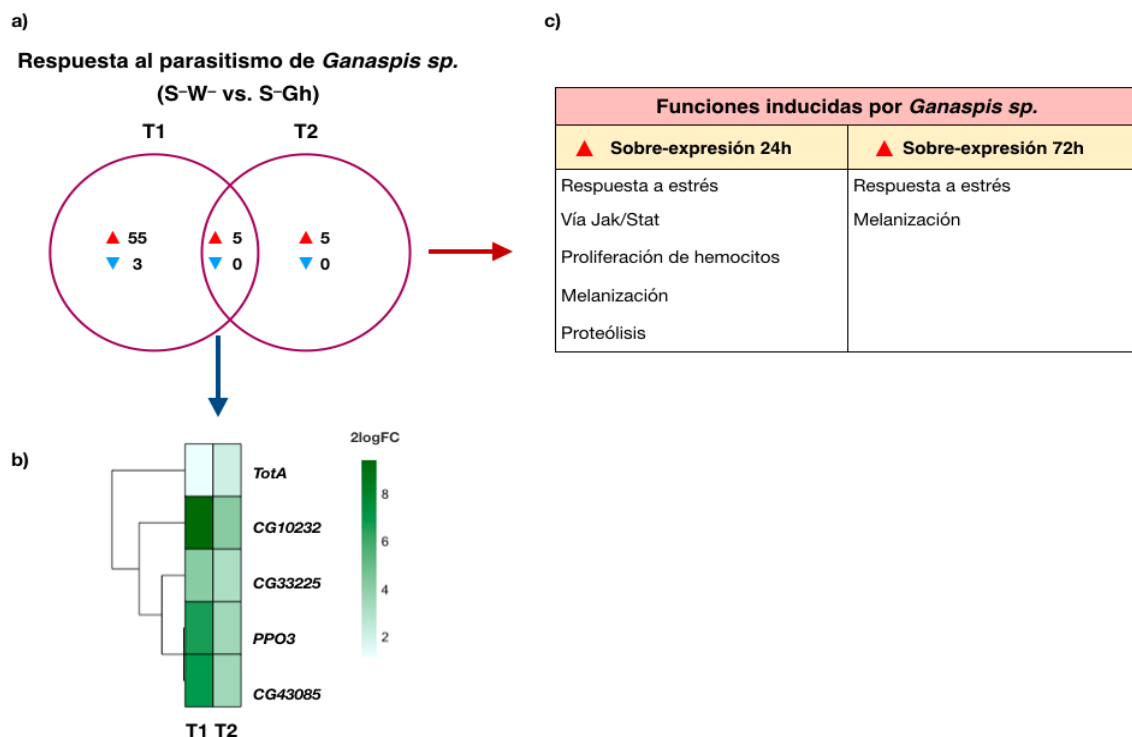
En el contexto del parasitismo por *L. heterotoma*, este trabajo representa el primer estudio mediante RNA-Seq. En el año 2007, Schlenke et, al., evaluaron la respuesta de *D. melanogaster* al parasitismo por *L. heterotoma* mediante el uso de microarreglos, esto a tiempos menores a 24 horas post parasitismo. En un tiempo parecido a nuestro T1 (su rango fue entre 21-24h), los autores reportaron 37 genes diferenciales ( $P < 0.01$ ,  $FC > 1$  y  $< -0.5$ ).

A las 24 h post parasitismo, nuestro análisis detectó 3 genes diferencialmente, expresados, ninguno de ellos detectado en el estudio de microarreglo anterior (Schlenke et al., 2007). Cabe mencionar que se detectó expresión para los 37 genes reportados por Schlenke et, al., sin embargo, no fue diferencial. Diferentes aspectos podrían contribuir a explicar las diferencias entre los resultados de Schlenke et, al., y los de la presente investigación, entre ellos la diferente metodología utilizada, es decir, el uso de microarreglos versus RNAseq, diferentes paqueterías para la detección de genes diferenciales, tiempos exactos del parasitismo, el uso de diferentes líneas de *D. melanogaster*, Oregon R versus Canton S (este análisis). Adicionalmente, al analizar los datos de secuenciación descubrimos que los tratamientos estaban infectados con *Wolbachia*, la presencia de esta bacteria es común y ha pasado desapercibida en diferentes estudios y líneas de *D. melanogaster*. Particularmente anterior a la generación de los tratamientos para el metatranscriptoma, las moscas Canton S habían pasado por tres generaciones de tratamiento con antibiótico (tetraciclina) para eliminar esta bacteria.

A pesar de las diferencias antes mencionadas entre el microarreglo de Schlenke et al., 2007 y el presente estudio, ambos coinciden en que el parasitismo por la avispa *L. heterotoma* no induce una respuesta inmune de *D. melanogaster*, evaluada a nivel de transcripción

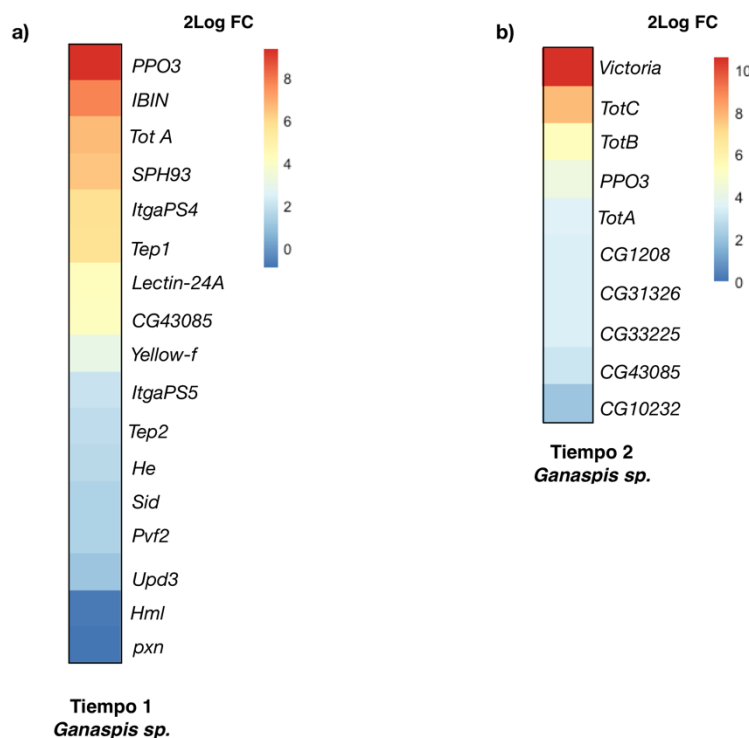
## Sección 1.2 Parasitismo por *Ganaspis sp.*

El parasitismo por *Ganaspis sp.* tuvo un mayor efecto a las 24h en comparación con las 72h post parasitismo. En el primer tiempo, 63 genes estuvieron diferencialmente expresados en comparación con 10 en el tiempo 2 (**Figura 9a**). Cinco genes se sobre expresaron en común en ambos tiempos, aunque sus valores de expresión fueron diferentes (**Figura 9b**). Algunos de estos genes (*CG43085* y *CG33225*) no tienen una función asociada, *CG10232* tiene una predicción de serina endopeptidasa y *PP03* codifica para la proteína profenol oxidasa, una enzima clave en el proceso de melanización de parasitoides, *PP03* fue uno de los genes más sobre expresados, hasta 512 veces más en respuesta al parasitismo por *Ganaspis sp.* Este gen es sintetizado exclusivamente por los lamelocitos (Dudzic et al., 2015), por lo que la alta sobre expresión de PPO3 puede ser un indicativo de activación de estas células. En ambos tiempos post parasitismo se identificaron genes con funciones relacionadas a respuesta inmune o estrés (**Figura 9c**).



**Figura 9. Genes expresados diferencialmente por el parasitismo de *Ganaspis sp.*** a) Diagrama de Venn indicando el número de genes diferencialmente expresados a las 24h (T1) o 72h (T2), post parasitismo. b) Mapa de calor de los cinco genes en común en T1 y T2, se muestran los valores de 2LogFC en ambos tiempos. c) Funciones de algunos de los genes expresados diferencialmente.

En contraste con el parasitismo por *L. heterotoma*, *Ganaspis sp.*, indujo una respuesta inmune en *D. melanogaster*, ya que un activador de la vía Jack stat (*up3*), así como algunos genes regulados por esta vía, *TotA* y *Tep1-2*, (Agaisse and Perrimon, 2004) estuvieron sobre expresados a las 24 h post parasitismo (**Figura 10b**). La vía Jack stat entre otras funciones participa en formación de lamelocitos y encapsulación (Agaisse and Perrimon, 2004). En el mosquito *Anopheles gambiae*, una proteína Tep, (AgTep1), se une a la superficie de bacterias y del protozooario *Plasmodium berghei*, esta unión favorece la posterior fagocitosis y encapsulación del parásito (Shokal and Eleftherianos, 2017). En contexto de *Ganaspis sp.*, la sobre expresión de *Tep1-2* puede estar relacionada con un intento de defensa en contra de esta avispa. Por otro lado, la expresión de los genes de la familia Tot (*TotA-C* y *Victoria*) a las 72h post parasitismo puede reflejar una respuesta al estrés inducido por el parasitismo. Los genes de la familia *Tot* se caracterizan por su respuesta en contra de diferentes tipos de estrés, aunque su función no es muy clara (Ekengren and Hultmark, 2001).



**Figura 10. Log2FC de los genes inducidos por el parasitismo de *Ganaspis sp.*** a) Subset de genes diferenciales expresados a las 24 horas post parasitismo que se mencionan en el texto. b) Totalidad de genes expresados diferencialmente a las 72 horas post parasitismo.

Otros genes sobre expresados por *Ganaspis sp.* a las 24h post parasitismo fueron; *pvf2*, *he*, *ItgSAps4* y *PP03*, todos ellos relacionados con funciones de hemocitos. *pvf2* codifica para una citosina relacionada con proliferación de hemocitos, *hemesse (he)*, está presente en células cristal, plasmátocitos y lamelocitos, *ItgsaPS4*, codifica para una integrina cuya función es mediar interacciones físicas entre hemocitos (Irving et al., 2005). La sobre expresión de *pvf2*, *he*, *ItgSAps4* y *PP03* (**Figura 10**), sugiere que el parasitismo por *Ganaspis sp.* interfiere con la homeostasis de los hemocitos. Respecto a ello, Mortimer et al., 2013. detectaron un incremento en el número de lamelocitos como consecuencia del parasitismo por *Ganaspis sp.* Una activación y mayor número de lamelocitos es consistente con la sobre expresión de algunos de los genes detectados en el transcriptoma, especialmente aquellos expresados preferencialmente por estas células como lo es *PP03*.

Los resultados anteriores sugieren que *D. melanogaster* inicia una respuesta inmune en contra de la avispa *Ganaspis sp.*, sin embargo, esta respuesta es ineficiente, ya que del ~100% de las larvas parasitadas por *Ganaspis sp.*, emergen avispas. Es importante resaltar que el veneno de esta avispa contiene una ATP'asa (sarco/endoplasmic reticulum calcium ATPase, SERCA), con la actividad de modular las concentraciones de calcio, lo que previene la activación de los plasmátocitos, que son parte esencial en la encapsulación del parasitoide, (Mortimer et al., 2013). El parasitismo por *L. heterotoma* al igual que el de *Ganaspis Sp* es muy eficiente ya que también alcanza valores del 100%, sin embargo como respuesta a esta avispa no se detectó respuesta inmune, sección 1.1.

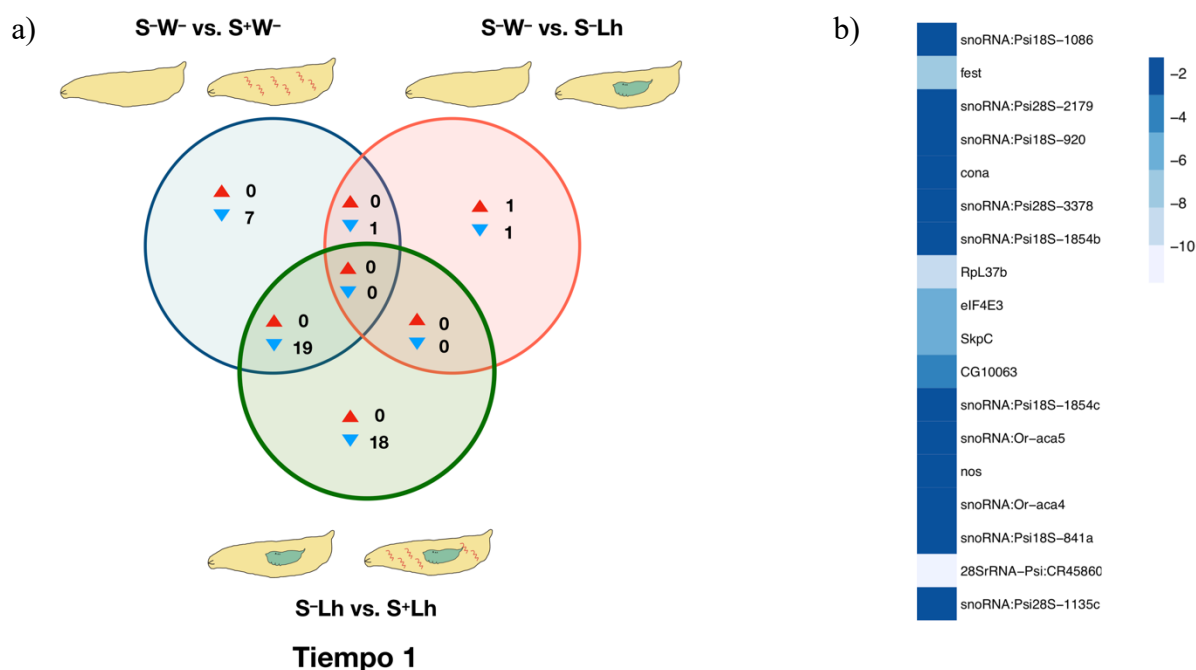
Algunos de los genes de *D. melanogaster* sobre-expresados durante el parasitismo por *Ganaspis sp.*, (*TotA-C*, y *PPO3*), también fueron inducidos por el ataque de la avispa *Asobara tabida* (Salazar-Jaramillo et al., 2017), lo que sugiere una posible respuesta común de algunos genes al parasitismo por diferentes especies de avispas. La lista completa de los genes expresados diferencialmente se encuentra en (**Archivo S1-2**).

## Sección 2. Expresión diferencial de genes de *D. melanogaster* en presencia de *S. poulsonii* y avispas parasitoides

### Efecto de *S. poulsonii* durante el parasitismo por *L. heterotoma*

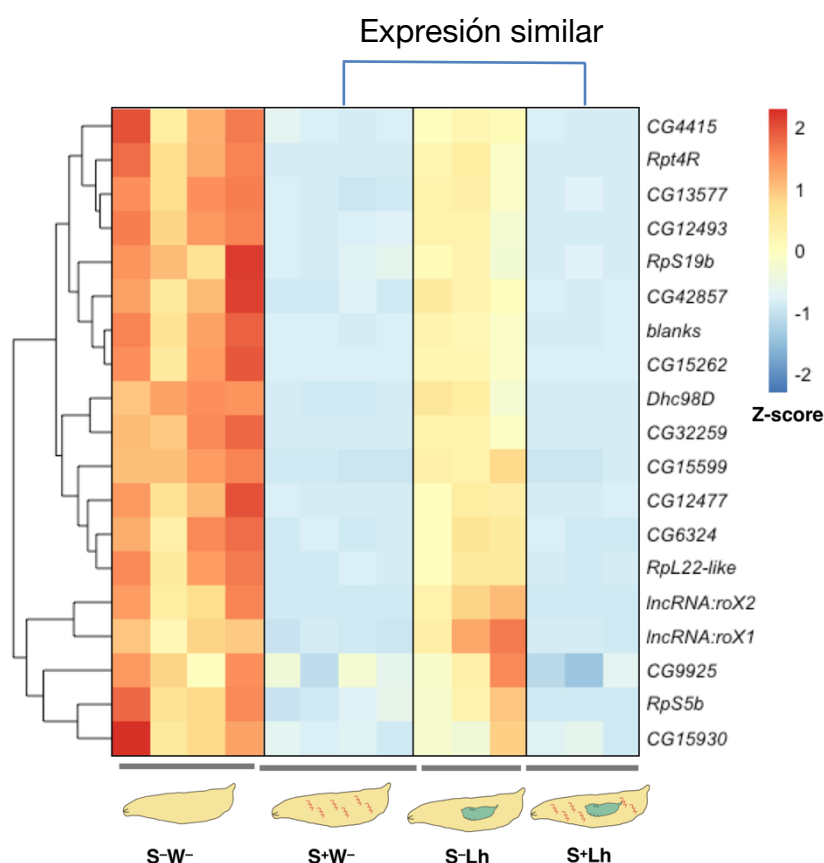
Uno de los objetivos de este trabajo es evaluar la contribución del hospedero (*D. melanogaster*), en la muerte de la avispa *L. heterotoma* durante la interacción con *Spiroplasma*. En la sección anterior se describió la respuesta al parasitismo en ausencia de *S. poulsonii*. En esta sección, se describirá la respuesta de *D. melanogaster* durante la interacción tripartita.

Para reconocer los genes que se expresan únicamente durante la interacción *S. poulsonii* -*L. heterotoma*, se hizo uso de los diagramas de Venn. Cada círculo del diagrama en la (Figura 11) representa una comparación pareada de tratamientos. Con base en esta estrategia y para el tiempo 1, se identificaron 18 genes únicos, todos sub expresados durante la interacción *S. poulsonii* -*L. heterotoma* (Figura 11a-b círculo verde; Archivo S1).



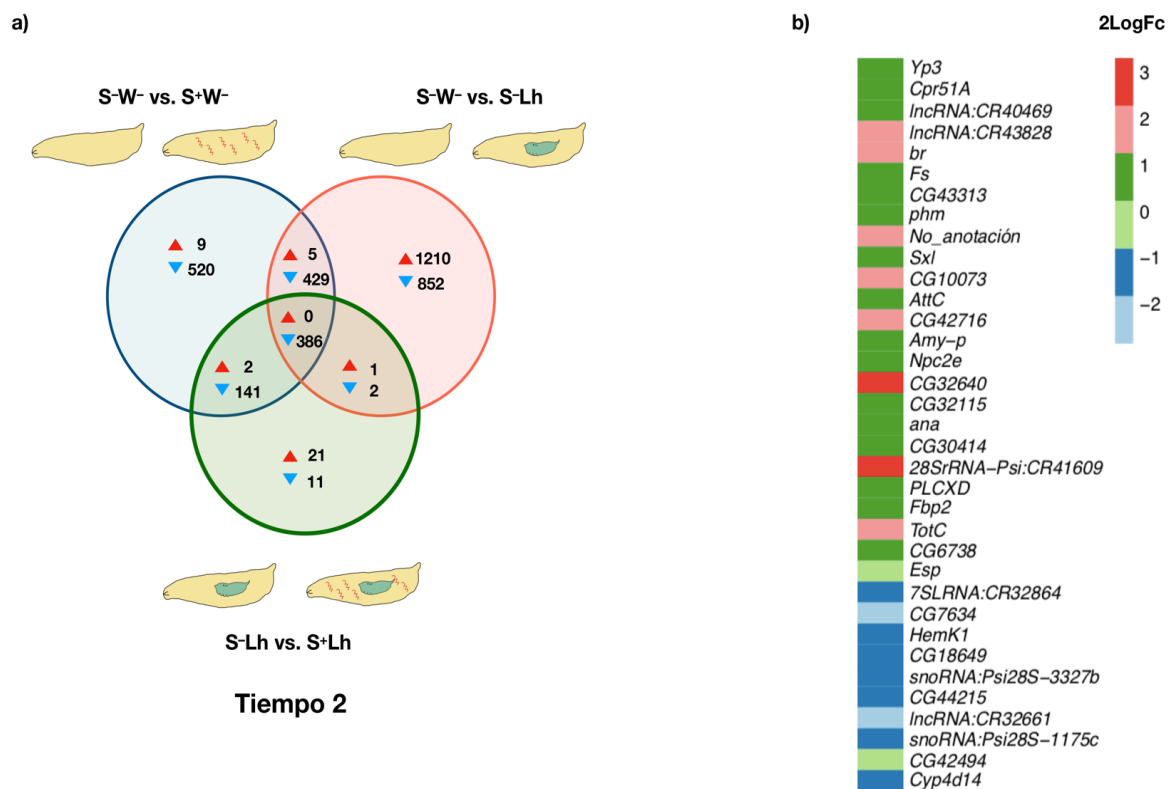
**Figura 11. Expresión diferencial de *D. melanogaster* en presencia de *S. poulsonii* y *L. heterotoma* a las 24h.** a) Genes exclusivos durante la interacción *Spiroplasma*-*L. heterotoma* ( $S^-Lh$  vs.  $S^+Lh$ , círculo verde). Se excluyeron los genes expresados por la única presencia de *Spiroplasma* ( $S^-W^-$  vs  $S^+W^-$ , círculo azul) o por el parasitismo de *L. heterotoma* ( $S^-W^-$  vs.  $S^-Lh$ , círculo rojo). b) Log<sub>2</sub>FC de los 18 genes sub-expresados exclusivos durante la interacción *Spiroplasma*-*L. heterotoma*. Los triángulos en rojo indican sobre expresión y los azules sub expresión

Para evitar la exclusión de posibles genes de interés solo por estar en las intersecciones, se evaluó la expresión de estos genes. En la (**Figura 12**) se representa la expresión de los 19 genes presentes en una de las intersecciones que se muestra en la (intersección círculo verde-azul, **Figura 11-12**). Los valores de expresión de estos 19 genes son similares entre los tratamientos infectados con *S. poulsonii* ( $S^+W^-$  y  $S^+Lh$ ). La expresión de algunos de estos genes (*rox1* y *rox2*), ocurre preferencialmente en machos. El patrón de expresión de *rox1* y *rox2* en los tratamientos infectados con *S. poulsonii* es consistente con la ausencia de machos. Lo anterior sugiere que los 19 genes presentes en esa intersección son resultado de la presencia de *Spiroplasma*, más que de una interacción *S. poulsonii* -*L. heterotoma* (**Figura 12**).



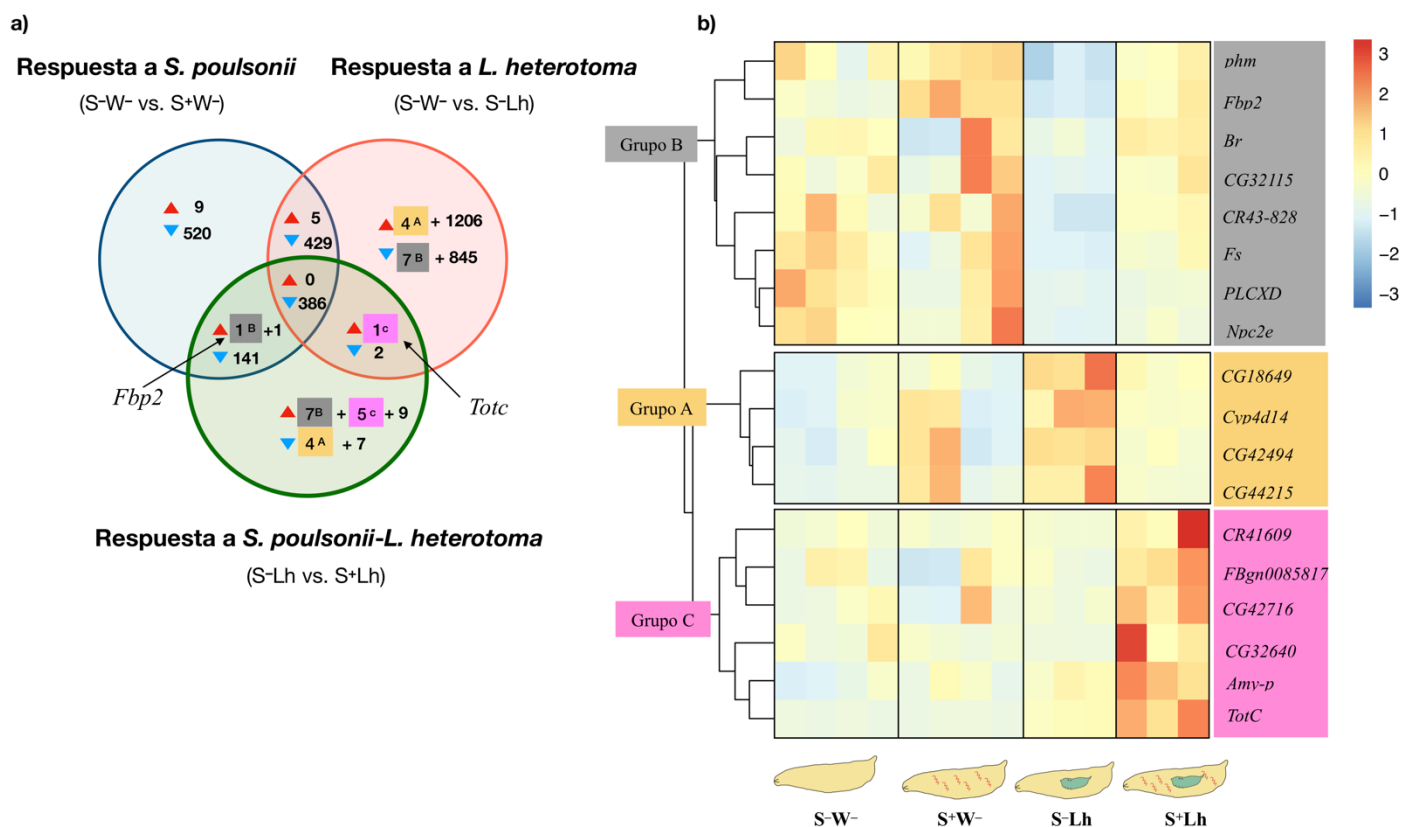
**Figura 12. Expresión de los 19 genes presentes en la intersección.** Estos genes provienen de la intersección entre ( $S^-W^-$  vs.  $S^+W^-$ ) vs. ( $S^-Lh$  vs.  $S^+Lh$ ) identificada en el tiempo 1 post parasitismo (Figura 9). Se muestran los Z-score para las cuentas normalizadas de cada gen en los diferentes tratamientos. Cada cuadro dentro de un tratamiento corresponde una réplica biológica.  $S^-$  = Ausencia de *S. poulsonii*,  $S^+$  = Presencia de *S. poulsonii*, Lh= *L. heterotoma* y  $W^-$  = Ausencia de parasitismo.

En el segundo tiempo post parasitismo (72 horas) se identificaron 32 genes exclusivos a la interacción *S. poulsonii*-*L. heterotoma*, 21 sobre- y 11 sub-expresados (**Figura13 a-b**). De la totalidad de genes diferenciales exclusivos (n=32), únicamente el péptido antimicrobiano *attacinaC* (*AttC*, Log2FC= 0.6), está relacionado con respuesta inmune. Lo anterior sugiere que la presencia de *S. poulsonii* durante el parasitismo por *L. heterotoma* no induce una respuesta inmune en *D. melanogaster*, al menos detectable bajo nuestra metodología. De igual forma en el tiempo 1 ninguno de los genes expresados diferencialmente estuvo relacionado con aspectos de inmunidad. En el tiempo 2, los diagramas de Venn permitieron identificar aquellos genes únicos a la interacción y excluir en primera instancia aquellos presentes en las intersecciones en (**Figura 13a**).



**Figura 13. Expresión diferencial de *D. melanogaster* en presencia de *S. poulsonii* y *L. heterotoma* a las 72 h.** a) Genes exclusivos durante la interacción *S. poulsonii*-*L. heterotoma* (S<sup>-</sup>Lh vs. S<sup>+</sup>Lh, círculo verde). b) Log2FC de los 32 genes diferencialmente expresados durante la interacción *S. poulsonii*, -*L. heterotoma*. En el diagrama de Venn, los triángulos en rojo indican sobre expresión y los azules sub expresión. S<sup>-</sup> = Ausencia de *S. poulsonii*, S<sup>+</sup> = Presencia de *S. poulsonii*, Lh= *L. heterotoma* y W<sup>-</sup> = Ausencia de parasitismo.

Con base en sus niveles de expresión, algunos de los 32 genes exclusivos a la interacción *S. poulsonii*-*L. heterotoma* (**Figura 14**), se diferenciaron en tres grupos principales. Cuatro de los 11 genes sub expresados formaron el grupo A (**Figura 14**), recuadro amarillo, superíndice A). La expresión de estos cuatro genes fue mayor durante el parasitismo por *L. heterotoma* ( $S^-Lh$ ) en comparación con el control ( $S^-W^-$ ). La presencia de *S. poulsonii* durante el parasitismo por *L. heterotoma* ( $S^+Lh$ ), parece restaurar estos genes a sus valores presentes en el control. El grupo B está formado por genes cuya expresión es menor durante el parasitismo ( $S^-Lh$ ), en comparación con el control ( $S^-W^-$ ), sin embargo, la presencia de *S. poulsonii* ( $S^+Lh$ ), parece nuevamente restaurar los valores de expresión de este grupo de genes a los presentes en el control. El último grupo (grupo C), está compuesto por genes cuyo valor máximo de expresión ocurre durante la presencia de *S. poulsonii*-*L. heterotoma* (**Figura 14**). Dos genes (*Fbp2* y *TotC*), aunque no exclusivos a la interacción *S. poulsonii*-*L. heterotoma*, exhibieron patrones de expresión interesantes al estar más expresados en esa interacción, ellos se agruparon con el grupo B y C respectivamente.





**Figura 14 Genes únicos y compartidos durante la interacción *D. melanogaster*-*S. poulsonii*-*L. heterotoma* a las 72 h post parasitismo.** a) Diagrama de Venn de los las comparaciones pareadas entre diferentes tratamientos. Cada círculo representa un análisis independiente. Los genes están sobre- o sub-expresados respecto al tratamiento que aparece subrayado. Los triángulos rojos indican genes sobre- y los azules sub-expresión respectivamente. Los superíndices y colores de fondo sobre el número de genes representan su distribución en los tres diferentes grupos identificados. Grupo A= gris, Grupo B= amarillo y Grupo C= Rosa. b) Mapa de calor de los genes candidatos a contribuir en el mecanismo de protección de *S. poulsonii* por el parasitismo de *L. heterotoma*. Se muestran los valores Z de la expresión normalizada (valores TMM) obtenidos en edgeR. S<sup>-</sup> = Ausencia de *S. poulsonii*, S<sup>+</sup> = Presencia de *S. poulsonii*, Lh= *L. heterotoma* y W<sup>-</sup> = Ausencia de parasitismo.

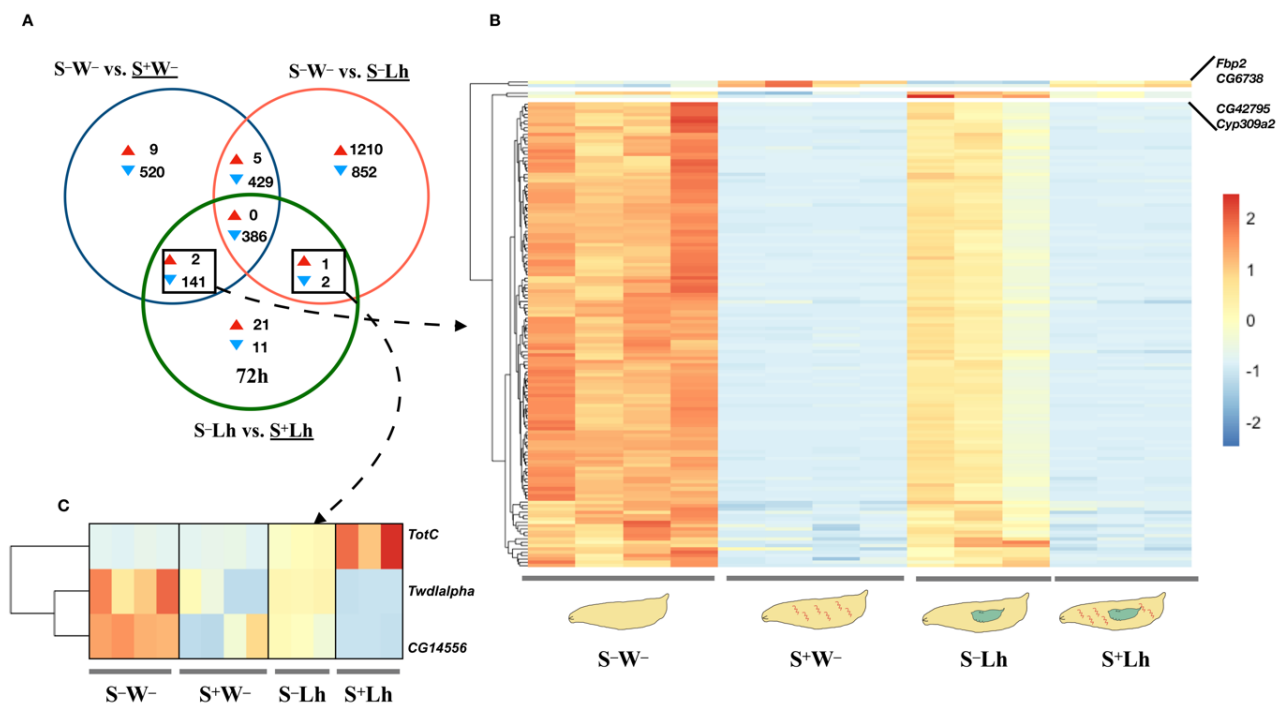
Algunos de los genes del grupo B, entre ellos *br*, *phm* y *fs* se sabe que se expresan en mayor nivel durante la transición de larva a pupa (Thurmond et al., 2019), *phm* participa en la vía de síntesis de la ecdisona, la principal hormona en insectos, esta hormona tiene un papel importante durante la metamorfosis (Warren et al., 2004). El gene *broad* (*br*) responde y regula la síntesis de ecdisona, *fs* también está involucrado en aspectos de desarrollo y su sobre expresión causa alteraciones morfológicas de la pupa (Pentek et al., 2009). La observada sub expresión de estos genes durante el parasitismo por *L. heterotoma* podría verse reflejado un retraso en el tiempo desarrollo de las larvas parasitadas. En apoyo a esta hipótesis, Schlenke et al., 2007, reportó una demora de hasta dos días en la pupación de larvas de *D. melanogaster* parasitadas por *L. heterotoma* o *L. bouvardi* (Schlenke et al., 2007). En este escenario la restauración en la expresión génica observada en algunos genes durante la presencia de *S. poulsonii* (S<sup>+</sup>Lh) (**Figura 14b**), podría “regresar” los tiempos de desarrollo a su estado normal. El uso de marcadores de desarrollo específicos, así como una sincronización experimental serían necesarios para comprobar esta hipótesis. En el grupo A, se identificaron cuatro genes. Sin embargo, sus anotaciones ofrecen pocos indicios sobre su posible contribución, (si es que la tienen), al mecanismo de protección. Dos de estos genes (*CG18649* y *CG44215*) no tienen anotación, otro de ellos está relacionado con la familia de citocromo P450 (*Cyp4d14*) y el producto del último (*CG42494*) tiene dominio de unión a quitina. Citocromo P450 son una familia de proteínas que participan en aspectos de detoxificación pero también en desarrollo (Chung et al., 2009).

Si el gen *CG18649* relacionado con la familia de citocromo P450 estuviera involucrado en la protección en contra de la avispa, como por ejemplo degradando algún componente tóxico, se podría esperar una sobre expresión durante la interacción *S. poulsonii-L. heterotoma*, lo que es diferente a lo observado

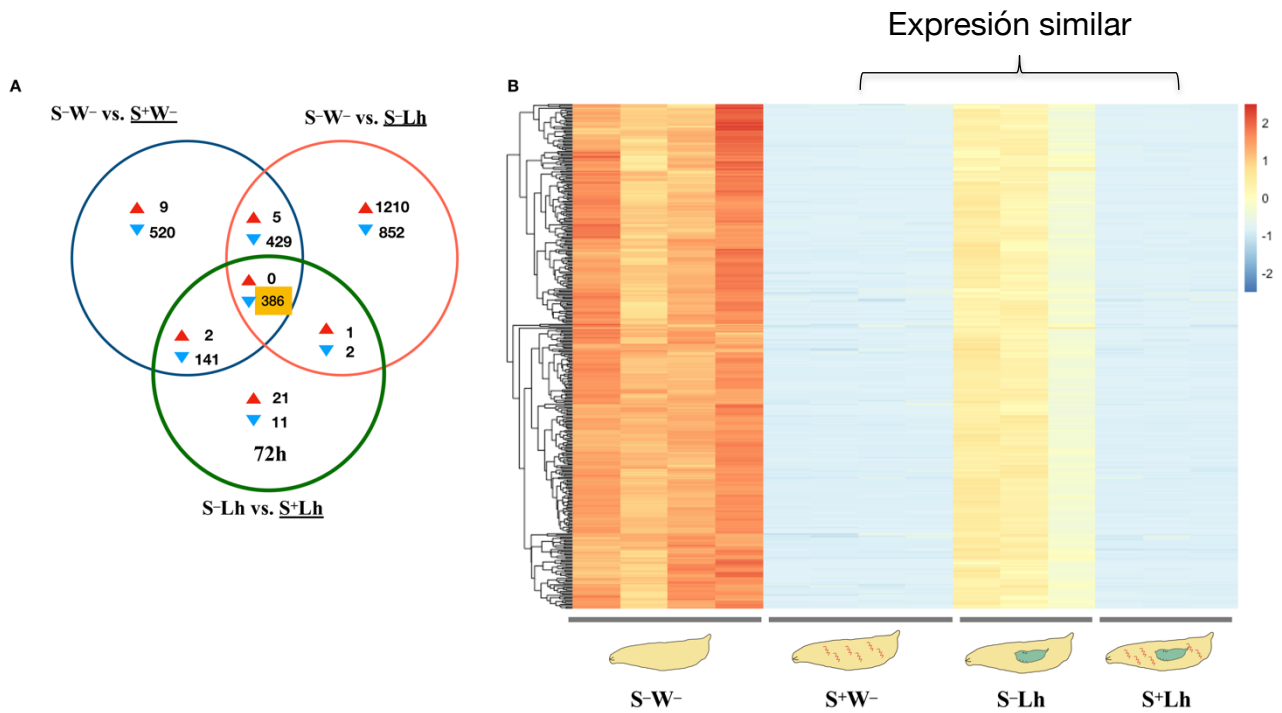
Por otro lado, es llamativa la sobre expresión de *TotC* y *Fbp2* ya que ambos podrían contribuir a tolerar el parasitismo. La familia de genes *Tot*, se caracteriza por su respuesta a condiciones de stress. Otro gen de esta familia (*TotA*), aunque también sobre expresado, estuvo ligeramente por arriba del filtro de corte, (FDR=0.053). Se ha visto que la sobreexpresión de *TotA* en *D. melanogaster* confiere resistencia a altas temperaturas (Ekengren et al., 2001). El producto del gen *fbp2* por su parte, aunque no caracterizado funcionalmente, se predice que es una fuente de reserva de azufre, dado su alto contenido de metioninas (Meghlaoui and Veuille, 1997).

Para determinar la relevancia de los genes identificados en este trabajo durante la interacción *S. poulsonii-Drosophila-L. heterotoma*, se podría inducir su sobre expresión o inhibición en ausencia de *S. poulsonii*. Se esperaría que esto tuviera un efecto en la supervivencia de la mosca y/o muerte del parasitoide. Un candidato para empezar sería *TotA*.

Los genes presentes en las intersecciones de los diagramas de Venn a las 72h post parasitismo, también se analizaron en busca de algún posible patrón de expresión. Sin embargo, todos estos genes parecen estar influenciados por la única presencia de *S. poulsonii*. Observar especialmente los tratamientos infectados únicamente con *S. poulsonii* ( $S^+W^-$ ) y aquellos infectados con *S. poulsonii* y parasitados por la avispa *L. heterotoma* ( $S^+Lh$ ).



**Figura 15. Análisis de los genes diferenciales durante la interacción *S. poulsonii*-*L. heterotoma* a las 72h post parasitismo. A)** Número de genes sobre expresados (triángulo rojo) o sub-expresados (triángulo azul) en las diferentes comparaciones. Tratamientos: larvas infectadas con *S. poulsonii* ( $S^+W^-$ ), sin *S. poulsonii* ( $S^-W^-$ ), parasitadas por *L. heterotoma* ( $S^-Lh$ ) y parasitadas por *L. heterotoma* e infectadas con *S. poulsonii* ( $S^+Lh$ ). **B)** Heatmap correspondiente a los 143 genes presentes en la intersección ( $S^-W^-$  vs.  $S^+W^-$ ) vs. ( $S^-Lh$  vs.  $S^+Lh$ ). **C)** Heatmap correspondiente a los 3 genes presentes en la intersección ( $S^-W^-$  vs.  $S^-Lh$ ) vs. ( $S^-Lh$  vs.  $S^+Lh$ ).



**Figura 16. Análisis de los genes diferenciales durante la interacción *S. poulsonii*-*L. heterotoma* a las 72h post parasitismo. A)** Número de genes sobre expresados (triángulo rojo) o sub expresados (triángulo azul) en las diferentes comparaciones. Tratamientos: larvas infectadas con *S. poulsonii* ( $S^+W^-$ ), sin *S. poulsonii* ( $S^-W^-$ ), parasitadas por *L. heterotoma* ( $S^-Lh$ ) y parasitadas e infectadas con *S. poulsonii* ( $S^+Lh$ ). **B)** Heatmap correspondiente a los 386 genes en la intersección principal.

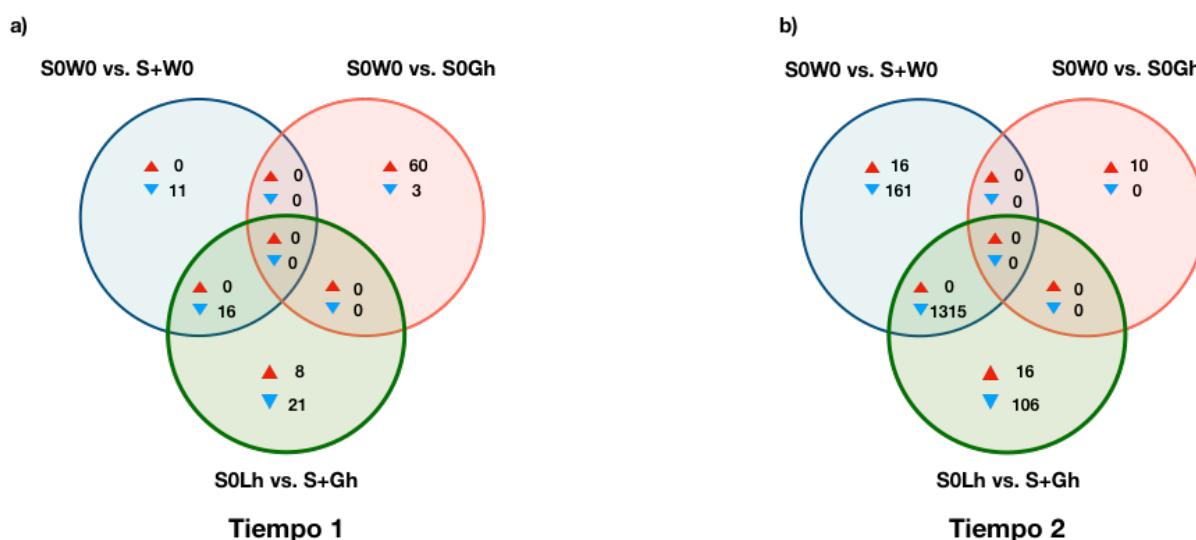
Los resultados anteriores no apoyan la hipótesis del incremento en la respuesta inmune durante la interacción *S. poulsonii* -*L. heterotoma*. Se sabe que la única infección por *S. poulsonii* no induce una respuesta inmune en *Drosophila*, (Hurst et al., 2003; Herren and Lemaitre, 2011), contrario a lo que se observa por infecciones de otras bacterias u hongos. Se piensa que la ausencia de pared celular en *S. poulsonii* evita su detección por parte del hospedero.

En un estudio previo, utilizando RNA-Seq, se evaluó la respuesta de *D. neotestacea* en presencia de un nematodo y *S. poulsonii*, cepa sNeo. En este modelo de estudio *S. poulsonii*, también protege a su hospedero de los efectos del nematodo. Similar a nuestros resultados, los autores no detectaron una activación de la respuesta inmune del hospedero durante la interacción nematodo- *S. poulsonii* (Hamilton et al., 2014). Lo anterior sugiere que la protección de *S. poulsonii* en contra de parásitos puede no estar mediada por la activación de la respuesta inmune del hospedero al menos detectable mediante el uso de transcriptomas. Dado lo anterior es relevante estudiar la contribución del simbiote durante el parasitismo.

## Efecto de *S. poulsonii* en el parasitismo por *Ganaspis sp*

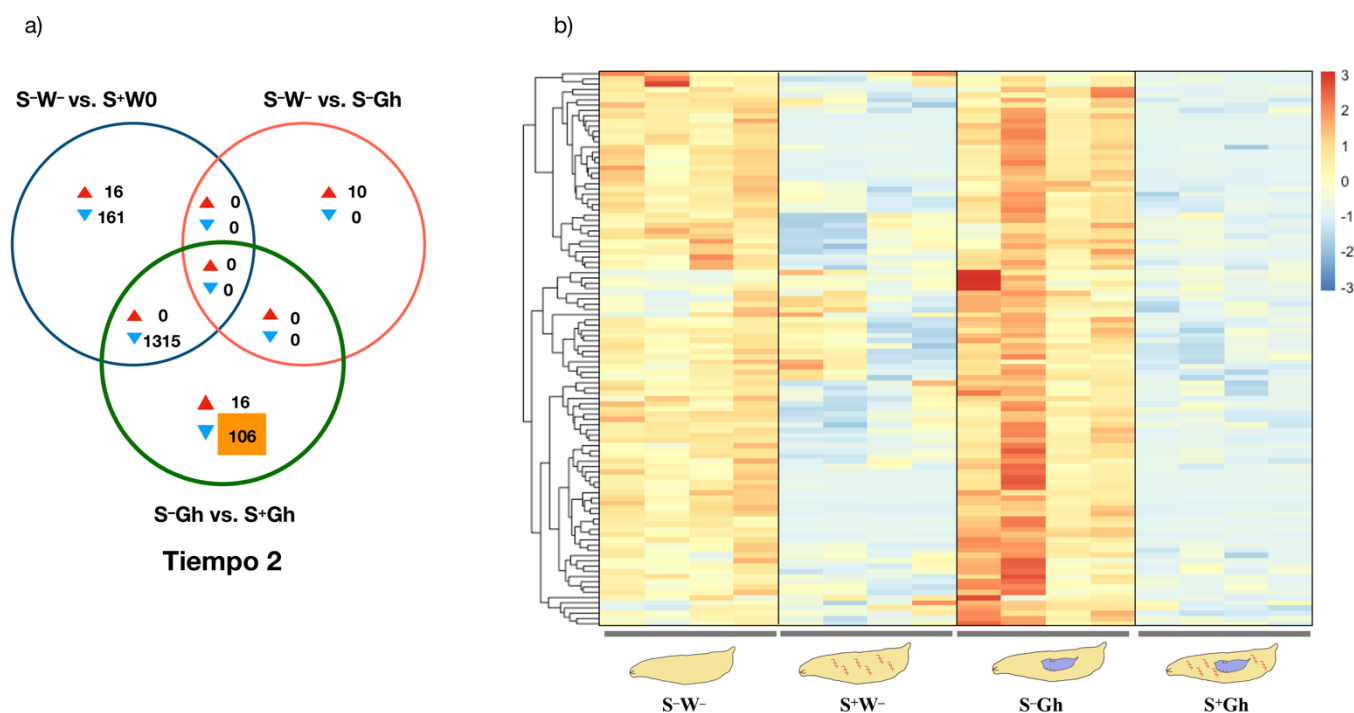
Siguiendo la metodología de exclusión y selección de genes realizada con *L. heterotoma*, se determinaron los genes exclusivos a la interacción *S. poulsonii*-*Ganaspis sp*. En esta interacción, la presencia de *S. poulsonii* no afecta el desarrollo de *Ganaspis sp*, por lo que se esperaba detectar un reducido número de genes diferenciales.

En el primer tiempo post parasitismo (24 h) se detectaron 8 genes sobre-expresados y 21 sub-expresados (**Figura 17a, círculo verde**) únicos a la interacción *S. poulsonii*-*Ganaspis sp*., Entre los genes sub expresados están cinco ARN pequeños no codificantes. En el tiempo 2 (72h post parasitismo), 16 genes estuvieron sobre-expresados y 106 sub-expresados (**Figura 17b, círculo verde**). En ambos tiempos ninguno de los genes diferenciales se agrupó en alguna categoría funcional.



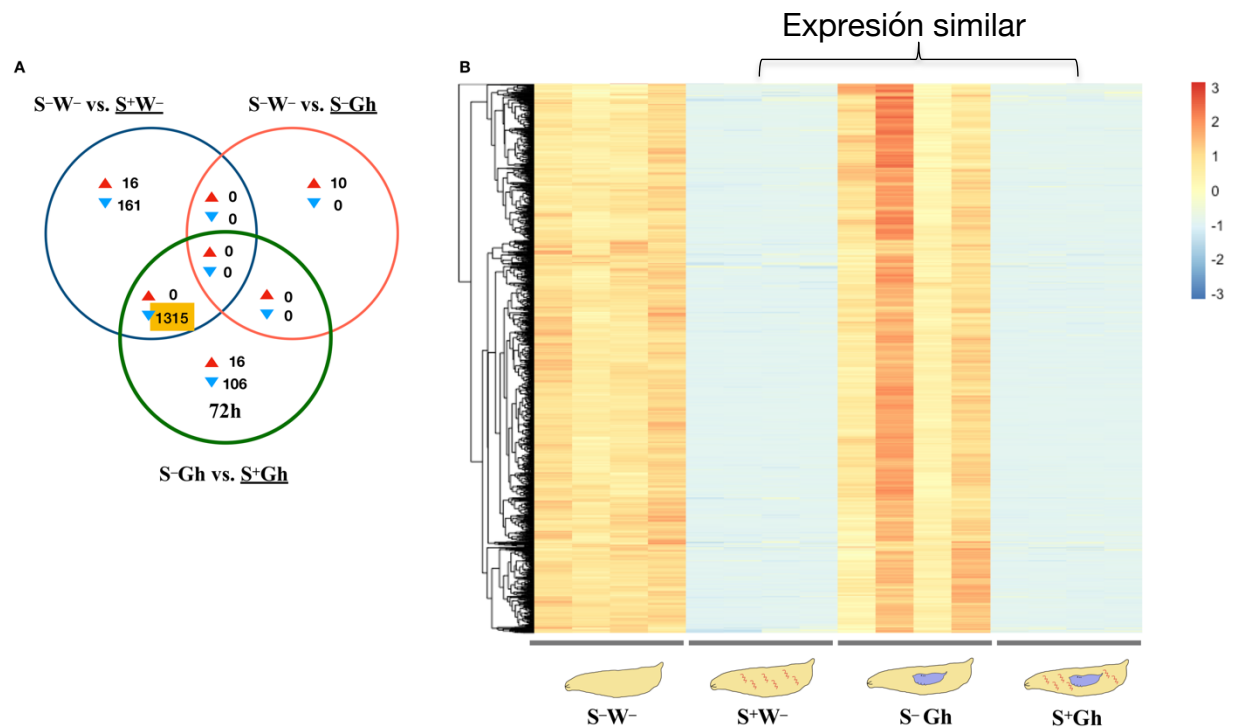
**Figura 17. Diagramas de Venn de los genes expresados diferencialmente durante el parasitismo por *Ganaspis sp*.** a las 24 horas (a) o 72 horas (b), post parasitismo. Los genes exclusivos a la interacción *Ganaspis sp*-*S. poulsonii* se muestran en el círculo verde. Los triángulos en rojo indican sobre expresión y los azules sub expresión. S<sup>-</sup> = Ausencia de *S. poulsonii*, S<sup>+</sup> = Presencia de *S. poulsonii*, Gh= *Ganaspis sp*. y W<sup>-</sup> = Ausencia de parasitismo.

Un mapa de calor (heatmap) de los 106 genes sub expresados a las 72 horas post parasitismo (**Figura 18b**), reveló que estos genes más que exclusivos a la interacción *S. poulsonii*-*Ganaspis* sp., parecen estar influenciados por la única presencia de *Spiroplasma*. Los valores de expresión de los dos tratamientos infectados con *S. poulsonii* ( $S^+W^-$  y  $S^+Gh$ ) tienen patrones de expresión similar (**Figura18b**). Adicionalmente, la expresión de 74 de los 106 genes está reportada como enriquecida en testículos de adulto (**Archivo S2**) Ambas observaciones sugieren que la respuesta de estos genes está más relacionada con la presencia de *S. poulsonii* que a la interacción con la avispa.



**Figura 18. Patrones de expresión de genes sub expresados únicos a la interacción *S. poulsonii* -*Ganaspis* sp.** a) Diagrama de Venn resaltando los 106 genes sub expresados en la comparación  $S^-Gh$  vs.  $S^+Gh$ . b) Mapa de calor de los valores de expresión (TMM valores), de los 106 genes sub expresados en diferentes tratamientos.  $S^-$  = Ausencia de *S. poulsonii*,  $S^+$  = Presencia de *S. poulsonii*, Gh= *Ganaspis* sp. y  $W^-$  = Ausencia de parasitismo.

Respecto a los 1315 genes presentes en la única de las intersecciones que contiene genes (**Figura19A**), sus patrones de expresión también indican que están influenciados por la única presencia de *Spiroplasma* (**Figura19B**), notar los patrones de expresión entre los tratamientos infectados únicamente con *S. poulsonii* ( $S^+W^-$ ) y aquellos infectados por *S. poulsonii* y parasitados por *Ganaspis* sp ( $S^+Gh$ ).



**Figura 19. Análisis de los genes diferenciales durante la interacción *S. poulsonii*-*Ganaspis* sp a las 72h post parasitismo.** A) Número de genes sobre expresados (triángulo rojo) o sub expresados (triángulo azul) en las diferentes comparaciones. Tratamientos; larvas infectadas con *S. poulsonii* ( $S^+W^-$ ), sin *S. poulsonii* ( $S^-W^-$ ), parasitadas por *Ganaspis* sp ( $S^-Gh$ ) y parasitadas e infectadas con *S. poulsonii* ( $S^+Gh$ ). B) Mapa de calor (heatmap) correspondiente a los 1315 genes en la comparación ( $S^-W^-$  vs.  $S^+W^-$ ) vs. ( $S^-Gh$  vs  $S^+Gh$ ).



### SECCIÓN 3: Expresión de genes de *S. poulsonii* durante el parasitismo

La generación de las bibliotecas de RNA-seq de este trabajo no incluyó un paso de enriquecimiento por poli-A. La ausencia de este enriquecimiento fue con la intención de capturar secuencias de *Spiroplasma*. Esta metodología, aunque utilizada en otros transcriptomas, enfrenta el mismo reto, que está relacionado con la sobre representación de secuencias del hospedero en relación con el simbiote. Como se mostró anteriormente (**Figura 3**), el número de secuencias recuperadas para *Spiroplasma* estuvo un rango de 1390-17826. Se ha estimado que un número de 3-4 millones de secuencias por réplica es el mínimo para detectar expresión diferencial en bacterias (Haas et al., 2012). A pesar de no contar con ese número mínimo, se realizaron los análisis de expresión diferencial, pero no detectamos genes expresados diferencialmente.

*S. poulsonii* tiene un genoma pequeño, pero aún así conserva la habilidad de modular su expresión génica de acuerdo al ambiente. Esto se observó al analizar transcriptomas de *S. poulsonii* proveniente de cultivo versus una muestra de *Spiroplasma* proveniente de hemolinfa de adulto de *D. melanogaster* (Masson et al., 2018). En nuestro estudio, la ausencia de expresión diferencial podría deberse al bajo número de secuencias recuperadas.

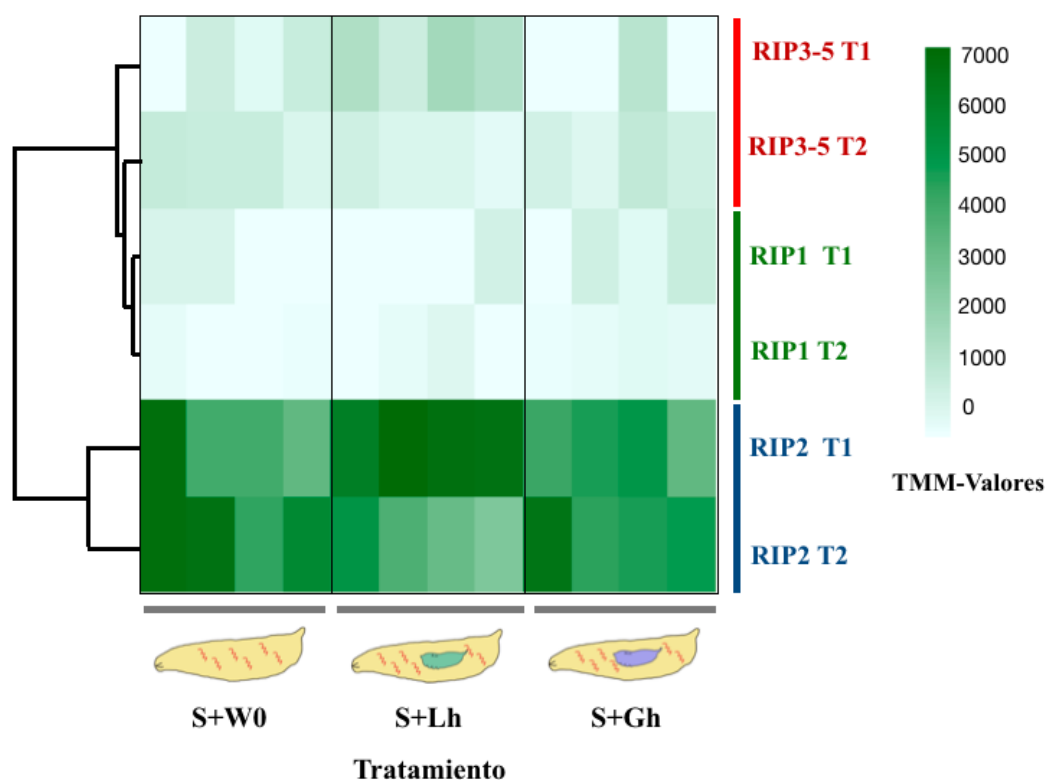
Al analizar transcriptomas se busca detectar expresión diferencial, sin embargo, la expresión constitutiva de un gen también puede ser relevante para entender la interacción del simbiote con su hospedero. En la **Figura 20** se muestran los diez genes de *S. poulsonii* con mayor expresión a las 72h. Adicionalmente se incluyen los cinco genes codificantes para toxinas RIP.

Entre los genes más expresados estuvo un tmRNA, también conocido como Ssr ARN, que tiene funciones tanto de tRNA como de mRNA, cuya función es “rescatar” ribosomas cuya traducción está detenida (Janssen and Hayes, 2012). El segundo lugar corresponde al gen codificante para la proteína Spiralina, que se encuentra en la membrana celular. En *S. citri* Spiralina representa el 25-30% de la masa total de proteínas, y es necesaria para la transmisión de este *Spiroplasma* por el saltamontes a su planta hospedera (Duret et al., 2003).



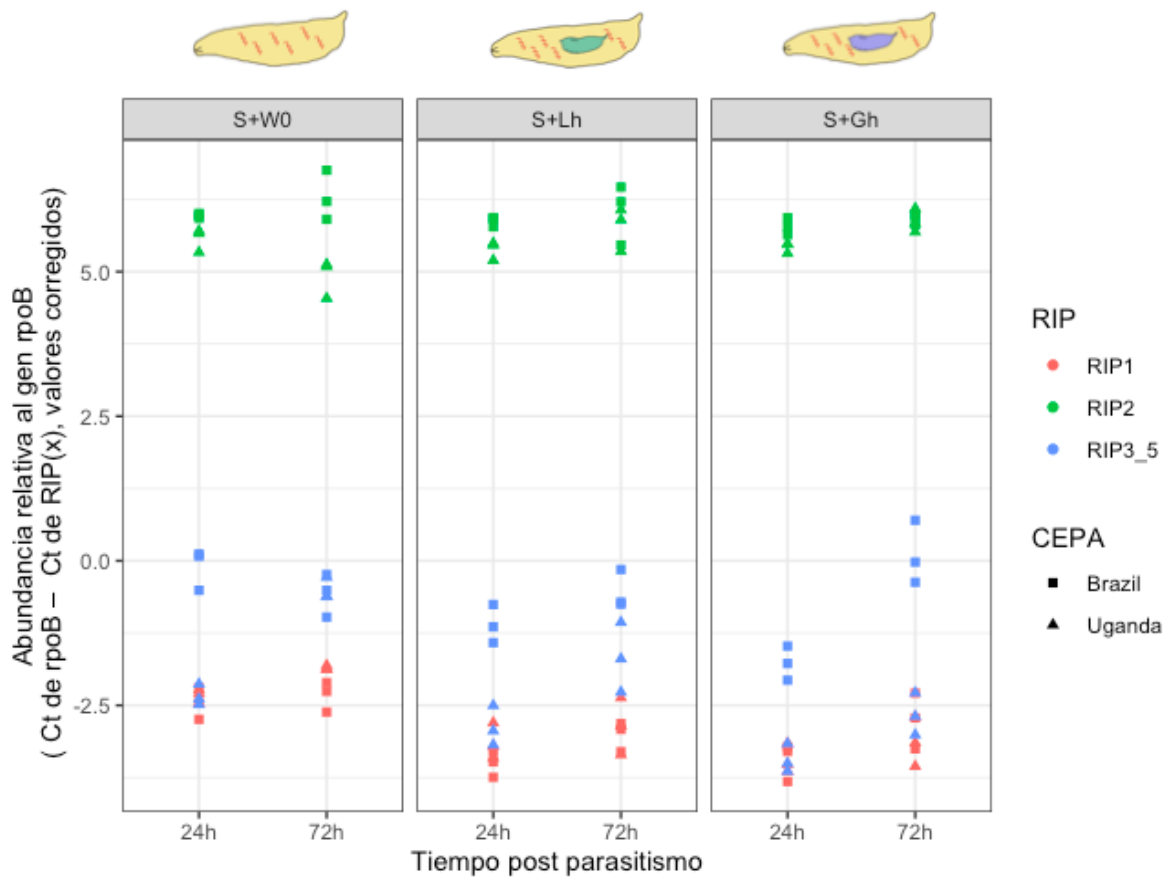
**Figura 20. Valores de expresión de los genes más expresados de *S. poulsonii* a las 72h post parasitismo.** Adicionalmente se muestra la expresión para los cinco genes codificantes para toxinas RIP. S+ = Presencia de *S. poulsonii*, Gh= *Ganaspis sp.*, Lh = *L. heterotoma* y W-= Ausencia de parasitismo.

Debido a la relevancia de los genes RIP, (Ballinger and Perlman, 2017), se evaluó la expresión de estos cinco genes (**Figura 21**). De los cinco genes, el gen codificante para la proteína RIP2 tuvo los mayores valores de expresión, en comparación con los otros cuatro genes RIP (**Figura 21**). Este primer acercamiento sugirió que RIP2 se expresa en ausencia de parasitismo.



**Figura 21. Valores de expresión del transcriptoma para los cinco genes codificantes para toxinas RIP en *S. poulsonii*.** En tratamientos infectados con *S. poulsonii* (S+W0), *S. poulsonii* -*L. heterotoma* (S+Lh) y *S. poulsonii*-*Ganaspis sp* (S+Gh), a las 24 (T1) o 72 h (T2), post parasitismo. Los valores para RIP 3-5 fueron sumados debido a que presentan la misma secuencia nucleotídica. Los valores representan las cuentas normalizadas (Valores TMM), generados en edgeR.

Un análisis de RT-qPCR (**Figura 22**), corroboró los resultados observados en el meta-transcriptoma. El gen codificante para RIP2 es el más expresado independiente del parasitismo por *L. heterotoma* o *Ganaspis sp*. Adicionalmente, se analizó la expresión de los genes RIP en las dos cepas de *Spiroplasma*, presentando un comportamiento similar.



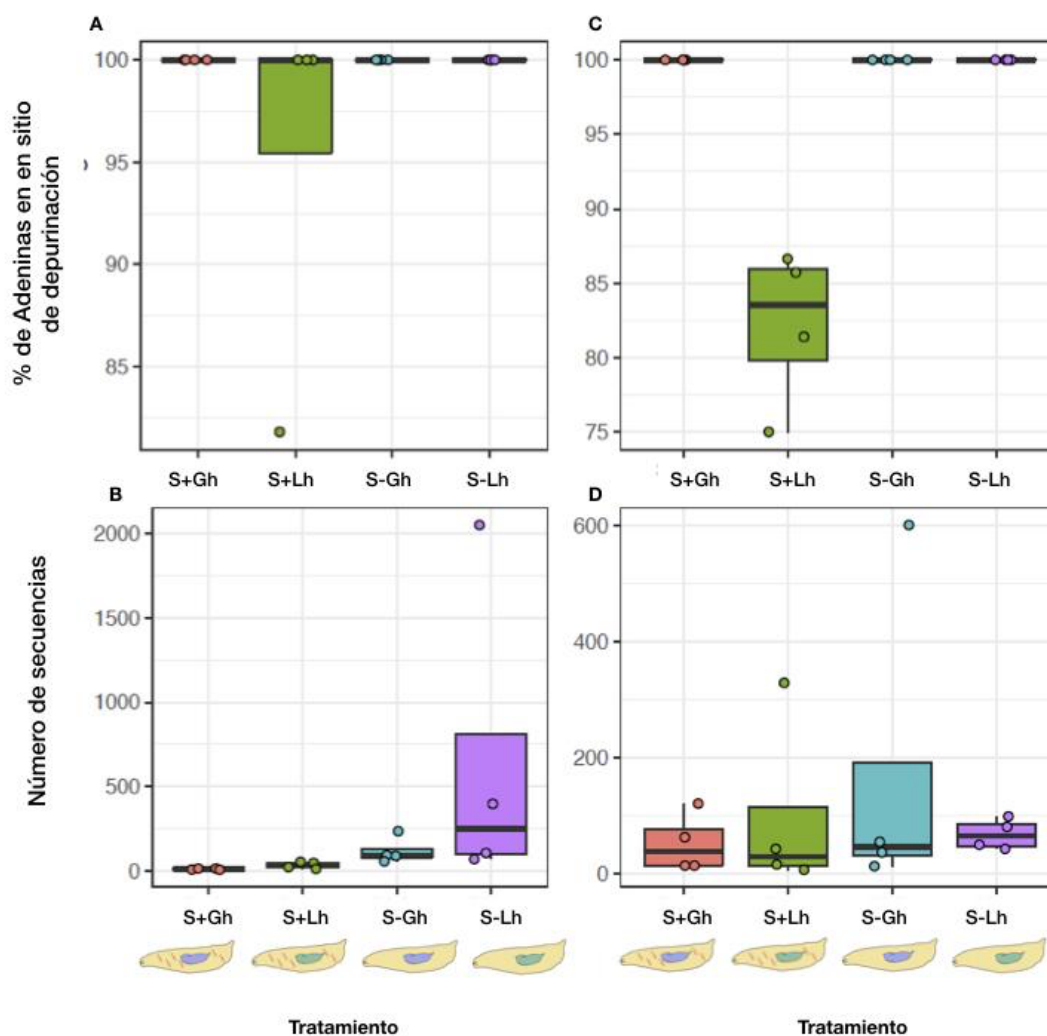
**Figura 22. Valores de expresión de los cinco genes codificantes para toxinas RIP presentes en *S. poulsonii* (sMel Uganda y Brasil), a las 24 y 72 horas post parasitismo.** Se evaluó su expresión en ausencia de parasitismo (S+W-), durante el parasitismo por *L. heterotoma* (S+Lh) o por *Ganaspis sp* (S+Gh).

Recientemente se reportó que los genes codificantes para RIP1 y RIP2 tuvieron mayor expresión en muestras de hemolinfa versus *S. poulsonii* proveniente de un cultivo en medio líquido (Masson et al., 2018). Otro estudio reveló que la expresión ectópica de RIP1 es letal para *D. melanogaster* (Garcia-Arrea et al., 2019). Lo anterior sugiere que RIP debe estar bajo algún tipo de regulación para evitar afectar a su hospedero. La expresión constitutiva de RIP2, podría representar una estrategia de *S. poulsonii* a de estar “siempre preparado” para defender a la mosca en contra de los parasitoides.

La expresión de los genes RIP en presencia de la avispa resistente (*Ganaspis sp*), descarta al menos a nivel de mRNA algún posible mecanismo de inhibición de RIP por parte de esta avispa, por lo tanto la regulación de RIP no parece ser responsable de su resistencia a *S. poulsonii*. En futuros experimentos se podría evaluar la expresión de RIP durante el parasitismo por otras especies de avispas.

## Efectos de RIP en secuencias ribosomales de avispas

La actividad enzimática de RIP se ha evaluado en secuencias obtenidas de meta transcriptomas en el caso de nématodo y mediante ensayos directos (PCR) en el caso de avispa y nématodo (ver materiales y métodos). En nuestros datos se encontraron señales de depuración en secuencias ribosomales de *L. heterotoma*, pero no en *Ganaspis sp* (Figura 23, Tabla S2).



**Figura 23. Depuración en secuencias del 28S ribosomal de avispas.** Un porcentaje menor de adeninas es indicativo de depuración. Se evaluaron tratamientos en presencia de *S. poulsonii*-*Ganaspis sp.*, (S<sup>+</sup>Gh) o *S. poulsonii* -*L. heterotoma* (S<sup>+</sup>Lh). En ausencia de *S. poulsonii* y parasitados por *L. heterotoma* (S<sup>-</sup>Lh). Ausencia de *S. poulsonii* y parasitados por *Ganaspis sp.*, (S<sup>-</sup>Gh). (A-B) Porcentajes de adeninas y número de secuencias que alinearon al 28S rRNA de cada avispa en el tiempo 1. (C-D) Porcentajes de adeninas y número de secuencias que alinearon al 28S rRNA de cada avispa en el tiempo 2

Se ha reportado depurinación en secuencias ribosomales de las avispas *L. heterotoma* y *L. boulardii*, no así en la avispa *Pachycrepoideus vindemmiae* que se sabe es resistente a *S. poulsonii* (Ballinger and Perlman, 2017). Lo anterior más nuestra observación sugiere que la resistencia a *Spiroplasma* podría estar relacionada con ausencia de depurinación. Por otro lado, la depurinación y su efecto en la inhibición de síntesis de proteínas podría ser el responsable de la muerte de las avispas susceptibles. Adicionalmente, se ha reportado que las proteínas RIP inducen apoptosis (Narayanan et al., 2005), por lo que este pudiera ser el mecanismo por el que mueren las avispas.

Una de las hipótesis para explicar la ausencia de depurinación por RIP es una posible degradación (proteólisis) de la proteína por parte de las avispas resistentes. Se ha reportado la degradación de dos proteínas RIP de plantas (ricina y saporina) al incubarlas junto con extractos intestinales de dos especies de lepidópteros resistentes a estas toxinas. Esta degradación no ocurrió en presencia de extractos intestinales de dos escarabajos susceptibles a las toxinas (Gatehouse et al., 1990). Otra hipótesis es que la resistencia a RIP se debe a su inhabilidad para entrar en las células de las avispas resistentes. Ambas hipótesis no han sido evaluadas por lo que representan nuevas oportunidades de investigación.

## 6.0 CONCLUSIONES

En este trabajo mediante RNA-seq se evaluó la interacción *D. melanogaster*-avispa y *D. melanogaster* -*S. poulsonii*-avispa. Con la finalidad de ahondar en el mecanismo de protección de *S. poulsonii* se evaluó la respuesta transcripcional de *D. melanogaster* hacia una avispa susceptible (*L. heterotoma*) y otra resistente (*Ganaspis* sp.) a *S. poulsonii*. Los resultados obtenidos en la presente investigación son:

- El parasitismo por las avispas *L. heterotoma* y *Ganaspis* sp., induce una expresión diferencial de genes en *Drosophila*. El parasitismo por *L. heterotoma* no indujo una respuesta inmune, aunque parece afectar el proceso de espermatogénesis y aspectos relacionados a la producción de energía. El parasitismo por *Ganaspis* sp., si indujo una respuesta inmune en su hospedero, determinado por la sobre expresión de genes presentes en la vía Jack/Stat, sin embargo, esta respuesta no es eficiente ya que el parasitismo de esta avispa es muy exitoso.
- En contexto de la interacción *D. melanogaster*-*S. poulsonii*-avispa, no se encontró evidencia que apoye la hipótesis de inducción del sistema inmune durante la interacción *S. poulsonii*-*L. heterotoma*. Posiblemente otros mecanismos no relacionados con *Drosophila*, pueden estar involucrados en la muerte de esta avispa.
- Los genes de *S. poulsonii* codificantes para las toxinas RIP se expresan constitutivamente, sin importar el estatus de parasitismo. El gen codificante para RIP2 fue el más expresado, por lo que pudiera ser el más relevante de los cinco en la interacción *S. poulsonii*-avispa.
- Se identificó evidencia de daño característicos por RIP únicamente en secuencias ribosomales de la avispa susceptible (*L. heterotoma*) pero no en la avispa resistente (*Ganaspis* sp.). La ausencia de daño ribosomal en *Ganaspis* sp., pudiera representar la causa de su resistencia a *S. poulsonii*.

## 7.0 PERSPECTIVAS

### En la interacción *D. melanogaster*-*L. heterotoma*

1. Determinar si la sub-expresión de los genes relacionados a gónadas durante el parasitismo por *L. heterotoma* tiene un efecto en estos órganos. En esta investigación se utilizó a la cepa de avispa LH14. Sin embargo, existen otras cepas de avispas. Se podría evaluar el efecto del parasitismo de otras cepas en el desarrollo de gónadas de *D. melanogaster*

### En la interacción *Drosophila*-*S. poulsonii*-*L. heterotoma*

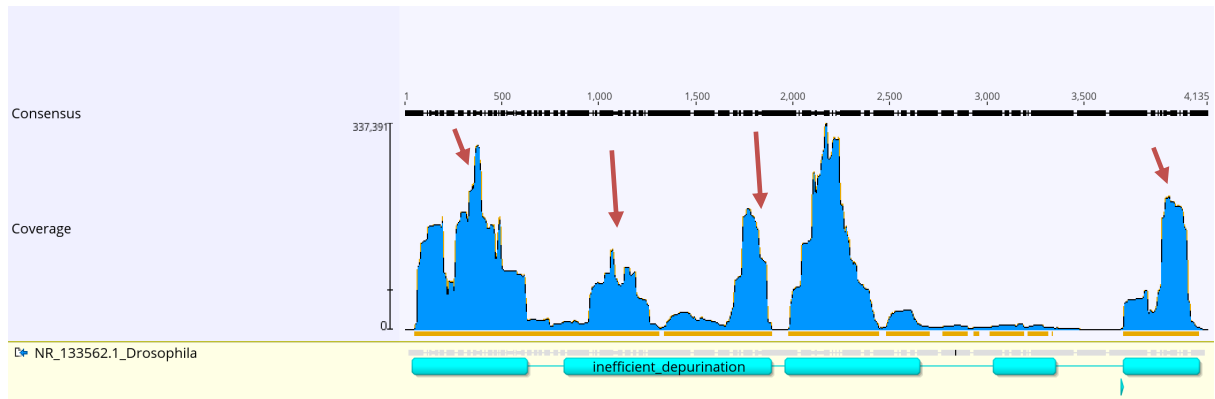
1. Inducir la sobre-expresión de algunos de los genes identificados como candidatos al mecanismo de protección en contra de *L. heterotoma*. Al recrear estas condiciones en ausencia del simbionte se puede determinar la contribución de estos genes en la protección.

### Sobre la contribución de *S. poulsonii* en la protección

1. Evaluar la depuración de secuencias ribosomales en otras especies de avispas resistentes a *S. poulsonii*
2. Realizar experimentos de proteómica en hemolinfa de larvas de *D. melanogaster* parasitadas por avispas susceptibles y resistentes y determinar las concentraciones de proteínas RIP
3. Expresar RIP2 en *D. melanogaster* en ausencia de *S. poulsonii* y determinar la supervivencia de las avispas.



## 8.0 MATERIAL SUPLEMENTARIO



**Figura S1. Representación gráfica de las secuencias del transcriptoma que alinearon al 28S rRNA de *D. melanogaster*.** Las flechas rojas señalan algunas regiones del gen en donde se presenta mayor cobertura respecto a otras regiones. Se muestra el resultado del programa geneious para una réplica del tratamiento no infectado con *S. poulsonii* ni parasitado por avispas S<sup>-</sup>W<sup>-</sup>.

## Archivo S1

Dieta para *D. melanogaster* con base en harina de maíz. Ingredientes para preparar un litro.

1L	Agua destilada
14.6g	Agar (Genesee Scientific Cat#66-103)
18.4g	Extracto de levadura (Genesee Scientific Cat#62-106)
33.0g	Extracto de maíz (Supermercado)
52.2	Azúcar (Supermercado)
2g	Tegosept (Ácido benzoico, p-hidroxi, metil ester, metilparabeno o nipagen, Genesee Scientific Cat#20-258)

1. Colocar el agua en una olla y ponerla al fuego a hasta punto de ebullición.
2. Agregar todos los ingredientes y mezclar por 15 minutos
3. Apagar la estufa
4. Distribuir la dieta en viales

Dieta "Opuntia Banana". Ingredientes para preparar un litro.

1L	Agua destilada
10g	Agar (Genesee Scientific Cat#66-103)
27.5g	Extracto de levadura (Genesee Scientific Cat#62-106)
47.5g	Jarabe de maíz (Supermercado)
30g	Malta (Genesee Scientific Cat#62-111)
137.5g	Plátanos (Supermercado)
2.125g	Polvo de nopal
2g	Tegosept (Ácido benzoico, p-hidroxi, metil ester, metilparabeno o nipagen, Genesee Scientific Cat#20-258)

1. Colocar el agua en una olla y ponerla al fuego a hasta punto de ebullición.
2. Colocar los plátanos, polvo de nopal y malta en la licuadora
3. Agregar la mezcla al agua hirviendo
4. Agregar el resto de los ingredientes
5. Apagar la estufa
6. Distribuir la dieta en viales.



**Tabla S2.** Valores de depurinación en secuencias del 28S ARNr de las avispas *L. heterotoma* y *Ganaspis sp*

Tratamiento	# de réplica	Avispa	Secuencias totales	Adenina	Otra base	% adeninas	Tiempo
S <sup>+</sup> Lh	1	<i>L. heterotoma</i>	7	6	1	85.71428571	72h
S <sup>+</sup> Lh	2	<i>L. heterotoma</i>	43	35	8	81.39534884	72h
S <sup>+</sup> Lh	3	<i>L. heterotoma</i>	16	12	4	75	72h
S <sup>+</sup> Lh	4	<i>L. heterotoma</i>	329	285	44	86.6261398	72h
S <sup>-</sup> Lh	1	<i>L. heterotoma</i>	99	99	0	100	72h
S <sup>-</sup> Lh	2	<i>L. heterotoma</i>	81	81	0	100	72h
S <sup>-</sup> Lh	3	<i>L. heterotoma</i>	50	50	0	100	72h
S <sup>-</sup> Lh	4	<i>L. heterotoma</i>	43	43	0	100	72h
S <sup>+</sup> Gh	1	<i>Ganaspis sp</i>	121	121	0	100	72h
S <sup>+</sup> Gh	2	<i>Ganaspis sp</i>	63	63	0	100	72h
S <sup>+</sup> Gh	3	<i>Ganaspis sp</i>	14	14	0	100	72h
S <sup>+</sup> Gh	4	<i>Ganaspis sp</i>	14	14	0	100	72h
S <sup>-</sup> Gh	1	<i>Ganaspis sp</i>	37	37	0	100	72h
S <sup>-</sup> Gh	2	<i>Ganaspis sp</i>	13	13	0	100	72h
S <sup>-</sup> Gh	3	<i>Ganaspis sp</i>	55	55	0	100	72h
S <sup>-</sup> Gh	4	<i>Ganaspis sp</i>	601	601	0	100	72h
S <sup>+</sup> Lh	1	<i>L. heterotoma</i>	21	21	0	100	24h
S <sup>+</sup> Lh	2	<i>L. heterotoma</i>	47	47	0	100	24h
S <sup>+</sup> Lh	3	<i>L. heterotoma</i>	53	53	0	100	24h
S <sup>+</sup> Lh	4	<i>L. heterotoma</i>	11	9	2	81.8181818	24h
S <sup>-</sup> Lh	1	<i>L. heterotoma</i>	2052	2051	1	100	24h
S <sup>-</sup> Lh	2	<i>L. heterotoma</i>	69	69	0	100	24h
S <sup>-</sup> Lh	3	<i>L. heterotoma</i>	397	397	0	100	24h
S <sup>-</sup> Lh	4	<i>L. heterotoma</i>	106	106	0	100	24h
S <sup>+</sup> Gh	1	<i>Ganaspis sp</i>	7	7	0	100	24h
S <sup>+</sup> Gh	2	<i>Ganaspis sp</i>	13	13	0	100	24h
S <sup>+</sup> Gh	3	<i>Ganaspis sp</i>	13	13	0	100	24h
S <sup>+</sup> Gh	4	<i>Ganaspis sp</i>	6	6	0	100	24h
S <sup>-</sup> Gh	1	<i>Ganaspis sp</i>	88	88	0	100	24h
S <sup>-</sup> Gh	2	<i>Ganaspis sp</i>	235	235	0	100	24h
S <sup>-</sup> Gh	3	<i>Ganaspis sp</i>	92	92	0	100	24h
S <sup>-</sup> Gh	4	<i>Ganaspis sp</i>	56	56	0	100	24h

<b>Tabla S3</b> Valores de depurinación en el 28S ARNr de <i>Drosophila melanogaster</i>						
<b>Tratamiento</b>	<b>Número de réplica</b>	<b>Secuencias Totales</b>	<b>Adeninas</b>	<b>Otras bases</b>	<b>% adeninas</b>	<b>Tiempo</b>
S <sup>+</sup> W <sup>-</sup>	1	5872	5865	7	99.88079019	24h
S <sup>+</sup> W <sup>-</sup>	2	1375	1370	5	99.63636364	24h
S <sup>+</sup> W <sup>-</sup>	3	1952	1951	1	99.94877049	24h
S <sup>+</sup> W <sup>-</sup>	4	5721	5713	8	99.86016431	24h
S <sup>-</sup> W <sup>-</sup>	1	14443	14435	8	99.94460985	24h
S <sup>-</sup> W <sup>-</sup>	2	18818	18795	23	99.8777766	24h
S <sup>-</sup> W <sup>-</sup>	3	8444	8432	12	99.85788726	24h
S <sup>-</sup> W <sup>-</sup>	4	10381	10371	10	99.90367017	24h
S <sup>+</sup> W <sup>-</sup>	1	5438	5435	3	99.94483266	72h
S <sup>+</sup> W <sup>-</sup>	2	3225	3220	5	99.84496124	72h
S <sup>+</sup> W <sup>-</sup>	3	1379	1377	2	99.85496737	72h
S <sup>+</sup> W <sup>-</sup>	4	2558	2553	5	99.80453479	72h
S <sup>-</sup> W <sup>-</sup>	1	3081	3081	0	100	72h
S <sup>-</sup> W <sup>-</sup>	2	2502	2502	0	100	72h
S <sup>-</sup> W <sup>-</sup>	3	1429	1428	1	99.93002099	72h
S <sup>-</sup> W <sup>-</sup>	4	2156	2155	1	99.95361781	72h

## 9.0 REFERENCIAS

- Agaisse, H., and Perrimon, N. (2004). The roles of JAK/STAT signaling in *Drosophila* immune responses. *Immunol. Rev.* 198, 72–82. doi:10.1111/j.0105-2896.2004.0133.x.
- Anderl I, Vesala L, Ihalainen TO. 2016. Transdifferentiation and Proliferation in Two Distinct Hemocyte Lineages in *Drosophila melanogaster* Larvae after Wasp Infection. :1–34. DOI: 10.1371/journal.ppat.1005746.
- Ballinger, M. J., Gawryluk, R. M. R., and Perlman, S. J. (2019). Toxin and genome evolution in a *Drosophila* defensive symbiosis. *Genome Biol. Evol.* 11, 253–262. doi:10.1093/gbe/evy272.
- Ballinger, M. J., Moore, L. D., and Perlman, S. J. (2018). Evolution and diversity of inherited *Spiroplasma* symbionts in *Myrmica* ants. *Appl. Environ. Microbiol.* 84, 1–14. doi:10.1128/AEM.02299-17.
- Ballinger, M. J., and Perlman, S. J. (2017). Generality of toxins in defensive symbiosis: Ribosome-inactivating proteins and defense against parasitic wasps in *Drosophila*. *PLoS Pathog.* 13, 1–19. doi:10.1371/journal.ppat.1006431.
- Beckage, N. E., and Gelman, D. B. (2004). Wasp Parasitoid Disruption of Host Development: Implications for New Biologically Based Strategies for Insect Control. *Annu. Rev. Entomol.* 49, 299–330. doi:10.1146/annurev.ento.49.061802.123324.
- Bennett, G. M., and Moran, N. a. (2013). Small, smaller, smallest: The origins and evolution of ancient dual symbioses in a phloem-feeding insect. *Genome Biol. Evol.* 5, 1675–1688. doi:10.1093/gbe/evt118.
- Binetruy, F., Bailly, X., Chevillon, C., Martin, O. Y., Bernasconi, M. V., and Duron, O. (2019). Phylogenetics of the *Spiroplasma ixodetis* endosymbiont reveals past transfers between ticks and other arthropods. *Ticks Tick. Borne. Dis.* 10, 575–584. doi:10.1016/j.ttbdis.2019.02.001.
- Bolaños, L. M., Servin-Garciduenas, L. E., and Martinez-Romero, E. (2015). Arthropod-*Spiroplasma* relationship in the genomic era. *FEMS Microbiol Ecol* 91, 1–8. doi:10.1093/femsec/fiu008.
- Bolger, A. M., Lohse, M., and Usadel, B. (2014). Trimmomatic: A flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics* 30, 2114–2120. doi:10.1093/bioinformatics/btu170.
- Brandt, J. W., Chevignon, G., Oliver, K. M., and Strand, M. R. (2017). Culture of an aphid heritable symbiont demonstrates its direct role in defence against parasitoids. *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.* 284. doi:10.1098/rspb.2017.1925.
- Bray, N. L., Pimentel, H., Melsted, P., and Pachter, L. (2016). Near-optimal probabilistic RNA-seq quantification. *Nat. Biotechnol.* 34, 525–527. doi:10.1038/nbt.3519.
- Caragata, E. P., Rancés, E., Hedges, L. M., Gofton, A. W., Johnson, K. N., O'Neill, S. L., et al. (2013). Dietary Cholesterol Modulates Pathogen Blocking by *Wolbachia*. *PLoS Pathog.* 9. doi:10.1371/journal.ppat.1003459.
- Carton, Y., Poirié, M., and Nappi, A. J. (2008). Insect immune resistance to parasitoids. *Insect Sci.* 15, 67–87. doi:10.1111/j.1744-7917.2008.00188.x.
- Cheng, B., Kuppanda, N., Aldrich, J. C., Akbari, O. S., and Ferree, P. M. (2016). Male-killing *Spiroplasma* alters behavior of the dosage compensation complex during *drosophila melanogaster* embryogenesis. *Curr. Biol.* 26, 1339–1345.

- doi:10.1016/j.cub.2016.03.050.
- Chung H, Sztal T, Pasricha S, Sridhar M, Batterham P, Daborn PJ. 2009. Characterization of *Drosophila melanogaster* cytochrome P450 genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106:5731–5736. DOI: 10.1073/pnas.0812141106.
- Cisak, E., Wójcik-Fatla, A., Zając, V., Sawczyn, A., Sroka, J., and Dutkiewicz, J. (2015). Spiroplasma - An emerging arthropod-borne pathogen? *Ann. Agric. Environ. Med.* doi:10.5604/12321966.1185758.
- Clark, T. B., Whitcomb, R. F., and Tully, J. G. (1982). Spiroplasmas from coleopterous insects: New ecological dimensions. *Microb. Ecol.* 8, 401–409. doi:10.1007/BF02010678.
- Deleo, D. M., Pérez-Moreno, J. L., Vázquez-Miranda, H., and Bracken-Grissom, H. D. (2018). RNA profile diversity across arthropoda: Guidelines, methodological artifacts, and expected outcomes. *Biol. Methods Protoc.* 3, 1–10. doi:10.1093/biomethods/bpy012.
- Dolezal, T., Krejcova, G., Bajgar, A., Nedbalova, P., and Strasser, P. (2019). Molecular regulations of metabolism during immune response in insects. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 109, 31–42. doi:10.1016/j.ibmb.2019.04.005.
- Dudzic, J. P., Kondo, S., Ueda, R., Bergman, C. M., and Lemaitre, B. (2015). *Drosophila* innate immunity: regional and functional specialization of prophenoloxidases. *BMC Biol.* 13, 81. doi:10.1186/s12915-015-0193-6.
- Duret, S., Berho, N., Danet, J. L., Garnier, M., and Renaudin, J. (2003). Spiralin Is Not Essential for Helicity, Motility, or Pathogenicity but Is Required for Efficient Transmission of *Spiroplasma citri* by Its Leafhopper Vector *Circulifer haematoceps*. *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 6225–6234. doi:10.1128/AEM.69.10.6225-6234.2003.
- Ekengren, S., and Hultmark, D. (2001). A family of Turandot-related genes in the humoral stress response of *Drosophila*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 284, 998–1003. doi:10.1006/bbrc.2001.5067.
- Ekengren, S., Tryselius, Y., Dushay, M. S., and Liu, G. (2001). A humoral stress response in *Drosophila* The ability to react to unfavorable environmental. *Curr. Biol.* 11, 714–718.
- Eleftherianos, L., Atri, J., Accetta, J., and Castillo, J. C. (2013). Endosymbiotic bacteria in insects: Guardians of the immune system? *Front. Physiol.* 4 MAR, 1–10. doi:10.3389/fphys.2013.00046.
- Fukatsu, T., Tsuchida, T., Nikoh, N., and Koga, R. (2001). Spiroplasma Symbiont of the Pea Aphid, *Acyrtosiphon pisum* (Insecta: Homoptera). *Appl. Environ. Microbiol.* 67, 1284–1291. doi:10.1128/AEM.67.3.1284-1291.2001.
- Garcia-Arreaez, M. G., Masson, F., Escobar, J. C. P., and Lemaitre, B. (2019). Functional analysis of RIP toxins from the *Drosophila* endosymbiont *Spiroplasma poulsonii*. *BMC Microbiol.* 19, 1–10. doi:10.1186/s12866-019-1410-1.
- Gatehouse, A. M. R., Barbieri, L., Stirpe, F., and Croy, R. R. D. (1990). Effects of ribosome inactivating proteins on insect development – differences between Lepidoptera and Coleoptera. *Entomol. Exp. Appl.* 54, 43–51. doi:10.1111/j.1570-7458.1990.tb01310.x.
- Gerardo, N. M., and Parker, B. J. (2014). Mechanisms of symbiont-conferred protection against natural enemies: An ecological and evolutionary framework. *Curr. Opin. Insect Sci.* 4, 8–14. doi:10.1016/j.cois.2014.08.002.
- Glare, T. R., Jurat-Fuentes, J. L., and O’Callaghan, M. (2017). *Basic and Applied*

- Research: Entomopathogenic Bacteria*. Elsevier Inc. doi:10.1016/B978-0-12-803527-6.00004-4.
- Goecks, J., Mortimer, N. T., Mobley, J. A., Bowersock, G. J., Taylor, J., and Schlenke, T. A. (2013). Integrative Approach Reveals Composition of Endoparasitoid Wasp Venoms. *PLoS One* 8, 1–14. doi:10.1371/journal.pone.0064125.
- Goto, A., Kadowaki, T., and Kitagawa, Y. (2003). Drosophila hemolectin gene is expressed in embryonic and larval hemocytes and its knock down causes bleeding defects. *Dev. Biol.* 264, 582–591. doi:10.1016/j.ydbio.2003.06.001.
- Govind, S. (2008). Innate immunity in Drosophila: Pathogens and pathways. *Insect Sci.* 15, 29–43. doi:10.1111/j.1744-7917.2008.00185.x.
- Haas, B. J., Chin, M., Nusbaum, C., Birren, B. W., and Livny, J. (2012). How deep is deep enough for RNA-Seq profiling of bacterial transcriptomes? *BMC Genomics* 13, 734. doi:10.1186/1471-2164-13-734.
- Hamilton, P. T., Leong, J. S., Koop, B. F., and Perlman, S. J. (2014). Transcriptional responses in a Drosophila defensive symbiosis. *Mol. Ecol.* 23, 1558–1570. doi:10.1111/mec.12603.
- Hamilton, P. T., Peng, F., Boulanger, M. J., and Perlman, S. J. (2015). A ribosome-inactivating protein in a Drosophila defensive symbiont. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1518648113-. doi:10.1073/pnas.1518648113.
- Harumoto, T., Anbutsu, H., Lemaitre, B., and Fukatsu, T. (2016). Male-killing symbiont damages host's dosage-compensated sex chromosome to induce embryonic apoptosis. *Nat. Commun.* 7, 12781. doi:10.1038/ncomms12781.
- Harumoto, T., and Lemaitre, B. Male-killing toxin in a bacterial symbiont of Drosophila. doi:10.1038/s41586-018-0086-2.
- Haselkorn, T. S., Markow, T. A., and Moran, N. A. (2009). Multiple introductions of the Spiroplasma bacterial endosymbiont into Drosophila. *Mol. Ecol.* 18, 1294–1305. doi:10.1111/j.1365-294X.2009.04085.x.
- He, L. S., Zhang, P. W., Huang, J. M., Zhu, F. C., Danchin, A., and Wang, Y. (2018). The enigmatic genome of an obligate ancient Spiroplasma symbiont in a hadal holothurian. *Appl. Environ. Microbiol.* doi:10.1128/AEM.01965-17.
- Herren, J. K., and Lemaitre, B. (2011). Spiroplasma and host immunity: Activation of humoral immune responses increases endosymbiont load and susceptibility to certain Gram-negative bacterial pathogens in Drosophila melanogaster. *Cell. Microbiol.* 13, 1385–1396. doi:10.1111/j.1462-5822.2011.01627.x.
- Herren, J. K., Paredes, J. C., Schüpfer, F., Arafah, K., Bulet, P., and Lemaitre, B. (2014). Insect endosymbiont proliferation is limited by lipid availability. *Elife* 3, e02964. doi:10.7554/eLife.02964.
- Herren, J. K., Paredes, J. C., Schüpfer, F., and Lemaitre, B. (2013). Vertical transmission of a Drosophila endosymbiont via cooption of the yolk transport and internalization machinery. *MBio* 4, 1–8. doi:10.1128/mBio.00532-12.
- Hilgenboecker, K., Hammerstein, P., Schlattmann, P., Telschow, A., and Werren, J. H. (2008). How many species are infected with Wolbachia? - A statistical analysis of current data. *FEMS Microbiol. Lett.* 281, 215–220. doi:10.1111/j.1574-6968.2008.01110.x.
- Hosokawa, T., and Fukatsu, T. (2020). Relevance of microbial symbiosis to insect behavior. *Curr. Opin. Insect Sci.* 39, 91–100. doi:10.1016/j.cois.2020.03.004.
- Hurst, G. D. D., Anbutsu, H., Kutsukake, M., and Fukatsu, T. (2003). Hidden from the host: Spiroplasma bacteria infecting Drosophila do not cause an immune response, but are suppressed by ectopic immune activation. *Insect Mol. Biol.*



- 12, 93–97. doi:10.1046/j.1365-2583.2003.00380.x.
- Irving, P., Ubeda, J. M., Doucet, D., Troxler, L., Lagueux, M., Zachary, D., et al. (2005). New insights into *Drosophila* larval haemocyte functions through genome-wide analysis. *Cell. Microbiol.* 7, 335–350. doi:10.1111/j.1462-5822.2004.00462.x.
- Jaenike, J., Unckless, R., Cockburn, S. N., Boelio, L. M., and Perlman, S. J. (2010). Adaptation via symbiosis: Recent spread of a *drosophila* defensive symbiont. *Science (80- )*. 329, 212–215. doi:10.1126/science.1188235.
- Janssen, B. D., and Hayes, C. S. (2012). The tmRNA ribosome-rescue system. *Adv. Protein Chem. Struct. Biol.* 86, 151–191. doi:10.1016/B978-0-12-386497-0.00005-0.
- Jiggins, F. M., Hurst, G. D. D., Jiggins, C. D., Schulenburg, J. H. G. V. D., and Majerus, M. E. N. (2000). The butterfly *Danaus chrysippus* is infected by a male-killing *Spiroplasma* bacterium. *Parasitology* 120, 439–446. doi:10.1017/S0031182099005867.
- Jones, J. E., and Hurst, G. D. D. (2020). Symbiont-mediated protection varies with wasp genotype in the *Drosophila melanogaster*–*Spiroplasma* interaction. *Heredity (Edinb)*. 124, 592–602. doi:10.1038/s41437-019-0291-2.
- Kikuchi, Y., Hayatsu, M., Hosokawa, T., Nagayama, A., and Tago, K. (2012). Symbiont-mediated insecticide resistance. *Pnas*. doi:10.1073/pnas.1200231109/-/DCSupplemental.www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1200231109.
- Kim, D., Langmead, B., and Salzberg, S. L. (2015). HISAT: A fast spliced aligner with low memory requirements. *Nat. Methods* 12, 357–360. doi:10.1038/nmeth.3317.
- Langmead, B., and Salzberg, S. L. (2012). Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. *Nat. Methods* 9, 357–359. doi:10.1038/nmeth.1923.
- Lemoine, M. M., Engl, T., and Kaltenpoth, M. (2020). Microbial symbionts expanding or constraining abiotic niche space in insects. *Curr. Opin. Insect Sci.* 39, 14–20. doi:10.1016/j.cois.2020.01.003.
- Liao, Y., Smyth, G. K., and Shi, W. (2014). FeatureCounts: An efficient general purpose program for assigning sequence reads to genomic features. *Bioinformatics* 30, 923–930. doi:10.1093/bioinformatics/btt656.
- López-García, P., and Moreira, D. (2015). Open Questions on the Origin of Eukaryotes. *Trends Ecol. Evol.* 30, 697–708. doi:10.1016/j.tree.2015.09.005.
- Lyne, R., Smith, R., Rutherford, K., Wakeling, M., Varley, A., Guillier, F., et al. (2007). FlyMine: An integrated database for *Drosophila* and *Anopheles* genomics. *Genome Biol.* 8. doi:10.1186/gb-2007-8-7-r129.
- Masson, F., Copete, S. C., Schüpfer, F., Garcia-Arreaez, G., and Lemaitre, B. (2018). In Vitro culture of the insect Endosymbiont *Spiroplasma poulsonii* highlights bacterial genes involved in host- symbiont interaction. *MBio* 9, 1–11. doi:10.1128/mBio.00024-18.
- Mateos, M., Winter, L., Winter, C., Higareda-Alvear, V. M., Martinez-Romero, E., and Xie, J. (2016). Independent origins of resistance or susceptibility of parasitic wasps to a defensive symbiont. *Ecol. Evol.*, 2679–2687. doi:10.1002/ece3.2085.
- Medina, P., Russell, S. L., and Russel, C.-D. (2019). Deep data mining reveals variable abundance and distribution of microbial reproductive manipulators within and among diverse host species. *bioRxiv*. doi:10.1101/679837.
- Meghlaoui, G. K., and Veuille, M. (1997). Selection and methionine accumulation in

- the fat body protein 2 gene (FBP2), a duplicate of the *Drosophila* alcohol dehydrogenase (ADH) gene. *J. Mol. Evol.* 44, 23–32. doi:10.1007/PL00006118.
- Misof, B., Liu, S., Meusemann, K., Peters, R. S., Donath, A., Mayer, C., et al. (2014). Phylogenomics resolves the timing and pattern of insect evolution. *Science* (80-). 346, 763–767. doi:10.1126/science.1257570.
- Montenegro, H., Solferini, V. N., Klaczko, L. B., and Hurst, G. D. D. (2005). Male-killing *Spiroplasma* naturally infecting *Drosophila melanogaster*. *Insect Mol. Biol.* 14, 281–287. doi:10.1111/j.1365-2583.2005.00558.x.
- Moran, N. a., Tran, P., and Gerardo, N. M. (2005). Symbiosis and insect diversification: An ancient symbiont of sap-feeding insects from the bacterial phylum Bacteroidetes. *Appl. Environ. Microbiol.* 71, 8802–8810. doi:10.1128/AEM.71.12.8802-8810.2005.
- Mortimer, N. T., Goecks, J., Kacsoh, B. Z., Mobley, J. A., Bowersock, G. J., Taylor, J., et al. (2013). Parasitoid wasp venom SERCA regulates *Drosophila* calcium levels and inhibits cellular immunity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 110, 9427–9432. doi:10.1073/pnas.1222351110.
- Mouches, C., Bové, J. M., and Albisetti, J. (1984). Pathogenicity of *Spiroplasma apis* and other spiroplasmas for honey-bees in Southwestern France. *Ann. l'Institut Pasteur Microbiol.* 135, 151–155. doi:10.1016/S0769-2609(84)80072-1.
- Narayanan, S., Surendranath, K., Bora, N., Surolia, A., and Karande, A. A. (2005). Ribosome inactivating proteins and apoptosis. *FEBS Lett.* 579, 1324–1331. doi:10.1016/j.febslet.2005.01.038.
- Oliver, K. M., and Perlman, S. J. (2020). *Toxin-mediated protection against natural enemies by insect defensive symbionts*. 1st ed. , eds. K. Oliver and Russel J. Elsevier Ltd. doi:10.1016/bs.aip.2020.03.005.
- Oliver, K. M., Russell, J. A., Morant, N. A., and Hunter, M. S. (2003). Facultative bacterial symbionts in aphids confer resistance to parasitic wasps. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100, 1803–1807. doi:10.1073/pnas.0335320100.
- Opal, S. M. (2010). “A Brief History of Microbiology and Immunology,” in *Vaccines: A Biography*, ed. A. W. Artenstein (New York, NY: Springer New York), 31–56. doi:10.1007/978-1-4419-1108-7\_3.
- Oulhen, N., Schulz, B. J., and Carrier, T. J. (2016). English translation of Heinrich Anton de Bary’s 1878 speech, ‘Die Erscheinung der Symbiose’ (‘De la symbiose’). *Symbiosis* 69, 131–139. doi:10.1007/s13199-016-0409-8.
- Paredes JC, Herren JK, Schüpfer F, Marin R, Claverol S, Kuo C, Lemaitre B, Béven L. 2015. Genome Sequence of the *Drosophila melanogaster* Male-Killing. 6:1–12. DOI: 10.1128/mBio.02437-14.Editor.
- Paredes, J. C., Herren, J. K., Schüpfer, F., and Lemaitre, B. (2016). The Role of Lipid Competition for Endosymbiont-Mediated Protection against Parasitoid Wasps in *Drosophila*. *MBio* 7, e01006-16. doi:10.1128/mBio.01006-16.
- Pentek, J., Parker, L., Wu, A., and Arora, K. (2009). Follistatin preferentially antagonizes activin rather than BMP signaling in *Drosophila*. *Genesis* 47, 261–273. doi:10.1002/dvg.20486.
- Pool, J. E., Wong, A., and Aquadro, C. F. (2006). Finding of male-killing *Spiroplasma* infecting *Drosophila melanogaster* in Africa implies transatlantic migration of this endosymbiont. *Heredity (Edinb)*. 97, 27–32. doi:10.1038/sj.hdy.6800830.
- Robinson, M. D., McCarthy, D. J., and Smyth, G. K. (2009). edgeR: A Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. *Bioinformatics* 26, 139–140. doi:10.1093/bioinformatics/btp616.
- Russo, J. (1996). Insect immunity: Early events in the encapsulation process of

- parasitoid (*Leptopilina boulandi*) eggs in resistant and susceptible strains of *Drosophila*. *Parasitology* 112, 135–142. doi:10.1017/s0031182000065173.
- Saglio, P., Lhospital, M., Dupont, G., Bove~, J. M., Tully, J. G., and Freundt, E. A. (1973). *Spiroplasma citri* gen. and sp. n.: a Mycoplasma- Like Organism Associated with " Stubborn " Disease of Citrus. *Int. J. Copyr. Syst. Bacteriol. Assoc. Microbiol. Soc.* 23, 191–204.
- Salazar-Jaramillo, L., Jalvingh, K. M., de Haan, A., Kraaijeveld, K., Buermans, H., and Wertheim, B. (2017). Inter- and intra-species variation in genome-wide gene expression of *Drosophila* in response to parasitoid wasp attack. *BMC Genomics* 18, 1–14. doi:10.1186/s12864-017-3697-3.
- Sapp, J. (1994). *Evolution by association a history of simbiosis*. 1<sup>a</sup>. New York: Oxford University Press.
- Sasaki, T., and Ishikawa, H. (1995). Production of essential amino acids from glutamate by mycetocyte symbionts of the pea aphid, *Acyrtosiphon pisum*. *J. Insect Physiol.* 41, 41–46. doi:10.1016/0022-1910(94)00080-Z.
- Schlenke, T. A., Morales, J., Govind, S., and Clark, A. G. (2007). Contrasting infection strategies in generalist and specialist wasp parasitoids of *Drosophila melanogaster*. *PLoS Pathog.* 3, 1486–1501. doi:10.1371/journal.ppat.0030158.
- Shigenobu, S., Watanabe, H., and Hattori, M. (2000). Genome sequence of the endocellular bacterial symbiont of aphids *Buchnera* sp . APS. 81–86.
- Shokal, U., and Eleftherianos, I. (2017). Evolution and function of thioester-containing proteins and the complement system in the innate immune response. *Front. Immunol.* 8, 1–9. doi:10.3389/fimmu.2017.00759.
- Snyder, A. K., and Rio, R. V. M. (2015). "Wigglesworthia morsitans" folate (vitamin B9) biosynthesis contributes to tsetse host fitness. *Appl. Environ. Microbiol.* 81, 5375–5386. doi:10.1128/AEM.00553-15.
- Stirpe, F. (2004). Ribosome-inactivating proteins. *Toxicon* 44, 371–383. doi:10.1016/j.toxicon.2004.05.004.
- Thurmond, J., Goodman, J. L., Strelets, V. B., Attrill, H., Gramates, L. S., Marygold, S. J., et al. (2019). FlyBase 2.0: The next generation. *Nucleic Acids Res.* 47, D759–D765. doi:10.1093/nar/gky1003.
- Valanne, S., Salminen, T. S., Järvelä-Stölting, M., Vesala, L., and Rämetsä, M. (2019). Immune-inducible non-coding RNA molecule lincRNA-IBIN connects immunity and metabolism in *Drosophila melanogaster*. *PLoS Pathog.* 15, 1–28. doi:10.1371/journal.ppat.1007504.
- Wang, W., Gu, W., Gasparich, G. E., Bi, K., Ou, J., Meng, Q., et al. (2011). *Spiroplasma eriocheiris* sp. nov., associated with mortality in the Chinese mitten crab, *Eriocheir sinensis*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* doi:10.1099/ijs.0.020529-0.
- Warren, J. T., Petryk, A., Marqués, G., Parvy, J. P., Shinoda, T., Itoyama, K., et al. (2004). Phantom encodes the 25-hydroxylase of *Drosophila melanogaster* and *Bombyx mori*: A P450 enzyme critical in ecdysone biosynthesis. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 34, 991–1010. doi:10.1016/j.ibmb.2004.06.009.
- Weiss, B. L., Wang, J., and Aksoy, S. (2011). Tsetse immune system maturation requires the presence of obligate symbionts in larvae. *PLoS Biol.* 9. doi:10.1371/journal.pbio.1000619.
- Werren, J. H., Baldo, L., and Clark, M. E. (2008). Wolbachia: Master manipulators of invertebrate biology. *Nat. Rev. Microbiol.* 6, 741–751. doi:10.1038/nrmicro1969.
- Williams, M. J. (2007). *Drosophila* Hemopoiesis and Cellular Immunity . *J. Immunol.* 178, 4711–4716. doi:10.4049/jimmunol.178.8.4711.

- Xie, J., Butler, S., Sanchez, G., and Mateos, M. (2014). Male killing Spiroplasma protects *Drosophila melanogaster* against two parasitoid wasps. *Heredity (Edinb)*. 112, 399–408. doi:10.1038/hdy.2013.118.
- Xie, J., Tiner, B., Vilchez, I., and Mateos, M. (2011). Effect of the *Drosophila* endosymbiont Spiroplasma on parasitoid wasp development and on the reproductive fitness of wasp-attacked fly survivors. *Evol. Ecol.* 25, 1065–1079. doi:10.1007/s10682-010-9453-7.
- Xie, J., Vilchez, I., and Mateos, M. (2010). Spiroplasma bacteria enhance survival of *Drosophila hydei* attacked by the parasitic wasp *Leptopilina heterotoma*. *PLoS One* 5. doi:10.1371/journal.pone.0012149.
- Zhang, L., Yun, Y., Hu, G., and Peng, Y. (2018). Insights into the bacterial symbiont diversity in spiders. *Ecol. Evol.* 8, 4899–4906. doi:10.1002/ece3.4051.

## 10.0 ANEXOS

# Differential gene expression in a tripartite interaction: *Drosophila*, *Spiroplasma* and parasitic wasps

Victor Manuel Higareda Alvear<sup>1</sup>, Mariana Mateos<sup>2</sup>, Diego Cortez<sup>1</sup>, Cecilia Tamborindeguy<sup>3</sup> and Esperanza Martinez-Romero<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Centro de Ciencias Genómicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Cuernavaca, Morelos, México

<sup>2</sup> Department of Ecology and Conservation Biology, Texas A&M University, College Station, TX, USA

<sup>3</sup> Department of Entomology, Texas A&M University, College Station, TX, USA

## ABSTRACT

**Background:** Several facultative bacterial symbionts of insects protect their hosts against natural enemies. *Spiroplasma poulsonii* strain sMel (hereafter *Spiroplasma*), a male-killing heritable symbiont of *Drosophila melanogaster*, confers protection against some species of parasitic wasps. Several lines of evidence suggest that *Spiroplasma*-encoded ribosome inactivating proteins (RIPs) are involved in the protection mechanism, but the potential contribution of the fly-encoded functions (e.g., immune response), has not been deeply explored.

**Methods:** Here we used RNA-seq to evaluate the response of *D. melanogaster* to infection by *Spiroplasma* and parasitism by the *Spiroplasma*-susceptible wasp *Leptopilina heterotoma*, and the *Spiroplasma*-resistant wasp *Ganaspis* sp. In addition, we used quantitative (q)PCR to evaluate the transcript levels of the *Spiroplasma*-encoded Ribosomal inactivation protein (RIP) genes.

**Results:** In the absence of *Spiroplasma* infection, we found evidence of *Drosophila* immune activation by *Ganaspis* sp., but not by *L. heterotoma*, which in turn negatively influenced functions associated with male gonad development. As expected for a symbiont that kills males, we detected extensive downregulation in the *Spiroplasma*-infected treatments of genes known to have male-biased expression. We detected very few genes whose expression patterns appeared to be influenced by the *Spiroplasma*-*L. heterotoma* interaction, and these genes are not known to be associated with immune response. For most of these genes, parasitism by *L. heterotoma* (in the absence of *Spiroplasma*) caused an expression change that was at least partly reversed when both *L. heterotoma* and *Spiroplasma* were present. It is unclear whether such genes are involved in the *Spiroplasma*-mediated mechanism that leads to wasp death and/or fly rescue. Nonetheless, the expression pattern of some of these genes, which reportedly undergo expression shifts during the larva-to-pupa transition, is suggestive of an influence of *Spiroplasma* on the development time of *L. heterotoma*-parasitized flies. One of the five RIP genes (RIP2) was consistently highly expressed independently of wasp parasitism, in two substrains of sMel. Finally, the RNAseq data revealed evidence consistent with RIP-induced damage in the ribosomal (r)RNA of the *Spiroplasma*-susceptible, but not the *Spiroplasma*-resistant, wasp. Acknowledging the caveat that we lacked adequate

Submitted 24 November 2020

Accepted 6 February 2021

Published 4 March 2021

Corresponding author

Mariana Mateos,  
mmateos@tamu.edu

Academic editor

Joseph Gillespie

Additional Information and  
Declarations can be found on  
page 25

DOI 10.7717/peerj.11020

© Copyright

2021 Higareda Alvear et al.

Distributed under

Creative Commons CC-BY 4.0

OPEN ACCESS

power to detect the majority of DE genes with fold-changes lower than 3, we conclude that immune priming is unlikely to contribute to the *Spiroplasma*-mediated protection against wasps, and that the mechanism by which *Ganaspis sp.* resists/tolerates *Spiroplasma* does not involve inhibition of RIP transcription.

**Subjects** Bioinformatics, Ecology, Entomology, Molecular Biology, Zoology

**Keywords** Metatranscriptome, Spiroplasma, Parasitic wasp, Protection, Immunity, Drosophila, Toxins

## INTRODUCTION

During their life cycle, insects face a large diversity of natural enemies such as predators and parasites, as well as infections by bacteria, fungi, and viruses. Although insects rely on an immune system to overcome these infections (reviewed in [Hillyer, 2016](#)), parasites and pathogens have evolved counter defenses. In this arms race, many insects have allied with symbiotic bacteria to fight against parasites. Extensive evidence of such defensive symbioses has been accrued over the last ~17 years ([Oliver & Perlman, 2020](#)).

Three models of classical ecology can be adapted to explain protection of bacteria against parasites ([Gerardo & Parker, 2014](#)). **Exploitation competition** occurs when the symbiont and the parasite compete for a limiting resource (e.g., *Wolbachia* and vectored-viruses compete for cholesterol; [Caragata et al., 2013](#)). **Apparent competition** can occur when the symbiont activates (“primes”) the immunity of the host, and thus indirectly interferes with the parasite (e.g., *Wigglesworthia* in *Glossina* against trypanosomes; [Wang et al., 2009](#)). Finally, **interference competition** can occur when the symbiont produces a compound (e.g., a toxin) that limits the success of the parasite (e.g., *Hamiltonella defensa* in aphid insects, [Oliver et al., 2003](#); [Brandt et al., 2017](#)). One or more of these mechanisms can occur in concert, as suggested for the interactions between flies in the genus *Drosophila* and heritable bacteria in the genus *Spiroplasma*, where these endosymbionts protect the host against parasitic wasps or nematodes ([Jaenike et al., 2010](#); [Xie, Vilchez & Mateos, 2010](#)).

The association between *Drosophila melanogaster* and its naturally occurring heritable facultative symbiont *Spiroplasma poulsonii* (sMel) has emerged as a model system to study the evolutionary ecology and mechanistic bases of both defensive mutualisms ([Jaenike et al., 2010](#); [Xie, Vilchez & Mateos, 2010](#)) and reproductive parasitism (i.e. male-killing) ([Cheng et al., 2016](#); [Harumoto et al., 2016](#)). The presence of *S. poulsonii* in *Drosophila* larvae prevents the successful development of several species of parasitic wasps, including *Leptopilina heterotoma* ([Xie, Vilchez & Mateos, 2010](#); [Xie et al., 2014](#); [Haselkorn & Jaenike, 2015](#); [Mateos et al., 2016](#); [Paredes et al., 2016](#)). Parasitism by *L. heterotoma* in the presence of *Spiroplasma* results in no wasp survival, and in variable survival of *D. melanogaster* (range: <1 to 40%). Other factors that affect fly survival are species and strain of *Drosophila*, wasp, and *Spiroplasma*, as well as experimental conditions, including temperature ([Mateos et al., 2016](#); [Jones & Hurst, 2020a, 2020b](#); [Corbin et al., 2021](#)). Wasp species that are negatively affected by *Spiroplasma* are referred as

“*Spiroplasma*-susceptible”. Several species of *Drosophila* parasitoids are unaffected by the presence of *Spiroplasma* in the host, such as *Ganaspis* sp. (strain G1FL), and are referred to “*Spiroplasma*-resistant” (Mateos et al., 2016).

Research into *Spiroplasma*-mediated protection against wasps has revealed *L. heterotoma* wasp embryos manage to hatch into first instars and achieve some growth, which is subsequently stalled (Xie, Vilchez & Mateos, 2010; Xie et al., 2014; Paredes et al., 2016). Evidence consistent with competition for lipids (i.e., exploitative competition) between *Spiroplasma* and the developing wasp has been reported for the wasp *Leptopilina boulandi* (Paredes et al., 2016).

Regarding the role of interference competition, the genomes of several *Spiroplasma* strains, including sMel, encode genes with homology to Ribosomal inactivation proteins (RIPs; Ballinger & Perlman, 2017). RIP proteins, which are produced by different plants and bacteria (e.g., ricin and Shiga toxin, respectively), cleave a specific adenine present within a highly conserved (i.e., in all eukaryotes) motif of the large ribosomal subunit (28S rRNA), leading to inactivation of the ribosome and inhibition of protein translation (reviewed in Stirpe, 2004).

Damage consistent with RIP activity (hereafter referred to as depurination) has been detected in a *Spiroplasma*-susceptible nematode (Hamilton et al., 2015) and in two *Spiroplasma*-susceptible wasps (the larval parasitoids *L. boulandi* and *L. heterotoma*), but not in a *Spiroplasma*-resistant wasp that oviposits on fly pupae (Ballinger & Perlman, 2017). Although the above studies suggest that competition for nutrients and RIP activity are involved in the *Spiroplasma*-mediated mechanism that causes wasp death, they have not demonstrated that the above mechanisms alone or in combination are necessary and sufficient, and alternative mechanisms, including immune priming, have not been ruled out.

In response to wasp parasitism, *D. melanogaster* mounts an immune response characterized by proliferation of blood cells also known as hemocytes. Plasmatocytes are the first cells to attach to the foreign egg followed by lamellocytes which form successive layers; both types of hemocytes consolidate around the wasp egg, forming a capsule. The inner cells of the capsule produce melanin and release free radicals into the capsule, killing the wasp (Russo, 1996; Carton, Poirié & Nappi, 2008). Wasps have evolved a diverse array of strategies that counter the fly-encoded defense (Schlenke et al., 2007; Mortimer et al., 2013). Whether or not *Spiroplasma* contributes to enhancing the fly-encoded defense against wasps has not been extensively investigated. To date only one study has examined the possible influence of *Spiroplasma* on fly-encoded immunity against wasps (Paredes et al., 2016). Their results revealed no effect of *Spiroplasma* on the number of hemocytes in flies parasitized by *L. boulandi*. Whether *Spiroplasma* influences this or other aspects of fly-encoded immunity against other wasps has not been examined.

Herein, we used an RNA-seq approach to evaluate the transcriptomic response of *D. melanogaster* during interactions involving *Spiroplasma* and two wasps that are generalists of the genus *Drosophila*: the *Spiroplasma*-susceptible *L. heterotoma* and the *Spiroplasma*-resistant *Ganaspis* sp. In addition, we evaluated the effect of wasp parasitism



on the expression of *Spiroplasma* RIP genes in two closely related substrains of sMel, which have similar genomes (Gerth et al., 2021), but confer different levels of overall protection against *L. boulandi* (two strains tested) and one of two strains of *L. heterotoma* (Jones & Hurst, 2020b).

## METHODS

### Insect and *S. poulsonii* strains

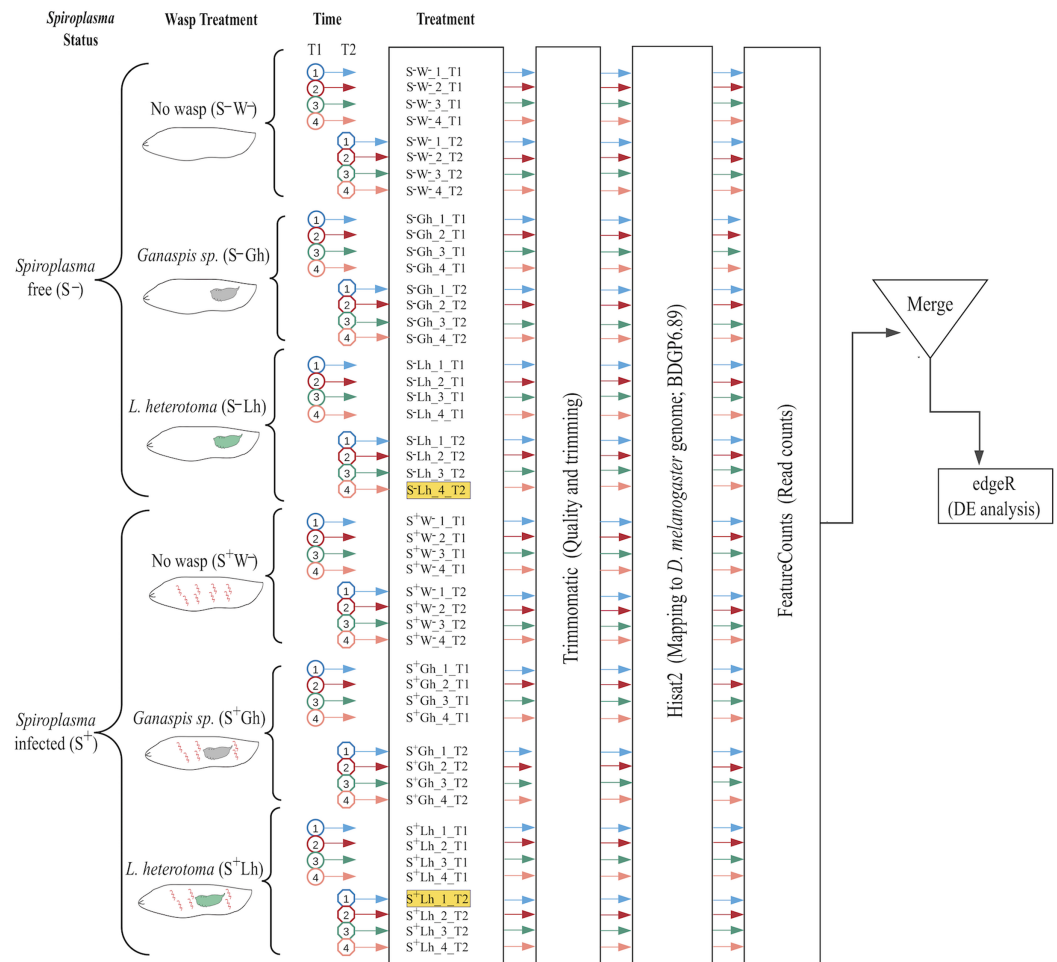
The transcriptomic experiments were performed on *D. melanogaster* flies (strain Canton S), which naturally harbor *Wolbachia* (Riegler et al., 2005). In a failed attempt to remove *Wolbachia*, several generations prior to the experiments, we treated these flies for three consecutive generations with tetracycline, followed by several generations with no antibiotics. Flies were reared in a Standard cornmeal medium (recipes in Supplemental Methods 1) at 25 °C, with a dark:light 12 h-cycle. Canton S flies were artificially infected with *Spiroplasma poulsonii* strain sMel-BR (original isofemale line “Red42” from Brazil; Montenegro et al., 2005), via hemolymph transfer (as in Xie, Vilchez & Mateos, 2010) at least three generations before initiating the experiment. As sMel-BR is a male-killer, the *Spiroplasma*-infected strain was maintained by addition of *Spiroplasma*-free males (Canton S strain) every generation.

The strains of wasps used were: the *Spiroplasma*-susceptible *Leptopilina heterotoma* strain Lh14 (Schlenke et al., 2007; voucher USNMENT01557081; hereafter “Lh”); and the all-female *Spiroplasma*-resistant *Ganaspis* sp. strain G1FL (Mortimer et al., 2013; voucher USNMENT01557080; also known as “drop\_ Gan\_sp53” in the *Drosophila* parasitoid database; Lue et al., 2021; hereafter “Gh”). Wasps were reared using second instar Canton S *Spiroplasma*-free larvae. These wasp strains are naturally infected with one or more *Wolbachia* strains (Wey et al., 2020).

For the qPCR assays, we used *Wolbachia*-free Oregon R flies to which sMel-BR or sMel-UG (original isofemale line from Uganda, Pool, Wong & Aquadro, 2006), had been artificially transferred at least three generations prior. These flies were maintained by matings with *Spiroplasma*-free Oregon R males under the same environmental conditions as the Canton S background flies, but in an opuntia-banana food medium (recipes in Supplemental Methods 1).

### Wasp exposure

To examine the effect of the interaction of *Spiroplasma* and wasp on the transcriptome of *Drosophila* (and of *Spiroplasma*), we compared treatments with the presence and absence of *Spiroplasma* (sMel-BR) and one of the two wasp species at two different time points (Fig. 1). This experimental design resulted in a combination of twelve treatments; six treatments per time point. For each replicate, parental flies (approximately ten females and ten males) were set up in oviposition vials in the evening for overnight oviposition. Parental flies were removed the next morning. One day later, ~30 second-instar *D. melanogaster* larvae were carefully collected and transferred to a Petri dish (60 mm diameter) containing cornmeal food medium. In replicates assigned to a wasp treatment, five male and six female wasps of the corresponding species (*L. heterotoma* or



**Figure 1** Experimental design and bioinformatic workflow to detect differentially gene expression in *D. melanogaster*. Treatments are firstly split by *Spiroplasma* infection status: *S*<sup>-</sup> = *Spiroplasma*-free; and *S*<sup>+</sup> = *Spiroplasma*-infected. Treatments are then split by Wasp Treatment: *W*<sup>-</sup> = No wasp, *Lh* = exposed to *Leptopilina heterotoma*; and *Gh* = exposed to *Ganaspis* sp. Experiments were performed at 24 (T1) and 72 h (T2) post-wasp attack (PWA). For each treatment, four replicates were generated. The two samples highlighted in yellow (S<sup>-</sup>Lh\_4\_T2 and S<sup>+</sup>Lh\_1\_T2) were excluded from the analysis (see main text). Each cartoon depicts a fly larva (white) with or without *Spiroplasma* (red spirals) and wasp larva: green = *L. heterotoma* (Lh); and grey = *Ganaspis* sp. (Gh). Full-size [DOI: 10.7717/peerj.11020/fig-1](https://doi.org/10.7717/peerj.11020/fig-1)

*Ganaspis* sp.) were added to the Petri dish and allowed to oviposit for ~5 h. All female wasps had been previously allowed to oviposit on *D. melanogaster* fly larvae for ~5 h. The purpose of this “training” is to ensure that the wasps are experienced at oviposition prior to the experiment. All Petri dishes were covered, but a small hole was opened (with a hot needle) to allow for gas exchange, and/or through which wasps could feed on a piece of cotton wool soaked in 1:1 water:honey mix that was placed outside the dish. To collect RNA, larvae were retrieved from each Petri dish at either 24 h (T1) or 72 h (T2) post-wasp attack (PWA) (i.e., one or three days after wasps were removed, respectively). To ensure sufficient material for RNA-seq, for each replicate we pooled 11–30 larvae at the 24 h time-point, and 13–23 larvae at the 72 h time point, with the exception of one replicate (only three larvae, which we subsequently removed;

see “Results”). Both wasp species were embryos at T1 and larvae at T2. Fly larvae from the same Petri dish were pooled into a single RNA extraction tube (i.e., a replicate).

From each Petri dish in the wasp-exposed treatments, a subsample of fly larvae was used to verify wasp parasitism rate as follows. First, at the time of larvae collection for RNA extraction, five fly larvae per replicate were dissected under the microscope and subsequently discarded. If all five larvae contained at least one wasp egg or larva (i.e., 100% wasp oviposition rate), the replicate was retained and processed. If one or more fly larvae did not contain a wasp larva (or embryo), then five additional fly larvae were examined for wasp presence. We discarded replicates where more than two larvae were found unparasitized. All collections for RNA were performed in the afternoon-evening, and collected larvae were quickly placed in an empty microtube for processing.

### RNA extraction

Preliminary experiments with RNAlater Stabilization Solution revealed that the larvae did not die immediately and appeared to melanize. Therefore, collected larvae were either immediately subjected to the total RNA extraction procedure, or frozen at  $-80^{\circ}\text{C}$  for subsequent extraction. Total RNA was extracted using the Trizol (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) method. Each sample consisted of a pool of *Drosophila* larvae that were homogenized by hand with a sterile plastic pestle in Trizol reagent. The Trizol isolation method was performed following the manufacturer’s protocol but it was stopped at the 70% ethanol wash step. The total RNA pellet in ethanol was submitted to the Texas AgriLife Genomics and Bioinformatics Services facility for completion of the RNA isolation procedure, assessment of RNA quality and quantity (using Fragment Analyzer; Agilent, Santa Clara, CA, USA), library preparation, sequencing, and demultiplexing.

### Library preparation and sequencing

Total RNA was subjected to removal of ribosomal RNA from eukaryotes and prokaryotes with the RiboZero Epidemiology kit (Illumina, San Diego, CA, USA). The TruSeq stranded kit (Illumina) was then used to prepare the library for sequencing with Illumina (125 bp Single End “HighSeq 2400v4 High Output”).

### Bioinformatic analysis

Quality and presence of adapters was evaluated with FASTQC ([Andrews, 2010](#)), followed by a filtering/trimming procedure with Trimmomatic v.0.36 ([Bolger, Lohse & Usadel, 2014](#)), using ILLUMINACLIP:/adapters.fasta:2:30:10 LEADING:3 TRAILING:3 SLIDINGWINDOW:4:15 MINLEN:36. To examine differential expression (DE) of *D. melanogaster* genes, trimmed reads were mapped with Hisat2 v.2.0.2-beta ([Kim, Langmead & Salzberg, 2015](#)), using—rna-strandness R option. Treatments parasitised by *L. heterotoma* were mapped to an index composed by *D. melanogaster* genome (ensembl version BDGP6) plus *L. heterotoma* genome, reference VOOK00000000. Treatments parasitised by *Gnaspis* sp. were only mapped to *Drosophila*, because there is not an available genome for this strain of *Gnaspis* sp. The resulting *D. melanogaster* mapped reads were quantified using featureCounts from the Subread package v1.6.2

(Liao, Smyth & Shi, 2014), using the following parameters: -s 2, -t exon, -g gene\_id. Differential gene expression was assessed for pairs of treatments in R (R core Team) with edgeR v 3.24.3 package (Robinson, McCarthy & Smyth, 2009). For each pairwise treatment comparison, genes with counts <1 cpm for all replicates were discarded. Only genes with absolute 2LogFC  $\geq$  0.58 and FDR < 0.05 were considered differentially expressed (DE). The Robust parameter (robust = TRUE) of edgeR was implemented to minimize false positive DE genes. The gene ids corresponding to the DE genes were loaded (before May 2020) into Flymine, (an integrated database for *Drosophila* genomics, Lyne et al., 2007) available at <https://www.flymine.org/flymine/begin.do>. This platform outputs gene names plus other information such as Gene Ontology (GO), enrichment of pathways, tissue expression and protein domains. Expression patterns of individual genes were obtained from flybase2.0 (Thurmond et al., 2019) available at <https://flybase.org/>. Venn diagrams used to detect exclusive genes in the interactions were generated using the web-tool available at <http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/Venn/>.

To measure *Spiroplasma* gene expression, the trimmed reads from the *Spiroplasma*-infected treatments were subjected to kallisto v.0.43.1 (Bray et al., 2016), using the genome of *S. poulsonii* sMel-UG (GCF\_000820525.2), as reference. Count tables obtained by kallisto were used to detect DE genes using edgeR. Expression of RIP genes in the transcriptome was obtained from this table using trimmed mean of *M*-values (TMM) normalized counts. Heatmaps of expression patterns were generated with the R package pheatmap v 1.0.12.

### Power analyses for DE

To identify limitations on the detection of *Drosophila* DE genes, we performed a statistical power analysis with the R package RNASeqPower v.1.22.1 (Hart et al., 2013). Input parameters such as coverage and the biological coefficient of variation (BCV) to run RNASeqPower are reported in Table S1. Coverage was calculated from our data (Table S2). The BCV was determined for each pairwise comparison and represents the square root of the common dispersion that is reported by edgeR.

### Analyses of depurination signal in the sarcin-ricin loop (SRL) of the 28S rRNA of wasps and flies

Ribosomal inactivation proteins toxins remove a specific adenine present in the sarcin-ricin loop (SRL) of the 28S rRNA leaving an abasic site (i.e., the backbone remains intact). When a reverse transcriptase encounters an abasic site, it preferentially adds an adenine in the nascent complementary DNA strand. This property, which results in an incorrect base at the RIP-depurinated site in the cDNA and all subsequent PCR amplification steps, has been used to detect evidence of RIP activity in any procedure that relies on reverse transcription such as RNA-seq or reverse-transcription qPCR (Hamilton et al., 2015).

To examine whether a signal of depurination consistent with RIP activity was detectable in wasp-derived sequences, we mapped RNA-seq data to a reference sequence file comprised of the 28S rRNA sequences of the wasps and of *D. melanogaster* using Bowtie2

v2.3.5 (Langmead & Salzberg, 2012), with default options. Only sequences that mapped to the wasp 28S rRNA were retained (Dataset S1). To visualize and count the shift from A to T (or other bases), the retained reads were mapped again to the 28S rRNA of wasp in Geneious v.11.1.2 (Biomatters Inc., Newark, NJ, USA; “low sensitivity mode”; maximum gap size = 3; iterate up to 25 times, maximum mismatches per read 2%). The number of reads containing each of the four bases or a gap at the target site were counted by selecting the position at all the reads to be counted, and recording the counts reported by Geneious under the “Nucleotide Statistics” option (gapped reads were excluded from counts). Reads were counted only if they fully covered a specific part of the 28S loop sequence (TACGAGAGGAACC). The bold-faced adenine represents the site of RIP depurination. Replicates with fewer than 10 mapped reads were discarded, Table S3 and Fig. S11. Statistical analysis was conducted in R v 4.02 (R core Team) using a Bayesian generalized linear model (bayesglm function in “arm” package), due to the presence of zeros (no depurination) in some treatments. Using the above strategy, raw sequences were also mapped to the full sequence of the 28S rRNA of *D. melanogaster*, and depurination was evaluated. Due to the high number of ribosomal sequences that align to the 28S rRNA of *Drosophila*, only subsets of 1 million of sequences were analyzed (Table S4).

### Expression of *Spiroplasma* RIPs

To verify the RIP expression patterns inferred from the transcriptome (see “Results”) and to examine whether they were consistent between substrains of sMel, we used qPCR on a new set of treatments. We followed the “Wasp exposure” methodology (described above), but used *Wolbachia*-free *D. melanogaster* (Oregon R) harboring the *S. poulsonii* strain sMel-BR or sMel-UG. Five larvae per treatment (parasitized or not by *L. heterotoma* or *Ganaspis* sp.), were collected at 24 and 72 h PWA, flash frozen in liquid nitrogen and homogenized by hand with a pestle. Total RNA was extracted with the All prep DNA/RNA mini kit (Qiagen, Germantown, MD, USA). 1µg of total RNA was used to synthesize cDNA using superscript II reverse transcriptase (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), following manufacturer’s procedures. cDNA was used as a template for qPCRs, performed on a CFX96 detection system (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). The mix contained 5 µl of iTaq Universal SYBR Green Supermix (Bio-Rad, Hercules, CA, USA), 2.5 µl water, 2 µl cDNA, and 0.25 µl of each primer (stock solution at 10 µM). Primer sequences and efficiencies for RIP2, RIP3-5 and rpoB were taken from (Ballinger & Perlman, 2017). For RIP1, we designed and used the following primers Forward: 5'-AATCAGAGGGGCATTAGCTC-3' Reverse 5'-CTTCGCTTGTGGTTCTTGAT-3', efficiency = 0.995. Although Ballinger & Perlman (2017) reported a primer pair targeted at RIP1, this primer pair matches a fragment of RIP2 instead.

Relative expression was calculated using efficiency-corrected Ct values using  $(Ct \times (\text{Log}(\text{efficiency})/\text{Log}(2)))$  formula. DeltaCt was calculated as Ct-rpoB minus Ct-RIPx (Dataset S2). We used JMP Pro v.15 (SAS, Cary, NC, USA) to fit a full factorial Generalized Regression (Normal distribution) model. The response variable was delta Ct Value. The independent variables (all fixed and categorical) were: RIP gene (“RIP”: RIP1, RIP2,

RIP3-5), Wasp Treatment (No wasp, Lh and Gh), *Spiroplasma* strain (Brazil or Uganda) and Time Point (24 or 72 h). Significant effects and interactions were explored with Tukey HSD tests with Least Square Means Estimates ([Supplemental File S1](#)).

### Data availability

All raw reads generated in this project have been submitted to NCBI under BioProject [PRJNA577145](#) and BioSample SAMN13020352. Count tables for *D. melanogaster* and *Spiroplasma* are in [Dataset S3](#). Command lines used to run bioinformatic analyses are available in [Supplemental Methods 2](#). Raw Ct values from the qPCR analyses are in [Dataset S2](#). Output results of edgeR for each pairwise treatment comparison are in [Dataset S6](#).

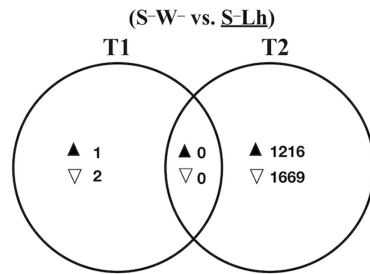
## RESULTS

To examine the effect of *Spiroplasma* on *D. melanogaster* gene expression under wasp parasitism, we generated 12 RNA-seq treatments ([Fig. 1](#)), with an average of 47 million quality single-end reads per sample, ~90% of these reads mapped to the *D. melanogaster* genome. A fraction of these reads mapped to ribosomal sequences of the host, which is an indication of incomplete ribodepletion ([Table S2](#)). The power analyses revealed that we should have sufficient power to detect 91–100% of differentially expressed (DE) genes with fold changes = 4; 75–99% of DE genes with fold-changes = 3; 38–80% of DE genes with fold changes = 2, and 16–37% of DE genes with fold changes = 1.5 ([Table S1](#); [Fig. S1](#)).

The multidimensional scaling (MDS) plot of all treatments at 24 h post-wasp attack (PWA; T1) did not reveal any particular grouping by treatment ([Fig. S2](#)). At the 72 h PWA time point (T2), however, the treatments separated at the first dimension by presence/absence of *Spiroplasma* ([Fig. S3](#)). This plot allowed us to detect two replicates that we deemed outlier and decided to exclude from further analyses (see [Fig. 1](#)). Replicate “S<sup>-</sup>Lh\_4\_T2”, which belonged to a *Spiroplasma*-free treatment, grouped with the *Spiroplasma*-infected treatments. Absence of *Spiroplasma* infection in replicate S<sup>-</sup>Lh\_4\_T2 was confirmed, as no reads mapped to the *Spiroplasma* genome. Thus, the grouping of replicate S<sup>-</sup>Lh\_4\_T2 with the *Spiroplasma*-infected treatments (which should lack males) could be explained by a lack of males; a scenario that is likely given that this replicate only had three larvae (i.e., assuming equal sex ratios in the *Spiroplasma*-free flies, the probability of sampling all females is  $0.5^3 = 12.5\%$ ). Concerning replicate “S<sup>+</sup>Lh\_1\_T2”, its expression pattern included upregulation of numerous genes associated with immune response. Consequently, we suspected that this particular replicate likely contained one or more larvae infected by a pathogenic bacterium.

In the next sections, we first describe the response of *D. melanogaster* to parasitism by the wasps (*L. heterotoma* or *Ganaspis* sp.) in the absence of *Spiroplasma*, followed by the fly response to the sole presence of *Spiroplasma*. Finally, taking these results into account, we examine the response of *Drosophila* during the *Spiroplasma*-wasp interaction. Due to expected power limitations, we acknowledge that there may be relevant *Drosophila* genes to the interaction among fly, wasp and *Spiroplasma*, that were not

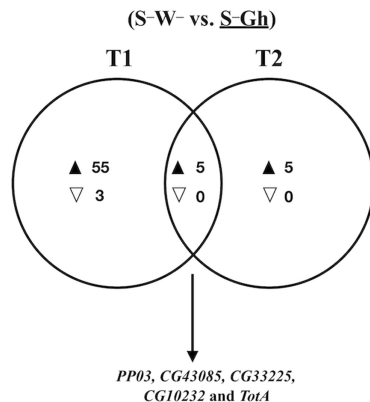
**A** Effect of *L. heterotoma* on *D. melanogaster*



**B**

GO enrichment in the presence of <i>L. heterotoma</i> at 72h PWA	
▽ Downregulated at 72h PWA	▲ Upregulated at 72h PWA
Proteolysis	Transmembrane and ion transport
Proteosomal protein catabolism	Chitin metabolism
Ubiquitin-dependent protein catabolic process	Drug metabolism
Spermatid differentiation and development	Amino-sugar metabolism

**C** Effect of *Ganaspis* sp. on *D. melanogaster*



**D**

Functions upregulated in the presence of <i>Ganaspis</i> sp.	
▲ Upregulated at 24h PWA	▲ Upregulated at 72h PWA
Stress response	Stress response
Jak/Stat pathway	Melanization
Hemocyte proliferation	
Melanization	
Proteolysis	

**Figure 2** Venn diagrams and enriched functions or Gene Ontology (GO) categories during wasp parasitism in the absence of *Spiroplasma*. Differentially expressed genes of *D. melanogaster* at time points T1 and T2 (24 and 72 h post-wasp attack (PWA), respectively) by (A) and (B) *L. heterotoma* or (C) and (D) *Ganaspis* sp. Black and white triangles indicate up- and downregulation, respectively, in the treatment that is underlined. (B) Some of the most enriched GO categories induced by *L. heterotoma*. (D) Functions induced by *Ganaspis* sp. were manually assigned based on gene annotation of DE genes. (C) The arrow in this panel indicates the five genes in the T1 and T2 intersection. S<sup>-</sup>W<sup>-</sup> = *Spiroplasma*-free and wasp-free; S<sup>-</sup>Lh = *Spiroplasma*-free (S<sup>-</sup>) and parasitized by wasp *L. heterotoma* (Lh); S<sup>-</sup>Gh = *Spiroplasma*-free (S<sup>-</sup>) and parasitized by wasp *Ganaspis* sp. (Gh).

Full-size DOI: 10.7717/peerj.11020/fig-2

detectable as DE in our experiments, particularly if their fold-changes are lower than ~3 and/or their expression level is low (Oshlack & Wakefield, 2009).

### Response of *D. melanogaster* to *L. heterotoma* parasitism in the absence of *Spiroplasma*

Parasitism by *L. heterotoma* at T1 (24 h) post-wasp attack (PWA), did not have a large effect on *D. melanogaster* gene expression, as only one gene (*thor*) was upregulated, whilst two genes, *Hml* and *mt:ATPase6*, were downregulated (Fig. 2A; Dataset S4). In contrast, at T2 (72 h PWA), 1216 genes were up- and 1669 down-regulated (Fig. 2A; Dataset S5). Of the 1216 upregulated genes at T2, 818 grouped into 32 GO enriched categories (Fig. 2B); of which transport was the most enriched. A pathway analysis revealed that upregulated genes are involved with energy generation pathways, such as lipid metabolism and citric acid cycle (Dataset S5). Of the 1669 downregulated genes, 945 grouped into

25 GO categories, of which proteolysis was the most enriched (Fig. 2B; Dataset S5). Unexpectedly, a subset of 67 downregulated genes belongs to GO categories related to spermatogenesis, suggesting that *L. heterotoma* may interfere with male gonad development (further discussed below).

### Response of *D. melanogaster* to *Ganaspis* sp. parasitism in the absence of *Spiroplasma*

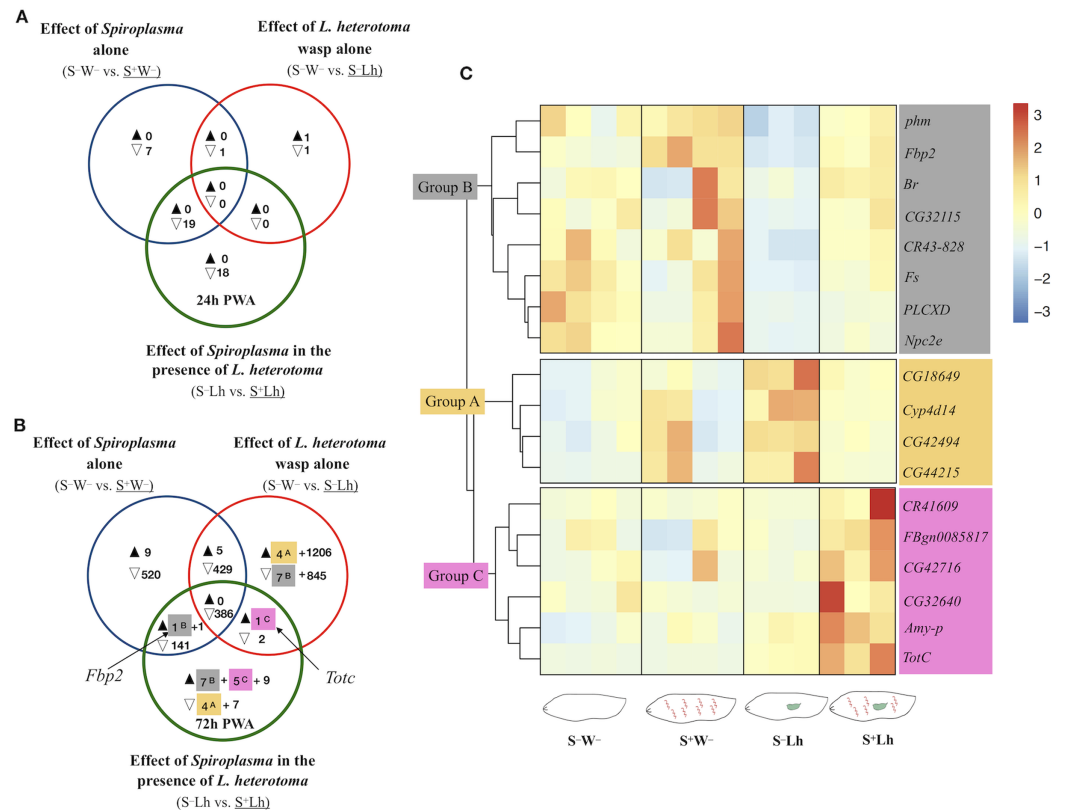
In the presence of the wasp *Ganaspis* sp. (i.e.,  $S^-W^-$  vs.  $S^-Gh$ ), three genes were down- and 60 were up-regulated at T1 (Fig. 2C). The two downregulated genes are known to be expressed by hemocytes (*Peroxidasin* and *hemolectin*) (Irving et al., 2005), whereas the other is a small nucleolar RNA (*Uhg4*). Only one gene, *hemolectin*, was down-regulated by both *L. heterotoma* and *Ganaspis* sp. at T1 (Dataset S4). The sixty upregulated genes in the presence of *Ganaspis* sp. at T1 include genes that are known to be expressed preferentially by hemocytes such as *hemese*, *ItgaPS4*, *ItgaPS5*, *Scavenger receptor class C* (CG3212), one serpin (CG6687), a serine protease (CG6639), as well as one gene involved in hemocyte proliferation (*pvf2*) (Irving et al., 2005). One activator of the Jak Stat pathway, *upd3* and some effectors of this pathway, *TotA*, *tep1* and *tep2* (Agaisse & Perrimon, 2004), were also upregulated. Prophenoloxidase 3 (*PPO3*) and *yellow-f* genes, which are involved in the melanization process (Han et al., 2002; Dudzic et al., 2015), were also upregulated by *Ganaspis* sp. *PPO3* was highly upregulated (2 LogFC = 9). The complete list of DE genes and GO enrichment at T1 is provided in Dataset S4.

At T2, the presence of *Ganaspis* sp. induced upregulation of ten genes, but no genes were downregulated (Fig. 2C; Dataset S5). The upregulated genes included the stress response genes *TotA*, *TotB*, *TotC* and *victoria*, but also *PPO3*; log<sub>2</sub>FC of these genes ranged 3–10. Five genes were shared between the two time points (Fig. 2C). Two of them, CG10232 and CG33225 are predicted to be involved in proteolysis, and CG43085 has no function or prediction assigned. The other two genes were *PPO3* and *TotA*; their log<sub>2</sub>FC were higher at T1 than at T2. In general, immune functions were upregulated by *Ganaspis* sp. parasitism at both time points (Fig. 2D).

### Response of *D. melanogaster* to *Spiroplasma*

The sole presence of *Spiroplasma* (i.e.,  $S^-W^-$  vs.  $S^+W^-$  comparison) at 24 h PWA did not reveal any upregulated genes, but 27 were downregulated (blue set in Fig. 3A). Twenty of 27 downregulated genes are reported as preferentially expressed in adult testis (Dataset S4). At 72 h PWA, the presence of *Spiroplasma* induced upregulation of 16 and downregulation of 1,476 genes (blue set in Fig. 3B). Only downregulated genes (692 of the 1,476) were assigned to one or more of 71 GO categories (Dataset S5). Some of these categories are related to the energy generation process such as oxidative phosphorylation, pyruvate metabolic process, and glycolytic process. Among the most enriched categories were male gamete generation and spermatogenesis, which is in agreement with the expected lack of males in  $S^+W^-$  treatments. In addition, 1,333 of the 1,476 downregulated genes at T2 are classified as preferentially upregulated in fly testis. Furthermore, the cpm values of ~78% of these genes in all replicates of the  $S^+W^-$  treatment





**Figure 3** Patterns of differentially expressed genes of *Drosophila* in the *Spiroplasma*- *L. heterotoma* (Lh) interaction. Unique and shared number of DE genes in each of three treatment comparisons (superscript letters refer to groups defined below). S<sup>-</sup>W<sup>-</sup> = *Spiroplasma*-free and wasp-free; S<sup>+</sup>W<sup>-</sup> = *Spiroplasma*-infected (S<sup>+</sup>) and wasp-free (W<sup>-</sup>); S<sup>-</sup>Lh = *Spiroplasma*-free (S<sup>-</sup>) and parasitized by wasp *L. heterotoma* (Lh); S<sup>+</sup>Lh = *Spiroplasma*-infected (S<sup>+</sup>) and parasitized by wasp *L. heterotoma* (Lh). (A) Time-point 1 (T1): 24 h post-wasp attack (PWA). (B) Time-point 2 (T2): 72 h PWA. Black and empty triangles indicate up- and downregulation, respectively, in the treatment that is underlined. Blue sets = effect of *Spiroplasma* in the **absence** of wasps. Red sets = effect of wasp *L. heterotoma* in the **absence** of *Spiroplasma*. Green sets = effect of *Spiroplasma* in the **presence** of wasp *L. heterotoma*. (C) Heatmap of candidate genes involved in the *Spiroplasma* mediated protection mechanism (at T2 only); Z-score of edgeR TMM-normalized values are shown. Three main clusters are identified. Group A (yellow background) contains four genes exclusively downregulated in the green set, and exclusively upregulated in the red set. Group B (grey background) contains seven genes exclusively upregulated in the green set, and exclusively downregulated in the red set, plus *Fbp2* (upregulated in the blue and green sets). Collectively, we refer to Groups A and B as “restored” (see text). Group C (pink background) contains five genes exclusively upregulated in the green set, plus *TotC* (upregulated in the red and green sets). Group C genes had the highest expression level in the presence of *Spiroplasma* and Lh (S<sup>+</sup>Lh), whereas the other three treatments had levels similar to each other. [Full-size](#) DOI: 10.7717/peerj.11020/fig-3

were <1, implying very low expression levels. Therefore, as expected, a large number of the genes with lower expression in the *Spiroplasma* treatment, including the *roX1* and *roX2* (exclusively expressed in males, and part of the dosage compensation system; reviewed in *Lucchesi & Kuroda, 2015*), may simply reflect the absence of males. For the remaining downregulated genes that are not reported as having male-biased gene expression, it is not possible to determine whether they are *Spiroplasma*-responsive vs.

sex-biased genes, because RNAseq studies comparing female vs. male larvae at this stage are lacking.

### ***Drosophila* gene expression during *Spiroplasma*–*L. heterotoma* interaction**

To explore if the presence of *Spiroplasma* influences gene expression of *D. melanogaster* during parasitism by *L. heterotoma*, we adopted the following strategy to identify genes whose expression was specifically influenced by the *Spiroplasma* X *L. heterotoma* interaction. We used a Venn diagram depicting differentially expressed genes from the following three pairwise treatment comparisons. Comparison  $S^-W^-$  vs.  $S^+W^-$  (blue sets in Fig. 3), represents the effect of *Spiroplasma* in the absence of any wasp. Comparison  $S^-W^-$  vs.  $S^-Lh$  (red sets), represents the effect of *L. heterotoma* in the absence of *Spiroplasma*. Comparison  $S^-Lh$  vs.  $S^+Lh$  (green sets) represents the effect of *Spiroplasma* in the presence of Lh. Genes that fell in the exclusive part of this green set were initially deemed as influenced specifically by the *Spiroplasma* X *L. heterotoma* interaction. These genes were further evaluated with heatmaps of expression levels at each replicate of the four relevant treatments ( $S^-W^-$ ,  $S^+W^-$ ,  $S^-Lh$  and  $S^+Lh$ ). Genes that fell in the intersection of the green set with one or both of the blue and red sets, were also further evaluated with heatmaps. In general, the heatmaps allowed us to prioritize genes of interest based on their behavior in the context of the other treatments (see below), and based on relatively low among-replicate variation.

The  $S^-Lh$  vs.  $S^+Lh$  comparison at T1 yielded zero up- and 18 exclusively down-regulated genes (exclusive green set in Fig. 3A, Dataset S4). Ten of these genes code for small nucleolar RNAs (snoRNA). Five other genes (*fest*, *CG10063*, *SkpC*, *eIF4E3* and *cona*), albeit exclusively downregulated in the *Spiroplasma*–*L. heterotoma* interaction, seem to be influenced by *Spiroplasma* alone, based on the observation that these genes were downregulated by *Spiroplasma* alone at the later time point T2 (Dataset S5). Furthermore, *fest* and *eIF4E3* are upregulated in testis, and thus their downregulation may simply reflect absence of males.

The only gene-containing intersection (green+blue; Fig. 3A) at T1 had 19 genes, of which 16 are preferentially expressed in adult testis (Dataset S4). The heatmap of all genes in the intersection (Fig. S4), revealed that most of them had similarly low levels of expression in the two *Spiroplasma*-infected treatments (i.e.,  $S^+W^-$  and  $S^+Lh$ ), compared to the  $S^-W^-$ , which had the highest; a pattern that could be attributed to the absence of males in the *Spiroplasma* treatments. In turn, the  $S^-Lh$  treatment exhibited an intermediate expression level (Fig. S4). In other words, expression levels among the four treatments were:  $S^-W^- > S^-Lh > S^+W^- = S^+Lh$ . We hereafter for simplicity we loosely refer to genes with such an expression pattern as “Lh-affected male gonad genes”.

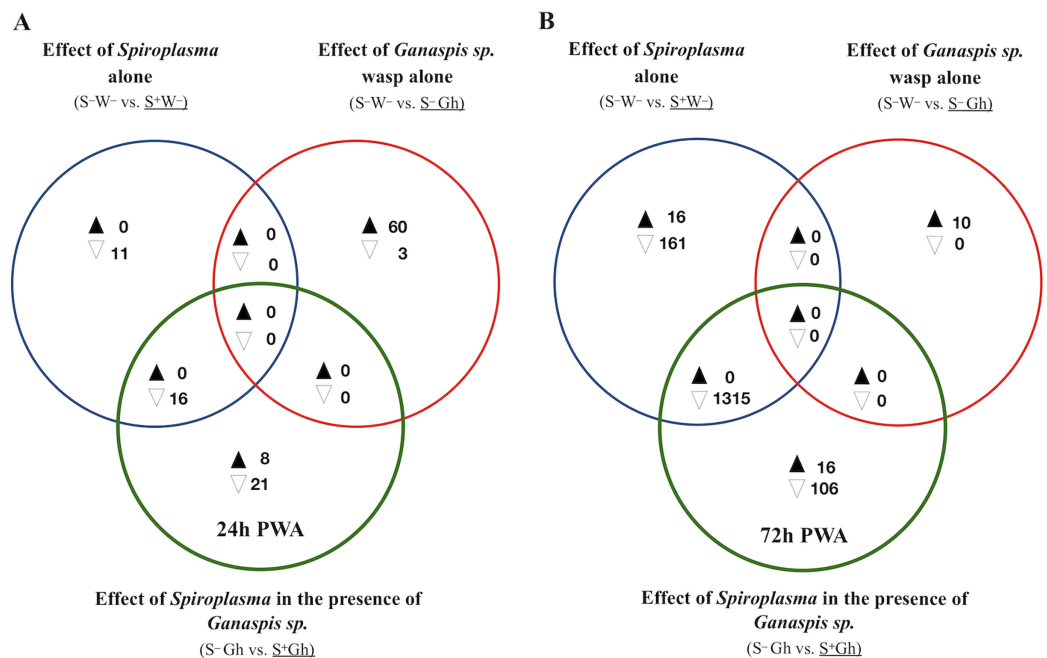
At T2, 11 genes were exclusively downregulated in the presence of *Spiroplasma* and wasp ( $S^+Lh$ ) compared to only wasp ( $S^-Lh$ ); that is, in the exclusive green set (Fig. 3B; Dataset S5). Of these, four (identified as Group A with yellow highlight and superscript “A”) were exclusively upregulated in presence of wasp ( $S^-Lh$ ) compared to no wasp ( $S^-W^-$ ) (exclusive red set in Fig. 3B; Dataset S5). Also at T2, 21 genes were exclusively

upregulated in the  $S^+Lh$  treatment compared to  $S^-Lh$  (exclusive green set). Of these 21 genes, seven (assigned to “Group B”; superscript “B” and grey highlight) were exclusively downregulated in  $S^-Lh$  compared to the *Spiroplasma*-free and wasp-free control ( $S^-W^-$ ); that is, in the exclusive red set. Hereafter, we refer to genes in Groups A and B as “restored” because parasitism by *L. heterotoma* ( $S^-Lh$ ) increased and decreased (respectively) their expression with respect to the  $S^-W^-$  control, but in the presence of *Spiroplasma* plus *L. heterotoma* (i.e., the  $S^+Lh$  treatment), expression levels appear to return to those observed in the control ( $S^-W^-$ ; Fig. 3C). In other words, *Spiroplasma* appears to “buffer” or counter the effects caused by the presence of *L. heterotoma*. Visual inspection of heatmaps of the remaining genes in the exclusive green set (not shown) or in the intersections with the green set (Figs. S5 and S6) revealed the following additional genes with expression patterns suggestive of an effect of the interaction of *Spiroplasma* and *L. heterotoma*. *Fbp2*, from the blue+green intersection, clustered with the Group B genes. *TotC*, from the red+green intersection, along with five genes exclusively upregulated in the green set, clustered into Group C (labeled with superscript “C” and pink highlight in Figs. 3B and 3C). Group C genes exhibit the highest expression level in the  $S^+Lh$  treatment.

A heatmap of the remaining exclusive DE genes (green set, Fig. 3B) that do not belong to Groups A–C (nine up- and seven down-regulated, Fig. S13), did not show relevant expression patterns when compared to the other treatments and taking into account variation among replicates. Among these exclusively upregulated genes was the antimicrobial peptide *Attacin-C* (*AttC*; FC = 1.5); the only DE gene associated with an immune function. Finally, all of the genes in the red+blue+green intersection (386 genes) and most of the genes in the blue+green intersection (143 genes) at T2 (Fig. 3B), are enriched in male gonads (Dataset S5) and exhibited the expression pattern observed in the “Lh-affected male gonad genes” (Figs. S5 and S6).

### ***Drosophila* gene expression during *Spiroplasma*–*Ganaspis* sp. interaction**

To identify fly genes specifically influenced by the *Spiroplasma*–*Ganaspis* sp. interaction, we adopted the same Venn diagram plus heatmaps strategy as with the *Spiroplasma*–*L. heterotoma* interaction, except that the *L. heterotoma* treatments were replaced with *Ganaspis* sp. treatments (see Fig. 4). Excluding genes induced by the sole presence of *Spiroplasma* or *Ganaspis* sp., resulted in eight and 21 exclusively up- and down-regulated (respectively) genes at T1 (exclusive green set, Fig. 4A, Dataset S4). The eight upregulated genes were: four snoRNA (*CR33662*, *CR34611*, *CR34616* and *CR34631*), one small nuclear RNA (*CR32162*), lysozyme E, diphthamide methyltransferase (*Dph5*) and mitochondrial ribosomal protein S14 (*mRpS14*). Among the 21 downregulated genes were *DnaJ-1* (whose product is a cofactor of heat shock proteins), *starvin* (which acts as co-chaperone of Hsp70 proteins), *nervana 3* (which codes for one subunit of a sodium-potassium pump), *nanos* (which encodes a ribosomal RNA-binding protein), and one long non-coding RNA (*CR31400*). A heatmap of the exclusive genes (Fig. S14), did not reveal any interesting expression pattern in comparison with other treatments.



**Figure 4** Patterns of differentially expressed genes of *Drosophila* in the *Spiroplasma*-*Ganaspis sp.* (Gh) interaction. Unique and shared number of DE genes in each of three treatment comparisons. S<sup>-</sup>W<sup>-</sup> = *Spiroplasma*-free and wasp-free; S<sup>+</sup>W<sup>-</sup> = *Spiroplasma*-infected (S<sup>+</sup>) and wasp-free (W<sup>-</sup>); S<sup>-</sup>Gh = *Spiroplasma*-free (S<sup>-</sup>) and parasitized by wasp *Ganaspis sp.* (Gh); S<sup>+</sup>Gh = *Spiroplasma*-infected (S<sup>+</sup>) and parasitized by wasp *Ganaspis sp.* (Gh). (A) Time-point 1 (T1): 24 h post-wasp attack (PWA). (B) Time-point 2 (T2): 72 h PWA. Black and white filled triangles indicate up- and downregulation, respectively, in the treatment that is underlined. Blue sets = effect of *Spiroplasma* in the **absence** of wasps. Red sets = effect of *Ganaspis sp.* wasp. in the **absence** of *Spiroplasma*. Green sets = effect of *Spiroplasma* in the **presence** of *Ganaspis sp.* wasp. Full-size DOI: 10.7717/peerj.11020/fig-4

At T1, only one intersection (green+blue) contained genes; all downregulated ( $n = 16$ ; Fig. 4A). A heatmap of expression levels of these 16 genes (Fig. S7) reveals that the two *Spiroplasma* treatments (S<sup>+</sup>Gh and S<sup>+</sup>W<sup>-</sup>) have similarly low expression levels, whereas the two treatments lacking *Spiroplasma* (S<sup>-</sup>W<sup>-</sup> and S<sup>-</sup>Gh) have similarly high expression levels; implying that there is no influence of *Ganaspis sp.* on expression of these genes. Three of the downregulated genes are involved with male functions (*msh-2*, *roX1* and *roX2*), one gene (*blanks*) is highly expressed in adult testis, and three other genes (*RpL22-like*, *RpS5b* and *RpS19b*) code for ribosomal proteins (Dataset S4).

At T2, 16 and 106 genes were exclusively up- and down-regulated (respectively) in the S<sup>+</sup>Gh treatment (exclusive green set in Fig. 4B, Dataset S5). The 16 exclusively upregulated genes included three mitochondrially-encoded genes (*ND1*, *CoIII* and *CoI*), *necrotic* (which is negative regulator of the Toll pathway; Green et al., 2000), *dumpy* (which is involved in wing development), and one multidrug resistance gene (*Mdr50*). The 106 exclusively downregulated genes did not group in any GO category, making it difficult to link these genes to informative biological functions. The expression values of several of these genes in the S<sup>+</sup>Gh treatment is similar to S<sup>+</sup>W<sup>-</sup> treatment (Fig. S8). This observation, along with the report that 74 of these genes are highly expressed in adult testis (Dataset S5), suggests that observed expression patterns are likely influenced solely

by the presence of *Spiroplasma*. The heatmap of the 16 exclusively upregulated genes (Fig. S9), also indicates a possible influence of only *Spiroplasma*. These genes showed a trend of higher expression levels in the S<sup>+</sup>W<sup>-</sup> treatment relative to the S<sup>-</sup>W<sup>-</sup> treatment, but this difference was not significant, possibly due to the high variation among S<sup>+</sup>W<sup>-</sup> replicates.

Only one intersection at T2 (green + blue sets) contained genes ( $n = 1315$ ; all down-regulated; Fig. 4B). These genes are associated with spermatid differentiation/development functions and 1,214 of these 1,315 are predominantly expressed in the adult testis (Dataset S5). Thus, their lower expression in the presence of *Spiroplasma* (with or without *Ganaspis* sp.; see Fig. S10) is likely simply the result of an absence of males in these treatments. An expression pattern akin to the “Lh-affected male gonad genes” was not observed in the case of wasp *Ganaspis* sp.

### Expression of *Spiroplasma* RIP proteins and evidence ribosomal damage

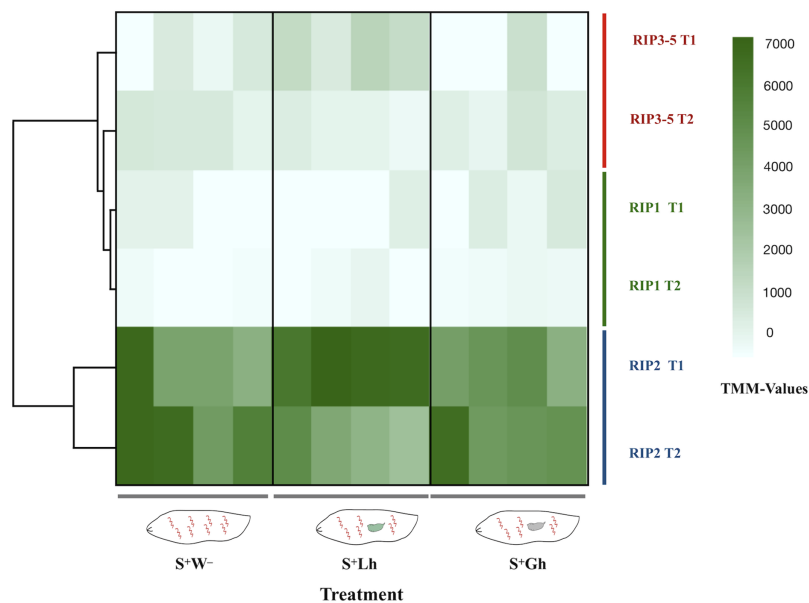
The total number of reads mapped to *Spiroplasma* excluding ribosomal sequences, was very low (range = 1,080–17,826 per replicate, Table S2). No DE genes were detected, but this could be a reflection of lack of power. For differential gene expression analyses in bacteria, a minimum of four-five million reads per replicate has been recommended (Haas et al., 2012). Due to the relevance of RIP genes in *Spiroplasma* (Ballinger & Perlman, 2017), we examined the read counts of the five RIP genes encoded in the sMel genome, which revealed that the gene encoding RIP2 was the most highly expressed at both time points and in all treatments (Fig. 5).

To corroborate the observed patterns of RIP gene expression based on the RNA-seq data, RT-qPCR assays were conducted using both the Uganda (UG) and Brazil (BR) *Spiroplasma* sMel strains, and the two wasps, *Ganaspis* sp. and *L. heterotoma*. Consistent with the RNA-seq results, the gene encoding RIP2 was the most highly expressed of the RIP genes in both *Spiroplasma* strains regardless of the presence or absence of wasp (Fig. 6; Dataset S2). The full output of the statistical analyses is provided in Supplemental File 1.

A significantly lower percentage of adenines (i.e., evidence of depurination) at the 28S rRNA site targeted by RIPs was only detected in the wasp *L. heterotoma* in the presence of *Spiroplasma* at the time point T2 ( $X^2 = 128.58$ ,  $df = 1$ ,  $P < 2.2E-16$ ; Fig. S11 and Table S3). Evidence consistent with *Spiroplasma*-induced depurination was not detected in ribosomal RNA of the wasp *Ganaspis* sp. or *D. melanogaster* (Figs. S11 and S12; Tables S3 and S4).

## DISCUSSION

To investigate the mechanism by which *Spiroplasma* protects *Drosophila* against wasps, we used an RNA-seq approach to evaluate the transcriptomic response of *D. melanogaster* during interactions involving *Spiroplasma* and two parasitic wasps that differ in their susceptibility to *Spiroplasma*: the *Spiroplasma*-susceptible *L. heterotoma* whose development is obliterated by *S. poulsonii*; and the *Spiroplasma*-resistant *Ganaspis* sp.

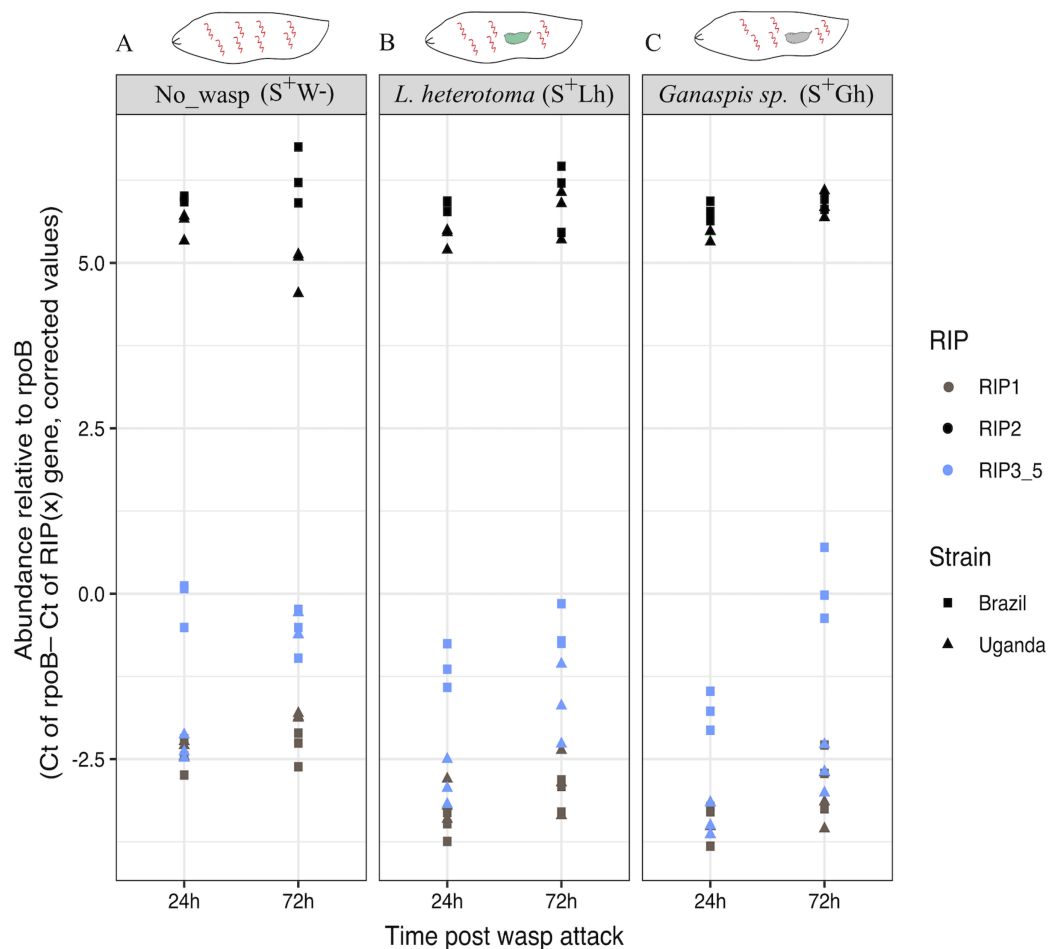


**Figure 5** RNA-seq expression levels of the *Spiroplasma* ribosome inactivating protein (RIP) genes. Expression of the five RIP genes in *D. melanogaster* larvae in the absence of wasp parasitism ( $S^+W^-$ ), during parasitism by *L. heterotoma* ( $S^+Lh$ ) or *Ganaspis* sp. ( $S^+Gh$ ), at 24 h (T1) or 72 h (T2) post-wasp attack (PWA). Values of TMM edgeR normalized counts are shown. Because the RIP3, RIP4 and RIP5 genes are identical at the nucleotide level, their collective expression levels were reported under the label “RIP3-5”. [Full-size !\[\]\(1679558f37f6db0dd8360a2a7e913e90\_img.jpg\) DOI: 10.7717/peerj.11020/fig-5](https://doi.org/10.7717/peerj.11020/fig-5)

(G1FL) whose success is unaffected by *S. poulsonii* (Xie et al., 2014; Mateos et al., 2016). The RNAseq approach employed ribodepletion rather than poly-A tail enrichment, with the purpose of recovering both host and *Spiroplasma* mRNA reads. We also used qPCR to evaluate the effect of wasp parasitism on the expression of *Spiroplasma* RIP genes in two closely related substrains of sMel. The RNAseq data were also used to assess the level of ribosomal RNA depurination (i.e., the expected damage induced by RIPs) in the two wasps.

### The adopted ribodepletion procedure is not an ideal strategy for dual transcriptomics in the *Drosophila*–*Spiroplasma* system

In an attempt to recover mRNA reads from both host and symbiont (also known as “dual transcriptome”), we generated RNA-seq libraries avoiding poly-A-tail enrichment step, typically used for eukaryotic mRNA analyses. Our strategy aimed at removal of ribosomal RNA from both host and symbiont by using the RiboZero Epidemiology kit, which is expected to deplete ribosomal RNA from both bacteria and eukaryotes. A previous application of a similar ribodepletion kit reported removal of >90% of the rRNA sequences of *Drosophila ananassae* (Kumar et al., 2012). In contrast, in our study the reads that mapped to rRNA genes comprised 3.4–78% of the total reads mapped to *D. melanogaster*, indicating a variable and ineffective degree of ribosomal RNA depletion. Furthermore, by evaluating the pattern of reads mapped to the 28S rRNA gene, we found that ribodepletion effectiveness varied by region of the gene (see Fig. S12). We suggest that



**Figure 6** qPCR gene expression of the Ribosome Inactivating Protein (RIP) genes in *D. melanogaster* larvae. (A) Expression of the five RIP genes in the absence of wasp (No\_wasp, S<sup>+</sup>W<sup>-</sup>). (B) During parasitism by *L. heterotoma* (S<sup>+</sup>Lh). (C) During parasitism by *Ganaspis sp.* (S<sup>+</sup>Gh). at 24 or 72 h post-wasp attack (PWA). Two different *S. poulsonii* strains were evaluated: sMel-BR and sMel-UG. RIP2 was consistently expressed at a significantly higher level than RIP1 and RIP3-5 in all wasp treatments, time points, and *Spiroplasma* strains (Tukey HSD  $P < 0.05$ ). Because the RIP3, RIP4 and RIP5 genes are identical at the nucleotide level, their collective expression levels were reported under the label “RIP3\_5”. [Full-size !\[\]\(fd7fe780e8fd8eece60268c87d0c3e04\_img.jpg\) DOI: 10.7717/peerj.11020/fig-6](https://doi.org/10.7717/peerj.11020/fig-6)

future applications of ribodepletion in *D. melanogaster* consider including additional probes to capture such regions with higher efficiency. Even if more effective depletion of fly rRNA had been achieved, it is possible that our sequencing effort still would have been inadequate for DE analyses of *Spiroplasma*. Concerning detection of DE genes of *Drosophila*, we acknowledge that according to the power analyses, we are expected to miss DE genes with fold-changes below 3. With the estimated coefficients of variation from our dataset (i.e., BCV range ~0.3–0.4), achieving a power of ~93% for genes with fold-change of 2 would require 5–8 replicates with 100X coverage (or 7–10 replicates with 20X coverage). Notwithstanding these limitations, our results revealed expression patterns consistent with expectations from the known phenotypes induced by *Spiroplasma* and by the wasps.

## Response of *D. melanogaster* to parasitism by *L. heterotoma* or *Ganaspis* sp. in the absence of *Spiroplasma*

The two wasp species used in this study, *L. heterotoma* and *Ganaspis* sp., belong to the same family (Figitidae), but their parasitism strategies are quite different ([Schlenke et al., 2007](#); [Mortimer et al., 2013](#)). Our fly transcriptome analysis also revealed differences in the effects of these wasps. We detected evidence of host immune activation by *Ganaspis* sp., but not by *L. heterotoma*. It is possible, however, that *L. heterotoma* induces immune response at levels below those detectable by our experiments. Our results revealed that *L. heterotoma* induces genes related to energy production, which could be a strategy of the wasp to obtain more resources from the host. On the other hand, it may reflect energy investment for a fly function such as immune response, which is energetically expensive ([Schlenke et al., 2007](#); [Dolezal et al., 2019](#)). If it indeed reflects investment in immune functions, these have not been detected (this study; [Schlenke et al., 2007](#)) and are unsuccessful, as the fly generally does not survive attacks by this strain of *L. heterotoma* ([Xie et al., 2014](#); [Jones & Hurst, 2020b](#)).

The *L. heterotoma*-induced downregulation of genes related to spermatogenesis; a phenomenon not induced by *Ganaspis* sp., is an interesting contrast between the two wasps. In accordance with our results, [Schlenke et al. \(2007\)](#) reported downregulation of genes involved with gonad development during parasitism by *L. heterotoma* and *L. boulandi*, albeit at earlier stages. These two independent observations suggest that *L. heterotoma* might induce castration of male hosts. [Xie et al. \(2011\)](#) reported that *Drosophila hydei* males (infected with a non-male-killing strain of *Spiroplasma*) that survived parasitism by *L. heterotoma* (Lh14) had extremely reduced fecundity, but the experiments could not rule out causes other than castration. The phenomenon of male castration has only been reported in parasitoids of the family Braconidae, where the polydnavirus present in the wasp venom induces testis degradation (reviewed in [Beckage & Gelman, 2004](#)).

This study is the second one to use a genome-wide approach to evaluate gene expression of *D. melanogaster* in response to *L. heterotoma*. The first one was conducted by [Schlenke et al. \(2007\)](#) and employed microarrays with *D. melanogaster* Oregon-R strain at time points earlier than 24h PWA. In their latest time point (22–24 h PWA), [Schlenke et al. \(2007\)](#) found 37 DE genes ( $P < 0.01$ ,  $-0.5 > FC > 1.0$ ; fold-changes for genes DE at a  $P < 0.05$  were not reported). At a similar time point (our T1), we detected only one DE gene (*thor*), which was not detected by [Schlenke et al. \(2007\)](#). We note that we detected expression of all but one of the 37 DE genes reported by [Schlenke et al. \(2007\)](#). Differences between our results and those of [Schlenke et al. \(2007\)](#) may be attributable to the different methodology (e.g., microarrays vs. RNAseq, different software pipelines and cutoff parameters), or lack of power, particularly to detect DE genes with low FC values and low CPM values (Sheet “Schlenke: FC” in [Dataset S4](#) shows our CPM and FC values for these 37 genes, and FC values reported by [Schlenke et al. \(2007\)](#) for comparison). Other potential differences could be related to *Drosophila* genotypes or *Wolbachia* infection status (i.e., presence/absence), or other experimental conditions or



their interactions. The collective evidence from both studies suggests that parasitism by *L. heterotoma* does not induce a detectable immune response in *D. melanogaster*, likely as a result of this wasp's effective strategies to counter the host's defenses (Schlenke et al., 2007).

In a different scenario, parasitism by *Ganaspis* sp. induced the Jak/Stat pathway, one of the immune pathways of *D. melanogaster*. Effectors of this pathway (*Tot* and *Tep* genes) were highly upregulated. *Tep* proteins play an immune role in the mosquito *Anopheles gambiae* against the parasite *Plasmodium berghei* (Blandin et al., 2004). In *D. melanogaster*, deletion of *Tep 1–4* genes impaired resistance against two Gram-positive bacteria and increased the survival of the wasps *L. bouleardi* and *Asobara tabida* (Dostálová et al., 2017). The function of *Tot* genes is generally unknown, but they belong to a family of eight genes that are activated by stressful conditions such as bacterial challenge, high temperatures, mechanical pressure, or UV radiation (Ekengren & Hultmark, 2001). Furthermore, one of these genes (*TotM*) enhances immunity against the sexually transmitted fungus *Metarhizium robertsii* (Zhong et al., 2013). Parasitism of *D. melanogaster* by the wasps *L. bouleardi* (Schlenke et al., 2007) and *A. tabida* (Salazar-Jaramillo et al., 2017) also induce the up-regulation of *Tep* and *Tot* genes, suggesting that upregulation of these genes could be a common response against wasp parasitism. Another potential signal of immune activation against *Ganaspis* sp. is the induction of genes encoding serine proteases, because these enzymes are involved in triggering immune response in insects (reviewed in Alvarado et al., 2020). The melanization cascade, another feature of the *D. melanogaster* immune response, also appears to be activated by *Ganaspis* sp., as two components of this cascade (*PPO3* and *yellow-f*) were up-regulated. Finally, the upregulation of genes that are known to be expressed preferentially in hemocytes (i.e., *PPO3*, *ItgaPS4* and *he*), or involved in hemocyte proliferation (i.e., *pvf2*) implies that hemocytes are activated by *Ganaspis* sp. parasitism. In accordance with this, Mortimer et al. (2013) showed that the number of lamellocytes increases during parasitism by the same *Ganaspis* sp. strain used in the present study. Even though *D. melanogaster* appears to mount an immune response against *Ganaspis* sp., the response is inadequate, as ~100% of flies parasitized by this wasp die (Mortimer et al., 2013; Mateos et al., 2016). The reason likely lies in that the venom of this wasp contains a calcium ATPase that prevents activation of plasmatocytes; a necessary early step of the encapsulation process (Mortimer et al., 2013).

### **Response of *D. melanogaster* to parasitism by *L. heterotoma* or *Ganaspis* sp. in the presence of *Spiroplasma***

If the fly contributes to the death of *L. heterotoma* that occurs in the presence of *Spiroplasma*, examination of the transcriptomic response of the fly during the *Spiroplasma*–*L. heterotoma* interaction might reveal signals of such wasp-inhibiting fly functions. The fly transcriptomic response in the *Spiroplasma*–*Ganaspis* sp. interaction (where the wasp success is unaffected by *Spiroplasma*), provides a contrast point representing a *Spiroplasma*-resistant wasp. Our analyses revealed several sets of genes whose expression appears to be influenced specifically by the interaction between the

*Spiroplasma* and *L. heterotoma* treatments. None of these genes, with exception of attacin-C (*AttC*), were associated with an immune function in *D. melanogaster*. We thus infer that the *Spiroplasma*-mediated wasp-killing mechanism is not strongly influenced by host-encoded immunity, at least at a level detectable by our experiments. Consistent with our findings, an RNA-seq analysis of *Spiroplasma* protection against nematodes in *D. neotestacea* did not detect changes in the host's immune response (Hamilton et al., 2014). Similarly, Paredes et al. (2016) did not detect an increased cellular response, based on the number of hemocytes, during the *Spiroplasma*-*L. bouleardi* interaction. The lack of detectable influence of *Spiroplasma* on host-encoded immunity is consistent with evidence that *Spiroplasma* is not detected as an intruder by the fly, due to the lack of cell wall, where the typical bacterial immune elicitors are found (Hurst et al., 2003; Herren & Lemaitre, 2011).

Regarding the “Lh-affected male gonad genes”, we consider them unlikely candidates for *Spiroplasma*-mediated protection mechanism, because their expression pattern (i.e.,  $S^-W^- > S^-Lh > S^+W^- = S^+Lh$ ) and their reported male-gonad-biased gene expression, seem best explained by: absence of males in the two *Spiroplasma* treatments (i.e., those with the lowest expression levels); and interference of *L. heterotoma* with male gonad development (i.e., with intermediate expression levels).

The remaining genes with apparent influence by the interaction between the *Spiroplasma* and *L. heterotoma* treatments were those assigned to Groups A–C (Fig. 3). These genes could be involved in the *Spiroplasma*-mediated mechanism that leads to the death of *L. heterotoma* or fly survival, or could reflect a side effect of the *Spiroplasma*-*L. heterotoma* interaction. Group A and Group B (Fig. 3) were comprised of 12 genes whose expression patterns appear to be “restored” in the *Spiroplasma* plus *L. heterotoma* ( $S^+Lh$ ) treatment, and do not exhibit such an expression pattern in the context of the *Spiroplasma*-resistant wasp *Ganaspis* sp. The four genes in Group A had relatively low fold changes ( $<2$ ), and, only two had annotations; *CG42494* is predicted to have chitin-binding activity, whereas *Cyp4d14* encodes a cytochrome P450 domain. Cytochrome P450 are a large family of proteins that is involved in detoxification, but also in developmental processes (Chung et al., 2009). For both of these genes, expression levels are reported to decrease between the L3 and pupa transition. Therefore, if the  $S^-Lh$  treatment were developmentally delayed with respect to the  $S^+Lh$  treatment (see discussion below), our observed expression patterns may simply be a consequence of development time differences between the treatments, rather than a cause of wasp death or enhanced fly survival. Furthermore, if the detoxification function of *Cyp4d14* were relevant to the *Spiroplasma*-mediated protection mechanism, we would expect higher expression in the  $S^+Lh$  than in the  $S^-Lh$  treatment, which is contrary to our observations.

Genes in Group B exhibit a substantial increase in expression in wild type flies during the larva-to-pupa transition according to flybase (Thurmond et al., 2019). Therefore, our observed expression patterns could simply reflect slight differences in fly development time, where *L. heterotoma* slows down host development, but presence of

*Spiroplasma* “restores” development time to that of the unparasitized host. In partial support of this hypothesis, larvae parasitized by *L. heterotoma* and *L. boulardi* pupate ~2 days later than the unparasitized controls (Schlenke *et al.*, 2007). Whether *Spiroplasma* counteracts the wasp-induced delay in development remains to be determined. Given its possible function as a sulfur-storage protein (Meghlaoui & Veuille, 1997), increased expression of *Fbp2* might reflect a greater availability of nutrients for the fly, which might enhance its tolerance to insults from the wasp.

Genes in Group C had the highest expression level in the S<sup>+</sup>Lh treatment (Fig. 3C), which could suggest a role during *Spiroplasma*-*L. heterotoma* interaction. The six genes in this group are: one amylase (*Amy-p*); one trypsin inhibitor (CG42716); an RNA pseudogene (CR41609); a gene referred to as “withdrawn” in Flybase (FBgn0085817); *TotC* and a gene predicted to contain a DNAJ domain (CG32640). DNAJ domains are characteristic of co-chaperones, which are proteins that bind to chaperones stimulating ATP hydrolysis (Cheetham & Caplan, 1998). Chaperones in turn are involved in correct protein folding, but also are activated during stressful conditions to prevent cellular damage stress (Voth & Jakob, 2017). Based on their association to “response to stress”, increased expression of *TotC* and the DNAJ-domain-containing gene may contribute to increasing the fly’s tolerance to the wasp parasitism. In addition, *TotA* (FBgn0028396), another stress responsive gene, was upregulated but with an FDR value slightly above our cutoff (0.053; Sheet “All genes: S<sup>-</sup>Lh vs. S<sup>+</sup>Lh T2”; Dataset S6).

A caveat to our interpretations is that genes influenced by the interaction of *Spiroplasma* X wasp treatments could also reflect sex differences in response to wasp parasitism, due to the mixed sex (*Spiroplasma*-free) vs. all female (*Spiroplasma*-infected) comparisons. Evidence of sex differences in immunity against other natural enemies has been reported (reviewed by Belmonte *et al.*, 2020). Further studies controlling for sex (e.g., separating males and females in the *Spiroplasma*-free treatment) are needed to address this. Similarly, due to the (unintended) presence of *Wolbachia* in the flies used in the RNAseq analysis, we cannot rule out that *Wolbachia* influences expression of the genes of interest via interactions with the *Spiroplasma* and/or the wasp treatments. It is also possible that the genes of interest are influenced by an interaction between the presence of *Spiroplasma* and the injury effect of wasp oviposition. Nonetheless, the genes deemed as influenced by the *Spiroplasma* × *L. heterotoma* interaction, were not influenced by the interaction of *Spiroplasma* with the other wasp (*Ganaspis* sp.), suggesting that the detected expression patterns are not simply the result of *Spiroplasma* × “injury”. Despite the above limitations, we uncovered a set of candidate genes and phenomena that can be further explored in understanding the *Spiroplasma*-mediated protection mechanism. Experimental manipulation of gene expression of these candidate genes in the absence of *Spiroplasma*, could be used to test whether they influence the outcome of parasitism by *L. heterotoma* and other wasps, including those against which *Spiroplasma* sMel seems to confer stronger rescue (e.g., *L. boulardi* or *L. victoriae*; Mateos *et al.*, 2016; Paredes *et al.*, 2016; Jones & Hurst, 2020a). Furthermore, detailed analyses on the effects of *Spiroplasma* and wasps on fly development time are warranted.

## RIP expression

Concerning the hypothesis that a *Spiroplasma*-encoded toxin contributes to killing of *Spiroplasma*-susceptible wasps, we found evidence that neither wasp influences expression of RIP genes, but RIP2 gene was highly expressed in contrast to RIP1 or RIP3-5. In a previous report in the absence of parasitism, RIP2 was the most highly expressed of the RIP genes throughout the fly life cycle (only substrain Uganda was examined; [Garcia-Arreaez et al., 2019](#)). The only context where relatively lower expression of RIP2 and RIP1 in sMel has been reported is in the case of a transcriptome comparison of in vitro culture versus fly hemolymph ([Masson et al., 2018](#)), implying that expression of these genes can be regulated. The expression of RIP genes in context of other *Spiroplasma* tolerant/resistant wasps has not been determined.

Our study also reveals that both the sMel-UG and sMel-BR sub-strains of *S. poulsonii* express their RIP genes at similar levels in the presence or absence of *L. heterotoma* and *Ganaspis* sp. Although differences in the genomes of substrains sMel-UG and sMel-BR have been reported ([Gerth et al., 2021](#)), our observations suggest that at least for RIP expression patterns the two strains are very similar. Based on expression levels alone, it appears that sMel RIP2 might have a stronger role in wasp death than the other RIP genes. However, it is intriguing that the genome of sHy (the poulsonii-clade native *Spiroplasma* of *D. hydei*) does not harbor a gene with high homology to sMel RIP2. Instead, its genome encodes a gene with high homology to sMel RIP1, as well as putative RIP-encoding genes with homology to genes in *Spiroplasma* strains associated with species other than *D. melanogaster* ([Gerth et al., 2021](#)). Strain sHy is known to kill *L. heterotoma* and enhance survival of its host *D. hydei* ([Xie, Vilchez & Mateos, 2010](#)). It is thus possible that more than one of the RIPs in the *Spiroplasma* strains that kill *L. heterotoma*, contributes to wasp killing.

Detection of signals of ribosomal depurination in the *Spiroplasma*-susceptible (*L. heterotoma*) but not in the *Spiroplasma*-resistant (*Ganaspis* sp.) wasp is consistent with the hypothesis that RIP-induced depurination contributes to wasp death. [Ballinger & Perlman \(2017\)](#), using a more direct approach to evaluate depurination (i.e., qPCR), reported evidence of *Spiroplasma* (strain sMel-UG) induced depurination in *L. heterotoma*, as well as in *L. boulandi* (another *Spiroplasma*-susceptible wasp), but not in the *Spiroplasma*-resistant pupal ectoparasitic wasp (*Pachycrepoideus vindemmiae*). [Ballinger & Perlman \(2017\)](#) hypothesized that the resistance of *P. vindemmiae* to *Spiroplasma* (and to depurination) may stem from the fact that it is not immersed in *Spiroplasma*-laden hemolymph during development. This explanation, however, would not apply to *Ganaspis* sp., which is a larval endo-parasitoid that spends the initial stages of development in the host hemocoel. Whether RIP-induced depurination is necessary and sufficient to kill susceptible wasps has not been determined. Ideally, the effect of RIP on the wasp would be tested in the absence of *Spiroplasma*, or in “knocked-out” mutants in these genes. In addition, the target cells and the mechanism of entry of *Spiroplasma* RIPs has not been determined. It is unclear whether *Spiroplasma* must

colonize wasp tissues in order to deliver RIP or if toxins can be acquired during wasp feeding; both RIP1 and RIP2 proteins have been detected in the fly hemolymph (see [Garcia-Arreaez et al., 2019](#)). It is also possible that other *Spiroplasma*-encoded putative virulence factors such as chitinase (*ChiD*) or glycerol-3-phosphate oxidase (*glpO*) could contribute to wasp death ([Masson et al., 2018](#)). Presence of *glpO* in *S. taiwanense* is proposed to be the cause of its pathogenicity to mosquitoes ([Lo & Kuo, 2017](#)).

Assuming RIP is an important factor in wasp killing, the apparent lack of ribosome depurination of *Ganaspis* sp., along with the unaltered expression of RIP genes, suggest that this wasp avoids RIP-induced damage by interfering with translation of RIP mRNA, or by inactivating RIP. Resistance to RIP toxicity has been reported in Lepidoptera, and has been attributed to serine protease-mediated hydrolysis in the digestive tract ([Gatehouse et al., 1990](#)). As suggested by [Ballinger & Perlman \(2017\)](#) for *P. vindemmiae*, it is possible that conditions in the gut of *Ganaspis* sp. inactivate ingested RIPs. Alternatively, RIP proteins may be active but unable to enter *Ganaspis* sp. cells, or unable to reach the appropriate cellular compartments to damage ribosomes. It is unlikely that wasp ribosomes that come into contact with RIPs are immune to depurination because of the extremely conserved eukaryotic motif targeted by these proteins.

## CONCLUSIONS

In the absence of *Spiroplasma* infection, we found evidence of *Drosophila* immune activation by *Ganaspis* sp., but not by *L. heterotoma*, whose parasitism seems to induce host castration. Acknowledging our expected limited power to detect DE genes with low fold-changes, we identified very few genes whose expression was influenced by the *Spiroplasma*-*L. heterotoma* interaction, and they do not appear to be related to immune response. Future research is needed to determine whether these candidate genes are involved in the *Spiroplasma*-mediated mechanism that leads to wasp death or fly rescue. We also found that transcript levels of RIP toxin genes were not influenced by wasp parasitism or *Spiroplasma* strain, and that RIP2 was the most highly expressed one. We detected evidence consistent with the action of RIP toxins on the *Spiroplasma*-susceptible wasp (*L. heterotoma*), but not on the *Spiroplasma*-resistant wasp (*Ganaspis* sp.). Therefore, the mechanism by which *Ganaspis* sp. resists/tolerates *Spiroplasma* does not involve inhibition of RIP transcription.

## ACKNOWLEDGEMENTS

Texas Agrilife Genomics and Bioinformatics Services for library preparation, sequencing, and advice on handling of RNA. Luis E Servín-Garcidueñas critically reviewed the manuscript. Renato D. La Torre Ramirez for help with qPCR standard curve. Alfredo Hernández, Víctor del Moral, and Romualdo Zayas provided computing support. All bioinformatic analyses were performed on CCG-UNAM servers. This manuscript has been submitted as a preprint to Biorxiv ([DOI 10.1101/2020.08.27.270462](https://doi.org/10.1101/2020.08.27.270462)).

## ADDITIONAL INFORMATION AND DECLARATIONS

### Funding

Genomics Seed Grant to Mariana Mateos from Texas Agrilife Genomics and Bioinformatics Services, and CONACyT and Center for Genomic Sciences for sabbatical support to Mariana Mateos. Esperanza Martinez-Romero received support for this research from PAPIIT IN207718 from UNAM. Victor Manuel Higareda Alvear is a doctoral student at Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas of the Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), and received a scholarship from the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT, cvu 446829). Mariana Mateos and Cecilia Tamborindeguy received funding from Texas AgriLife genomics seed grant. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

### Grant Disclosures

The following grant information was disclosed by the authors:

Texas Agrilife Genomics and Bioinformatics Services.

CONACyT and Center for Genomic Sciences.

UNAM: PAPIIT IN207718.

Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM).

Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT): cvu 446829.

Texas AgriLife Genomics.

### Competing Interests

The authors declare that they have no competing interests.

### Author Contributions

- Victor Manuel Higareda Alvear conceived and designed the experiments, performed the experiments, analyzed the data, prepared figures and/or tables, authored or reviewed drafts of the paper, and approved the final draft.
- Mariana Mateos conceived and designed the experiments, performed the experiments, analyzed the data, prepared figures and/or tables, authored or reviewed drafts of the paper, and approved the final draft.
- Diego Cortez analyzed the data, authored or reviewed drafts of the paper, and approved the final draft.
- Cecilia Tamborindeguy conceived and designed the experiments, authored or reviewed drafts of the paper, and approved the final draft.
- Esperanza Martinez-Romero analyzed the data, authored or reviewed drafts of the paper, and approved the final draft.

### DNA Deposition

The following information was supplied regarding the deposition of DNA sequences:

The RNA raw sequences generated in this project are available at NCBI: [PRJNA577145](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuclseq/SAMN13020352), [SAMN13020352](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuclseq/SAMN13020352).

## Data Availability

The following information was supplied regarding data availability:

Raw data is available in the [Supplemental Files](#).

## Supplemental Information

Supplemental information for this article can be found online at <http://dx.doi.org/10.7717/peerj.11020#supplemental-information>.

## REFERENCES

- Agaisse H, Perrimon N. 2004.** The roles of JAK/STAT signaling in *Drosophila* immune responses. *Immunological Reviews* **198**(1):72–82 DOI [10.1111/j.0105-2896.2004.0133.x](https://doi.org/10.1111/j.0105-2896.2004.0133.x).
- Alvarado G, Holland SR, DePerez-Rasmussen J, Jarvis BA, Telander T, Wagner N, Waring AL, Anast A, Davis B, Frank A, Genenbacher K, Larson J, Mathis C, Oates AE, Rhoades NA, Scott L, Young J, Mortimer NT. 2020.** Bioinformatic analysis suggests potential mechanisms underlying parasitoid venom evolution and function. *Genomics* **112**(2):1096–1104 DOI [10.1016/j.ygeno.2019.06.022](https://doi.org/10.1016/j.ygeno.2019.06.022).
- Andrews S. 2010.** FastQC: A Quality Control Tool for High Throughput Sequence Data [Online]. Available at <http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>.
- Ballinger MJ, Perlman SJ. 2017.** Generality of toxins in defensive symbiosis: ribosome-inactivating proteins and defense against parasitic wasps in *Drosophila*. *PLOS Pathogens* **13**(7):1–19 DOI [10.1371/journal.ppat.1006431](https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006431).
- Beckage NE, Gelman DB. 2004.** Wasp parasitoid disruption of host development: implications for new biologically based strategies for insect control. *Annual Review of Entomology* **49**(1):299–330 DOI [10.1146/annurev.ento.49.061802.123324](https://doi.org/10.1146/annurev.ento.49.061802.123324).
- Belmonte RL, Corbally MK, Duneau DF, Regan JC. 2020.** Sexual dimorphisms in innate immunity and responses to infection in *Drosophila melanogaster*. *Frontiers in Immunology* **10**:1–18 DOI [10.3389/fimmu.2019.03075](https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.03075).
- Blandin S, Shiao SH, Moita LF, Janse CJ, Waters AP, Kafatos FC, Levashina EA. 2004.** Complement-like protein TEP1 is a determinant of vectorial capacity in the malaria vector *Anopheles gambiae*. *Cell* **116**(5):661–670 DOI [10.1016/S0092-8674\(04\)00173-4](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(04)00173-4).
- Bolger AM, Lohse M, Usadel B. 2014.** Trimmomatic: a flexible trimmer for illumina sequence data. *Bioinformatics* **30**(15):2114–2120 DOI [10.1093/bioinformatics/btu170](https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu170).
- Brandt JW, Chevignon G, Oliver KM, Strand MR. 2017.** Culture of an aphid heritable symbiont demonstrates its direct role in defence against parasitoids. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* **284**(1866):20171925 DOI [10.1098/rspb.2017.1925](https://doi.org/10.1098/rspb.2017.1925).
- Bray NL, Pimentel H, Melsted P, Pachter L. 2016.** Near-optimal probabilistic RNA-seq quantification. *Nature Biotechnology* **34**(5):525–527 DOI [10.1038/nbt.3519](https://doi.org/10.1038/nbt.3519).
- Caragata EP, Rancés E, Hedges LM, Gofton AW, Johnson KN, O’Neill SL, McGraw EA. 2013.** Dietary cholesterol modulates pathogen blocking by *Wolbachia*. *PLOS Pathogens* **9**(6):e1003459 DOI [10.1371/journal.ppat.1003459](https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003459).
- Carton Y, Poirié M, Nappi AJ. 2008.** Insect immune resistance to parasitoids. *Insect Science* **15**(1):67–87 DOI [10.1111/j.1744-7917.2008.00188.x](https://doi.org/10.1111/j.1744-7917.2008.00188.x).
- Cheetham ME, Caplan AJ. 1998.** Structure, function and evolution of DnaJ: conservation and adaptation of chaperone function. *Cell Stress & Chaperones* **3**:28 DOI [10.1379/1466-1268\(1998\)003<0028:SFAEOD>2.3.CO;2](https://doi.org/10.1379/1466-1268(1998)003<0028:SFAEOD>2.3.CO;2).

- Cheng B, Kuppanda N, Aldrich JC, Akbari OS, Ferree PM. 2016.** Male-killing spiroplasma alters behavior of the dosage compensation complex during *Drosophila melanogaster* embryogenesis. *Current Biology* **26**(10):1339–1345 DOI [10.1016/j.cub.2016.03.050](https://doi.org/10.1016/j.cub.2016.03.050).
- Chung H, Sztal T, Pasricha S, Sridhar M, Batterham P, Daborn PJ. 2009.** Characterization of *Drosophila melanogaster* cytochrome P450 genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **106**(14):5731–5736 DOI [10.1073/pnas.0812141106](https://doi.org/10.1073/pnas.0812141106).
- Corbin C, Jones JE, Chrostek E, Fenton A, Hurst GDD. 2021.** Thermal sensitivity of the *Spiroplasma–Drosophila hydei* protective symbiosis: the best of climes, the worst of climes. *Molecular Ecology* **69**:1–9 DOI [10.1111/mec.15799](https://doi.org/10.1111/mec.15799).
- Dolezal T, Krejčová G, Bajgar A, Nedbalová P, Strasser P. 2019.** Molecular regulations of metabolism during immune response in insects. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* **109**:31–42 DOI [10.1016/j.ibmb.2019.04.005](https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2019.04.005).
- Dostálová A, Rommelaere S, Poidevin M, Lemaitre B. 2017.** Thioester-containing proteins regulate the Toll pathway and play a role in *Drosophila* defence against microbial pathogens and parasitoid wasps. *BMC Biology* **15**(1):1–16 DOI [10.1186/s12915-016-0343-5](https://doi.org/10.1186/s12915-016-0343-5).
- Dudzić JP, Kondo S, Ueda R, Bergman CM, Lemaitre B. 2015.** *Drosophila* innate immunity: regional and functional specialization of prophenoloxidases. *BMC Biology* **13**(1):81 DOI [10.1186/s12915-015-0193-6](https://doi.org/10.1186/s12915-015-0193-6).
- Ekengren S, Hultmark D. 2001.** A family of Turandot-related genes in the humoral stress response of *Drosophila*. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **284**(4):998–1003 DOI [10.1006/bbrc.2001.5067](https://doi.org/10.1006/bbrc.2001.5067).
- García-Arreaz MG, Masson F, Escobar JCP, Lemaitre B. 2019.** Functional analysis of RIP toxins from the *Drosophila* endosymbiont *Spiroplasma poulsonii*. *BMC Microbiology* **19**(1):1–10 DOI [10.1186/s12866-019-1410-1](https://doi.org/10.1186/s12866-019-1410-1).
- Gatehouse AMR, Barbieri L, Stirpe F, Croy RRD. 1990.** Effects of ribosome inactivating proteins on insect development—differences between Lepidoptera and Coleoptera. *Entomologia Experimentalis et Applicata* **54**(1):43–51 DOI [10.1111/j.1570-7458.1990.tb01310.x](https://doi.org/10.1111/j.1570-7458.1990.tb01310.x).
- Gerardo NM, Parker BJ. 2014.** Mechanisms of symbiont-conferred protection against natural enemies: An ecological and evolutionary framework. *Current Opinion in Insect Science* **4**:8–14 DOI [10.1016/j.cois.2014.08.002](https://doi.org/10.1016/j.cois.2014.08.002).
- Gerth M, Martínez-Montoya H, Ramírez P, Masson F, Griffin JS, Aramayo R, Siozios S, Lemaitre B, Mateos M, Hurst GDD. 2021.** Rapid molecular evolution of *Spiroplasma* symbionts of *Drosophila*. *Microbial Genomics* DOI [10.1099/mgen.0.000503](https://doi.org/10.1099/mgen.0.000503).
- Green C, Levashina E, McKimmie C, Dafforn T, Reichhart JM, Gubb D. 2000.** The necrotic gene in *Drosophila* corresponds to one of a cluster of three serpin transcripts mapping at 43A1.2. *Genetics* **156**:1117–1127.
- Haas BJ, Chin M, Nusbaum C, Birren BW, Livny J. 2012.** How deep is deep enough for RNA-seq profiling of bacterial transcriptomes? *BMC Genomics* **13**(1):734 DOI [10.1186/1471-2164-13-734](https://doi.org/10.1186/1471-2164-13-734).
- Hamilton PT, Leong JS, Koop BF, Perlman SJ. 2014.** Transcriptional responses in a *Drosophila* defensive symbiosis. *Molecular Ecology* **23**(6):1558–1570 DOI [10.1111/mec.12603](https://doi.org/10.1111/mec.12603).
- Hamilton PT, Peng F, Boulanger MJ, Perlman SJ. 2015.** A ribosome-inactivating protein in a *Drosophila* defensive symbiont. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **113**(2):350–355 DOI [10.1073/pnas.1518648113](https://doi.org/10.1073/pnas.1518648113).
- Han Q, Fang J, Ding H, Johnson JK, Christensen BM, Li J. 2002.** Identification of *Drosophila melanogaster* yellow-f and yellow-f2 proteins as dopachrome-conversion enzymes. *Biochemical Journal* **368**(1):333–340 DOI [10.1042/bj20020272](https://doi.org/10.1042/bj20020272).



- Hart SN, Therneau TM, Zhang Y, Poland GA, Kocher JP. 2013. Calculating sample size estimates for RNA sequencing data. *Journal of Computational Biology* 20(12):970–978 DOI 10.1089/cmb.2012.0283.
- Harumoto T, Anbutsu H, Lemaitre B, Fukatsu T. 2016. Male-killing symbiont damages host's dosage-compensated sex chromosome to induce embryonic apoptosis. *Nature Communications* 7(1):12781 DOI 10.1038/ncomms12781.
- Haselkorn TS, Jaenike J. 2015. Macroevolutionary persistence of heritable endosymbionts: acquisition, retention and expression of adaptive phenotypes in *Spiroplasma*. *Molecular Ecology* 24(14):3752–3765 DOI 10.1111/mec.13261.
- Herren JK, Lemaitre B. 2011. Spiroplasma and host immunity: activation of humoral immune responses increases endosymbiont load and susceptibility to certain gram-negative bacterial pathogens in *Drosophila melanogaster*. *Cellular Microbiology* 13(9):1385–1396 DOI 10.1111/j.1462-5822.2011.01627.x.
- Hillyer JF. 2016. Insect immunology and hematopoiesis. *Developmental & Comparative Immunology* 58(Pt 1):102–118 DOI 10.1016/j.dci.2015.12.006.
- Hurst GDD, Anbutsu H, Kutsukake M, Fukatsu T. 2003. Hidden from the host: *Spiroplasma* bacteria infecting *Drosophila* do not cause an immune response, but are suppressed by ectopic immune activation. *Insect Molecular Biology* 12(1):93–97 DOI 10.1046/j.1365-2583.2003.00380.x.
- Irving P, Ubeda JM, Doucet D, Troxler L, Lagueux M, Zachary D, Hoffmann JA, Hetru C, Meister M. 2005. New insights into *Drosophila* larval haemocyte functions through genome-wide analysis. *Cellular Microbiology* 7(3):335–350 DOI 10.1111/j.1462-5822.2004.00462.x.
- Jaenike J, Unckless R, Cockburn SN, Boelio LM, Perlman SJ. 2010. Adaptation via symbiosis: recent spread of a drosophila defensive symbiont. *Science* 329(5988):212–215 DOI 10.1126/science.1188235.
- Jones JE, Hurst GDD. 2020a. Symbiont-mediated protection varies with wasp genotype in the *Drosophila melanogaster*–*Spiroplasma* interaction. *Heredity* 124(4):592–602 DOI 10.1038/s41437-019-0291-2.
- Jones JE, Hurst GDD. 2020b. Symbiont-mediated fly survival is independent of defensive symbiont genotype in the *Drosophila melanogaster*–*Spiroplasma*–wasp interaction. *Journal of Evolutionary Biology* 33(11):1625–1633 DOI 10.1111/jeb.13702.
- Kim D, Langmead B, Salzberg SL. 2015. HISAT: a fast spliced aligner with low memory requirements. *Nature Methods* 12(4):357–360 DOI 10.1038/nmeth.3317.
- Kumar N, Creasy T, Sun Y, Flowers M, Tallon LJ, Dunning Hotopp JC. 2012. Efficient subtraction of insect rRNA prior to transcriptome analysis of Wolbachia–*Drosophila* lateral gene transfer. *BMC Research Notes* 5(1):1 DOI 10.1186/1756-0500-5-230.
- Langmead B, Salzberg SL. 2012. Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. *Nature Methods* 9(4):357–359 DOI 10.1038/nmeth.1923.
- Liao Y, Smyth GK, Shi W. 2014. FeatureCounts: an efficient general purpose program for assigning sequence reads to genomic features. *Bioinformatics* 30(7):923–930 DOI 10.1093/bioinformatics/btt656.
- Lo WS, Kuo CH. 2017. Horizontal acquisition and transcriptional integration of novel genes in mosquito-associated *Spiroplasma*. *Genome Biology and Evolution* 9(12):3246–3259 DOI 10.1093/gbe/evx244.
- Lucchesi JC, Kuroda MI. 2015. Dosage compensation in *Drosophila*. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 7(5):1–21 DOI 10.1101/cshperspect.a019398.

- Lue C-H, Buffington ML, Scheffer S, Lewis M, Elliott TA, Lindsey ARI, Driskell A, Jandova A, Kimura MT, Carton Y, Kula RR, Schlenke TA, Mateos M, Govind S, Varaldi J, Guerrieri E, Giorgini M, Wang X, Hoelmer K, Daane KM, Abram PK, Pardikes NA, Brown JJ, Thierry M, Poirié M, Goldstein P, Miller SE, Tracey WD, Davis JS, Jiggins FM, Wertheim B, Lewis OT, Leips J, Staniczenko PPA, Hrcek J. 2021. DROP: Molecular voucher database for identification of *Drosophila* parasitoids. *bioRxiv* DOI 10.1101/2021.02.09.430471.
- Lyne R, Smith R, Rutherford K, Wakeling M, Varley A, Guillier F, Janssens H, Ji W, McLaren P, North P, Rana D, Riley T, Sullivan J, Watkins X, Woodbridge M, Lilley K, Russell S, Ashburner M, Mizuguchi K, Micklem G. 2007. FlyMine: an integrated database for *Drosophila* and *Anopheles* genomics. *Genome Biology* 8(7):R129 DOI 10.1186/gb-2007-8-7-r129.
- Masson F, Copete SC, Schüpfer F, Garcia-Arreaez G, Lemaitre B. 2018. *In vitro* culture of the insect Endosymbiont *Spiroplasma poulsonii* highlights bacterial genes involved in host-symbiont interaction. *mBio* 9(2):1–11 DOI 10.1128/mBio.00024-18.
- Mateos M, Winter L, Winter C, Higareda-Alvear VM, Martinez-Romero E, Xie J. 2016. Independent origins of resistance or susceptibility of parasitic wasps to a defensive symbiont. *Ecology and Evolution* 6(9):2679–2687 DOI 10.1002/ece3.2085.
- Meghlaoui GK, Veuille M. 1997. Selection and methionine accumulation in the fat body protein 2 gene (FBP2), a duplicate of the *Drosophila* alcohol dehydrogenase (ADH) gene. *Journal of Molecular Evolution* 44(1):23–32 DOI 10.1007/PL00006118.
- Montenegro H, Solferini VN, Klaczko LB, Hurst GDD. 2005. Male-killing *Spiroplasma* naturally infecting *Drosophila melanogaster*. *Insect Molecular Biology* 14(3):281–287 DOI 10.1111/j.1365-2583.2005.00558.x.
- Mortimer NT, Goecks J, Kacsoh BZ, Mobley JA, Bowersock GJ, Taylor J, Schlenke TA. 2013. Parasitoid wasp venom SERCA regulates *Drosophila* calcium levels and inhibits cellular immunity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110(23):9427–9432 DOI 10.1073/pnas.1222351110.
- Oliver KM, Perlman SJ. 2020. Toxin-mediated protection against natural enemies by insect defensive symbionts. *Advances in Insect Physiology* 58:277–316 DOI 10.1016/bs.aipp.2020.03.005.
- Oliver KM, Russell JA, Morant NA, Hunter MS. 2003. Facultative bacterial symbionts in aphids confer resistance to parasitic wasps. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100(4):1803–1807 DOI 10.1073/pnas.0335320100.
- Oshlack A, Wakefield MJ. 2009. Transcript length bias in RNA-seq data confounds systems biology. *Biology Direct* 4(1):1–10 DOI 10.1186/1745-6150-4-14.
- Paredes JC, Herren JK, Schüpfer F, Lemaitre B. 2016. The role of lipid competition for endosymbiont-mediated protection against parasitoid wasps in *Drosophila*. *mBio* 7(4):e01006-16 DOI 10.1128/mBio.01006-16.
- Pool JE, Wong A, Aquadro CF. 2006. Finding of male-killing *Spiroplasma* infecting *Drosophila melanogaster* in Africa implies transatlantic migration of this endosymbiont. *Heredity* 97(1):27–32 DOI 10.1038/sj.hdy.6800830.
- Riegler M, Sidhu M, Miller WJ, O'Neill SL. 2005. Evidence for a global *Wolbachia* replacement in *Drosophila melanogaster*. *Current Biology* 15(15):1428–1433 DOI 10.1016/j.cub.2005.06.069.
- Robinson MD, McCarthy DJ, Smyth GK. 2009. edgeR: a Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. *Bioinformatics* 26(1):139–140 DOI 10.1093/bioinformatics/btp616.

- Russo J. 1996. Insect immunity: early events in the encapsulation process of parasitoid (*Leptopilina boulandi*) eggs in resistant and susceptible strains of *Drosophila*. *Parasitology* **112**(1):135–142 DOI [10.1017/S0031182000065173](https://doi.org/10.1017/S0031182000065173).
- Salazar-Jaramillo L, Jalvingh KM, de Haan A, Kraaijeveld K, Buermans H, Wertheim B. 2017. Inter- and intra-species variation in genome-wide gene expression of *Drosophila* in response to parasitoid wasp attack. *BMC Genomics* **18**(1):1–14 DOI [10.1186/s12864-017-3697-3](https://doi.org/10.1186/s12864-017-3697-3).
- Schlenke TA, Morales J, Govind S, Clark AG. 2007. Contrasting infection strategies in generalist and specialist wasp parasitoids of *Drosophila melanogaster*. *PLOS Pathogens* **3**(10):1486–1501 DOI [10.1371/journal.ppat.0030158](https://doi.org/10.1371/journal.ppat.0030158).
- Stirpe F. 2004. Ribosome-inactivating proteins. *Toxicon* **44**(4):371–383 DOI [10.1016/j.toxicon.2004.05.004](https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2004.05.004).
- Thurmond J, Goodman JL, Strelets VB, Attrill H, Gramates LS, Marygold SJ, Matthews BB, Millburn G, Antonazzo G, Trovisco V, Kaufman TC, Calvi BR, Perrimon N, Gelbart SR, Agapite J, Broll K, Crosby L, Dos Santos G, Emmert D, Falls K, Jenkins V, Sutherland C, Tabone C, Zhou P, Zytkevich M, Brown N, Garapati P, Holmes A, Larkin A, Pilgrim C, Urbano P, Czoch B, Cripps R, Baker P. 2019. FlyBase 2.0: The next generation. *Nucleic Acids Research* **47**(D1):D759–D765 DOI [10.1093/nar/gky1003](https://doi.org/10.1093/nar/gky1003).
- Voth W, Jakob U. 2017. Stress-activated chaperones: a first line of defense. *Trends in Biochemical Sciences* **42**(11):899–913 DOI [10.1016/j.tibs.2017.08.006](https://doi.org/10.1016/j.tibs.2017.08.006).
- Wang J, Wu Y, Yang G, Aksoy S. 2009. Interactions between mutualist *Wigglesworthia* and tsetse peptidoglycan recognition protein (PGRP-LB) influence trypanosome transmission. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **106**(29):12133–12138 DOI [10.1073/pnas.0901226106](https://doi.org/10.1073/pnas.0901226106).
- Wey B, Heavner ME, Wittmeyer KT, Briese T, Hopper KR, Govind S. 2020. Immune suppressive extracellular vesicle proteins of *Leptopilina heterotoma* are encoded in the wasp genome. *G3: Genes, Genomes, Genetics* **10**(1):1–12 DOI [10.1534/g3.119.400349](https://doi.org/10.1534/g3.119.400349).
- Xie J, Butler S, Sanchez G, Mateos M. 2014. Male killing *Spiroplasma* protects *Drosophila melanogaster* against two parasitoid wasps. *Heredity* **112**(4):399–408 DOI [10.1038/hdy.2013.118](https://doi.org/10.1038/hdy.2013.118).
- Xie J, Tiner B, Vilchez I, Mateos M. 2011. Effect of the *Drosophila* endosymbiont *Spiroplasma* on parasitoid wasp development and on the reproductive fitness of wasp-attacked fly survivors. *Evolutionary Ecology* **25**(5):1065–1079 DOI [10.1007/s10682-010-9453-7](https://doi.org/10.1007/s10682-010-9453-7).
- Xie J, Vilchez I, Mateos M. 2010. *Spiroplasma* bacteria enhance survival of *Drosophila hydei* attacked by the parasitic wasp *Leptopilina heterotoma*. *PLOS ONE* **5**:e0012149 DOI [10.1371/journal.pone.0012149](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0012149).
- Zhong W, McClure CD, Evans CR, Mlynski DT, Immonen E, Ritchie MG, Priest NK. 2013. Immune anticipation of mating in *Drosophila*: *Turandot M* promotes immunity against sexually transmitted fungal infections. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* **280**(1773):20132018 DOI [10.1098/rspb.2013.2018](https://doi.org/10.1098/rspb.2013.2018).