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

***Arsenophonus* e as interações do hospedeiro *Aphis citricidus* (Kirkaldy)
(Hemiptera: Aphididae) com o primeiro e o terceiro níveis tróficos - um
sistema modelo para estudos de macrointerações**

Bianca Carbogim Soares

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

**Piracicaba
2016**

Bianca Carbogim Soares
Licenciada e Bacharel em Ciências Biológicas

***Arsenophonus* e as interações do hospedeiro *Aphis citricidus* (Kirkaldy)
(Hemiptera: Aphididae) com o primeiro e o terceiro níveis tróficos - um sistema
modelo para estudos de macrointerações**

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

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

Piracicaba
2016

RESUMO

***Arsenophonus* e as interações do hospedeiro *Aphis citricidus* (Kirkaldy) (Hemiptera: Aphididae) com o primeiro e o terceiro níveis tróficos - um sistema modelo para estudos de macrointerações**

Relações de simbiose são comuns na natureza e tornaram-se fundamentais para a desconstrução do antigo conceito de indivíduo, único e indivisível, para o surgimento da ideia do holobionte, definido como o ser constituído de características próprias somadas aos simbiontes a ele associados. Tais relações são comuns em Insecta, sendo bactérias os microrganismos mais comumente encontrados em simbiose, influenciando diversos aspectos bioecológicos do hospedeiro. Dentre os insetos, pulgões são organismos modelos para o estudo de interações com simbiontes devido à associação com diversas espécies de bactérias, as quais produzem diferentes fenótipos do hospedeiro. Este trabalho teve por objetivo avaliar o papel do endossimbionte secundário *Arsenophonus* nas interações de seu hospedeiro *Aphis citricidus* (Kirkaldy) (Hemiptera: Aphididae) com o primeiro e terceiro níveis tróficos. Assim, isolinhagens de *A. citricidus* infectadas (Ars+) ou não (Ars-) por *Arsenophonus* foram estabelecidas e utilizadas para a condução de estudos comparativos para a exploração de plantas hospedeiras com diferentes valores nutricionais, *Citrus sinensis* (hospedeiro ótimo) e *Murraya paniculata* (hospedeiro subótimo). Foram observadas a sobrevivência, longevidade e fecundidade de *A. citricidus* Ars+ e Ars- em cada planta hospedeira, sendo os valores obtidos utilizados na construção de tabelas de vida de fertilidade. Para o estudo das interações com o terceiro nível trófico, foram realizados estudos comparativos do parasitismo de *A. citricidus* Ars+ e Ars-, criados em ambos hospedeiros, pelo parasitoide *Aphelinus asychis* (Walker) (Hymenoptera: Aphelinidae). Foram observados o desenvolvimento do parasitoide e o sucesso de parasitismo. Os resultados obtidos comprovaram ser *C. sinensis* o hospedeiro mais adequado e que o simbionte secundário beneficia seu hospedeiro na exploração do alimento, resultando na redução do período de desenvolvimento e em insetos de maior tamanho no hospedeiro subótimo. Os parâmetros de tabela de vida de fertilidade calculados para pulgões Ars+ foram superiores aos de Ars-. Além de beneficiar *A. citricidus* na utilização do alimento, o simbionte *Arsenophonus* também afetou a relação de seu hospedeiro com o parasitoide *A. asychis*. Pulgões Ars+ foram inadequados ao completo desenvolvimento do parasitoide. A relação de simbiose de *A. citricidus* e *Arsenophonus* estudada demonstrou a importância de simbiontes secundários nas interações multitróficas do hospedeiro e as implicações que elas podem ter para o controle do crescimento populacional de insetos de interesse econômico.

Palavras-chave: Bactéria endossimbionte; Controle biológico; Holobionte; Inadequação hospedeira

ABSTRACT

***Arsenophonus* and the interactions of the aphid host *Aphis citricidus* (Kirkaldy) (Hemiptera: Aphididae) with the first and third trophic levels - a model system for the study of macrointeractions**

Symbiotic relationships are common in nature and have become essential for the deconstruction of the old concept of individual, as a single and indivisible entity, for the emergence of the holobiont idea, being consisted of its own characteristics added to the symbionts associated with it. Such relationships are common in Insecta, and bacteria are the microorganisms most commonly found in symbiosis, influencing many bioecological aspects of the host. Among insects, aphids are model organisms for the study of interactions with symbionts due to their association with various species of bacteria that produce different host phenotypes. This study aimed to evaluate the role of the secondary endosymbiont *Arsenophonus* on the interactions of its host *Aphis citricidus* (Kirkaldy) (Hemiptera: Aphididae) with the first and third trophic levels. Thus, isofemale strains of *A. citricidus* infected (Ars+) or not (Ars-) with *Arsenophonus* were established and used to conduct comparative studies on the use of host plants with different nutritional values, *Citrus sinensis* (optimum host) and *Murraya paniculata* (suboptimum host). We assessed survival, longevity and fecundity rates of Ars- and Ars+ *A. citricidus* in each host plant, and the obtained data were used in for calculation of fertility life tables. We also carried out comparative studies on the success of parasitization of Ars- and Ars+ *A. citricidus* reared on both host plants by the parasitoid *Aphelinus asychis* (Walker) (Hymenoptera: Aphelinidae). We assessed parasitoid development on aphids reared on both host plants and measured the success of parasitization on aphids reared on the optimum host plant. Our data proved *C. sinensis* as a more suitable host than *M. paniculata*, and that the secondary symbiont benefited infected aphids to explore the food source by reducing the time of development and producing larger adults in the suboptimal host. The fertility life table parameters calculated for Ars+ aphids were higher than those for Ars-. Besides benefiting *A. citricidus* in the use of food, *Arsenophonus* also affected the relationship of its host with the parasitoid *A. asychis*. Ars+ aphids were unsuitable to *A. asychis* and did not allow the full development of the parasitoid. The studied symbiotic relationship of *A. citricidus* and *Arsenophonus* showed the importance of secondary symbionts in multitrophic interactions of the host and the implications they may have for controlling the population growth of insects of economic interest.

Keywords: Endosymbiotic bacteria; Biological control; Holobiont; Host unsuitability

1 INTRODUÇÃO

Cadeias alimentares são encontradas em todos os ecossistemas, sendo elas constituídas de inúmeras espécies interconectadas de maneiras bastante complexas. Alterações no equilíbrio dessa cadeia produzem mudanças dramáticas na abundância de espécies de níveis tróficos superiores e inferiores, influenciando toda a comunidade devido ao efeito cascata na organização trófica das cadeias alimentares (POWER, 1990, 1992). Nesse contexto, cada componente da cadeia é considerado um indivíduo. Contudo, o conceito de indivíduo como um ser independente e singular vem sofrendo alterações devido à descoberta de um mundo microbiano interligado ao "indivíduo" através de relações complexas (GORDON, 2012). Dessa forma, o indivíduo passa a ser visto como um organismo que mantém relações com outros microrganismos através de complexos de simbioses que vivem, se desenvolvem e evoluem conjuntamente (GILBERT; SAPP; TAUBER, 2012; GORDON, 2012). Com isso, o termo "holobionte", proposto por Margulis e Fester (1991), veio para melhor exemplificar o organismo como um ser constituído de características próprias e de populações de simbioses associados, sendo a soma de seus componentes genômicos denominada de hologenoma (GUERRERO; MARGULIS; BERLANGA, 2013).

Essas associações, denominadas por Heinrich Anton de Bary em 1879 como simbiose, são amplamente difundidas na natureza e consistem na convivência de dois ou mais organismos diferentes em determinadas condições ambientais, podendo ser benéficas ou não (GUERRERO; MARGULIS; BERLANGA, 2013; PARMENTIER; MICHEL, 2013). Dentro dessa designação, podemos citar as relações interespecíficas de comensalismo, em que uma espécie é favorecida, sem prejudicar a outra, de mutualismo, em que o benefício é mútuo para ambas as espécies e de parasitismo, em que uma espécie necessita de outra para viver, prejudicando-a em benefício próprio (SOLOMON; BERG; MARTIN, 2008; LEUNG; POULIN, 2008).

Tais associações de simbiose são amplamente difundidas na natureza, sendo as relações de insetos e bactérias bastante comuns (BUCHNER, 1965; BOURTZIS; MILLER, 2003; FERRARI; VAVRE, 2011). Em relação à sua origem, acredita-se que as relações de simbiose tenham sido primeiramente patogênicas, tendendo ao mutualismo devido à coevolução e coadaptação entre simbioses e seus hospedeiros (RIO; HU; AKSOY, 2004; SANCHEZ-CONTRERAS; VLISIDOU, 2008). Dessa forma, os simbioses estabeleceram relações íntimas com seus hospedeiros, as quais resultaram na redução de seu genoma devido à especialização na exploração de vias metabólicas do hospedeiro. Assim, esses simbioses

mantém em seu genoma reduzido genes relacionados à manutenção da simbiose e, conseqüentemente, ao favorecimento do hospedeiro (WERNEGREEN, 2005; MOYA, 2008; SANCHEZ-CONTRERAS; VLISIDOU, 2008).

Bactérias simbiontes associadas externamente ao corpo de insetos são denominadas de ectossimbiontes, enquanto aquelas associadas internamente ao corpo do inseto são denominadas de endossimbiontes. Endossimbiontes podem ocorrer livremente no interior do corpo do hospedeiro, como aquelas presentes no lúmen intestinal ou na hemocele, ou associadas ao ambiente intracelular de diversos tecidos ou de células especializadas para sua multiplicação (bacteriócitos) (BOURTZIS; MILLER, 2003; BAUMANN, 2005).

Simbiontes podem ainda ser classificados como primários/obrigatórios ou secundários/facultativos dependendo da frequência de associação e grau de dependência que estabelecem com seus hospedeiros (BOURTZIS; MILLER, 2003). Simbiontes primários apresentam uma longa história evolutiva com seus hospedeiros, sendo obrigatoriamente herdados via transmissão vertical (MORAN; BAUMANN, 1994; MOYA, 2008). Eles são abrigados em células especializadas, os bacteriócitos, podendo formar um órgão denominado bacterioma em alguns insetos (BUCHNER, 1965). Em sua grande maioria, estabelecem relações de simbiose nutricional, fornecendo nutrientes essenciais ao hospedeiro para suplementação de nutrientes indisponíveis na dieta alimentar do hospedeiro em quantidades adequadas à sua nutrição (BOURTZIS; MILLER, 2003; SANCHEZ-CONTRERAS; VLISIDOU, 2008). A associação de pulgões à bactéria *Buchnera aphidicola* e de baratas a *Blattabacterium* são exemplos clássicos de simbiose nutricional, visto que essas bactérias são responsáveis pela síntese de aminoácidos e vitaminas essenciais aos pulgões (DOUGLAS, 1998; SHIGENOBU et al., 2000) e baratas (DONNELLAN; KILBY, 1967; SABREE; KAMBHAMPATI; MORAN, 2009). Além disso, *Blattabacterium* também atua na ciclagem de nitrogênio, degradando o ácido úrico armazenado no tecido adiposo do inseto, auxiliando na disponibilização de nitrogênio em condições de estresse nutricional (DONNELLAN; KILBY, 1967; SABREE; KAMBHAMPATI; MORAN, 2009).

Os simbiontes secundários não são considerados essenciais para o desenvolvimento do hospedeiro e são transmitidos tanto horizontal quanto verticalmente, podendo ocorrer intra ou extracelularmente (DALE; MORAN, 2006; RATZKA; GROSS; FELDHAAR, 2012). Apesar de não serem essenciais ao hospedeiro, simbiontes secundários desempenham diversas funções importantes à bioecologia de seus hospedeiros, atuando na detoxificação de xenobióticos (KIKUCHI et al., 2012), tolerância ao estresse térmico (MONTLLOR;

MAXMEN; PURCELL, 2002; RUSSELL; MORAN, 2006; BURKE et al., 2010) e resistência a inimigos naturais (OLIVER et al., 2009; XIE; VILCHEZ; MATEOS, 2010).

Um simbiote amplamente estudado e encontrado em mais de 66% das espécies de insetos consiste nas bactérias do gênero *Wolbachia* (HILGENBOECKER et al., 2008). Tal bactéria pode manipular a célula e a biologia reprodutiva do hospedeiro pela feminização de machos, indução da partenogênese telítica, morte de machos e incompatibilidade citoplasmática (WERREN, 1997; HOERAUF; RAO, 2007). Essa manipulação tem o intuito de favorecer a sua dispersão para que haja maior frequência de fêmeas infectadas na população de hospedeiros (HOERAUF; RAO, 2007). Porém, há casos em que a relação com *Wolbachia* pode ser obrigatória, como em *Asobara tabida* (Nees) (Hymenoptera: Braconidae), que tem desenvolvimento ovariano e produção de ovos normais apenas se infectados por esses simbiote (DEDEINE et al., 2001).

Pulgões podem apresentar associações com diversos endossimbiontes secundários, como *Arsenophonus*, *Hamiltonella defensa*, *Regiella insecticola*, *Rickettsia*, *Serratia symbiotica*, *Spiroplasma*, tipo-X e *Wolbachia* (CHEN; PURCELL, 1997; DARBY et al., 2001; FUKATSU et al., 2001; SANDSTRÖM et al., 2001; RUSSELL et al., 2003; GÓMEZ-VALERO et al., 2004; GUAY et al., 2009; SAKURAI et al., 2005; WULFF et al., 2013), tendo cada um funções específicas.

No geral, simbiotes podem influenciar diversos aspectos da fisiologia do hospedeiro, como reprodução e resposta imunológica (STOUTHAMER; BREEUWER; HURST, 1999; MORAN et al., 2005). Contudo, essa associação não restringe-se apenas aos hospedeiros e seus simbiotes. Ela se estende a uma intrincada rede de interações na comunidade onde os insetos vivem, afetando direta e indiretamente outros níveis tróficos, como a planta utilizada na alimentação e os inimigos naturais (FERRARI; VAVRE, 2011).

Plantas podem ser mais propícias a serem hospedeiras de determinados insetos do que outros. Tsai (1998) observou em seu trabalho que *Aphis citricidus* (Kirkaldy) (Hemiptera: Aphididae) apresentou diferenças significativas no desenvolvimento, na sobrevivência de ninfas, na longevidade e na capacidade reprodutiva quando criados em plantas hospedeiras distintas. De acordo com o autor, essas variações podem ser causadas por diferenças na qualidade das plantas hospedeiras, biótipos do pulgão ou ambos os fatores (TSAI, 1998). Contudo, a escolha da planta hospedeira pelo inseto depende de diversos fatores. Em especial no caso da herbivoria, o inseto tem que superar numerosos obstáculos para se alimentar, como a presença de substâncias tóxicas nas plantas, a ausência de componentes essenciais para a alimentação e também a indigestibilidade (HANSEN; MORAN, 2014). Em situações de

estresse ambiental, por exemplo, a qualidade nutricional das plantas pode ser alterada e, conseqüentemente, a população de seus herbívoros também pode sofrer impacto (AWMACK; LEATHER, 2002). Logo, todos os elos da cadeia alimentar que se relacionam ou os diversos organismos que formam o holobionte também podem sofrer alterações. Plantas que apresentem variações nos teores de seus nutrientes, como nitrogênio, podem influenciar diretamente a densidade populacional de endossimbiontes de pulgões, o que pode afetar seu desenvolvimento em plantas com baixa quantidade de nitrogênio no floema (WILKINSON; KOGA; FUKATSU, 2007).

No caso de simbioses facultativos, há também estudos que mostram que eles podem exercer grande influência na aptidão do hospedeiro na exploração e colonização de diferentes plantas (LEONARDO; MUIRU, 2003; TSUCHIDA et al., 2004; DOUGLAS, 2009). Contudo, a aptidão de insetos herbívoros está intimamente associada a outros fatores além de suas associações com bactérias endossimbiontes e da qualidade nutricional da planta hospedeira, como a interação com outros níveis tróficos, como o terceiro nível trófico, representado por inimigos naturais (PRICE et al., 1980; AWMACK; LEATHER, 2002; FERRARI; VAVRE, 2011). Participantes dessas complexas relações tróficas estão intimamente ligados uns aos outros, de forma que aspectos comportamentais, ecológicos e fisiológicos de cada um são influenciados pelos demais (POPPY, 1997; FERRARI; VAVRE, 2011). Dessa forma, o estudo de insetos herbívoros deve levar em consideração a existência do organismo multitrófico, que pode afetar e ser afetado por todas as possíveis relações que ele mantém.

Um exemplo dessa influência nas inúmeras relações existentes da cadeia trófica consiste na presença de compostos químicos tóxicos nas plantas. Tais compostos podem afetar diretamente o desenvolvimento do inseto herbívoro e indiretamente o terceiro e quarto níveis tróficos, os quais podem apresentar problemas na oviposição, taxa de sobrevivência, variação no tamanho corpóreo e sucesso no desenvolvimento (HARVEY; VANDAM; GOLS, 2003; ODE et al., 2004; 2006). Em contrapartida, a presença desses compostos tóxicos de defesa pode ampliar a vulnerabilidade de insetos herbívoros aos inimigos naturais, visto que podem afetar o desenvolvimento de herbívoros, tornando-os disponíveis ao ataque de inimigos naturais por períodos mais prolongados (BENREY; DENNO, 1997).

Entretanto, o sucesso do parasitismo depende da superação de alguns obstáculos para o desenvolvimento, como o sistema imunológico do hospedeiro, a competição intraespecífica e a regulação hospedeira (REHMAN; POWELL, 2010). Para garantir a sua sobrevivência, o parasitoide deve manipular o desenvolvimento do hospedeiro em benefício próprio, de acordo

com as exigências específicas de cada estágio de vida. Dessa forma, o hospedeiro sofre diversas alterações fisiológicas, como modificações no desenvolvimento, na respiração, na excreção de nitrogênio, nos sistemas reprodutivos e endócrinos, assim como em sua imunidade. Tais modificações podem ocorrer devido à presença de veneno, de teratócitos e substâncias produzidas pela larva parasitoide, por exemplo (VINSON; IWANTSCH, 1980; VINSON; CÔNSOLI, 2001; CÔNSOLI; VINSON, 2009; BECKAGE; GELMAN, 2004; ASGARI; RIVERS, 2011).

Contudo, a associação de hospedeiros a bactérias simbioses pode afetar diretamente o parasitoide. A associação do pulgão da ervilha *Acyrtosiphon pisum* (Harris) (Hemiptera: Aphididae) ao endossimbionte secundário *Hamiltonella defensa*, o qual é comumente infectado com o bacteriófago conhecido como APSE (WILK et al., 1999), que produz toxinas que conferem proteção moderada ao pulgão contra parasitoides (OLIVER et al., 2009; MORAN et al., 2005), é um exemplo desse tipo de interferência. Outros casos de resistência ao parasitismo devido à associação com simbioses secundários também ocorrem em pulgões infectados com *Regiella insecticola* (VORBURGER; GEHRER; RODRIGUEZ, 2010) e superinfectados com *H. defensa* e *S. symbiotica* (OLIVER; MORAN; HUNTER, 2006).

Em suma, por anos diversos estudos foram baseados nas relações tritróficas da planta hospedeira, o inseto herbívoro e seus inimigos naturais. Contudo, com o avanço das tecnologias e a descoberta do mundo microbiano e de sua contribuição ao fenótipo do organismo associado, as relações tróficas ganharam perspectiva mais complexa (GORDON, 2012). Assim, estudos sobre simbioses presentes em pragas agrícolas são fundamentais para que técnicas de manejo de pragas, como o controle biológico, por exemplo, sejam bem sucedidas, visto a interferência desses simbioses na eficiência de entomófagos e entomopatógenos (OLIVER et al., 2010).

Visando ampliar o conhecimento sobre os laços e as influências exercidas entre os participantes de relações multitróficas, essa dissertação visa compreender como se dá o desenvolvimento do pulgão *Aphis citricidus* em plantas hospedeiras com diferentes valores nutricionais, *Citrus sinensis* e *Murraya paniculata*, quando associados ou não ao endossimbionte secundário *Arsenophonus*, e analisar como tal bactéria pode influenciar na resposta de *A. citricidus* ao parasitismo por *Aphelinus asychis* (Walker) (Hymenoptera: Aphelinidae).

Referências

- ASGARI, S.; RIVERS, D.B. Venom proteins from endoparasitoid wasps and their role in host-parasite interactions. **Annual Review of Entomology**, Palo Alto, v. 56, p. 313-335, 2011.
- AWMACK, C.S.; LEATHER, S.R. Host plant quality and fecundity in herbivorous insects. **Annual Review of Entomology**, Palo Alto, v. 47, p. 817-844, 2002.
- BAUMANN, P. Biology of bacteriocyte-associated endosymbionts of plant sap-sucking insects. **Annual Review of Microbiology**, Palo Alto, v. 59, p. 155-189, 2005.
- BECKAGE, N.E.; GELMAN, D.B. Wasp parasitoid disruption of host development: Implications for new biologically based strategies for insect control. **Annual Review of Entomology**, Palo Alto, v. 49, p. 299-330, 2004.
- BENREY, B.; DENNO, R.F. The slow-growth-high-mortality hypothesis: a test using the cabbage butterfly. **Ecology**, Tempe, v. 78, n. 4, p. 987-999, 1997.
- BOURTZIS, K.; MILLER, T.A. **Insect symbiosis**. Boca Raton: CRC Press, 2003. 368 p
- BUCHNER, P. **Endosymbiosis of animals with plant microorganisms**. New York: Interscience, 1965. 909 p.
- BURKE, G.; FIEHN, O.; MORAN, N. Effects of facultative symbionts and heat stress on the metabolome of the pea aphids. **The ISME Journal**, London, v. 4, n. 2, p. 242-252, 2010.
- CHEN, D.Q.; PURCELL, A.H. Occurrence and transmission of facultative endosymbionts in aphids. **Current Microbiology**, New York, v. 34, n. 4, p. 220-225, 1997.
- CÔNSOLI, F.L.; VINSON, S.B. Parasitoides (Hymenoptera). In: PANIZZZI, A.R.; PARRA, J.R.P. (Ed.). **Bioecologia e nutrição dos insetos**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2009. p. 837-873.
- DALE, C.; MORAN, N.A. Molecular interactions between bacterial symbionts and their hosts. **Cell**, Cambridge, v.126, n. 3, p.453-465, 2006.
- DARBY, A.C.; BIRKLE, L.M.; TURNER, S.L.; DOUGLAS, A.E. An aphid-borne bacterium allied to the secondary symbionts of whitefly. **FEMS Microbiology Ecology**, Amsterdam, v. 36, n. 1, p. 43-50, 2001.
- DE BARY, A. **The phenomenon of symbiosis**. Strasbourg: Karl J. Trubner, 1879. 364 p.
- DEDEINE, F.; VAVRE, F.; FLEURY, F.; LOPPIN, B.; HOCHBERG, M.E.; BOULÉTREAU, M. Removing symbiotic *Wolbachia* bacteria specifically inhibits oogenesis in a parasitic wasp. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 98, n. 11, p. 6247-6252, 2001.

DONNELLAN, J.F.; KILBY, B.A. Uric acid metabolism by symbiotic bacteria from the fat body of *Periplaneta americana*. **Comparative Biochemistry and Physiology**, Oxford, v. 22, n. 1, p. 235–252, 1967.

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

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

FERRARI, J., VAVRE, F. Bacterial symbionts in insects or the story of communities affecting communities. **Philosophical Transactions of the Royal Society. Series B: Biological Sciences**, London, v. 366, n. 1569, p. 1389–1400, 2011.

FUKATSU, T.; TSUCHIDA, T.; NIKOH, N.; KOGA, R. *Spiroplasma* symbiont of the pea aphid, *Acyrtosiphon pisum* (Insecta: Homoptera). **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 67, n. 3, p. 1284–1291, 2001.

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

GÓMEZ-VALERO, L.; SORIANO-NAVARRO, M.; PÉREZ-BROCAL, V.; HEDDI, A.; MOYA, A.; GARCÍA-VERDUGO, J.M.; LATORRE, A. Coexistence of *Wolbachia* with *Buchnera aphidicola* and a secondary symbiont in the aphid *Cinara cedri*. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 186, n. 19, p. 6626–6633, 2004.

GORDON, J.I. Honor thy guy symbionts redux. **Science**, Washington, v. 336, n. 6086, p. 1251–1253, 2012.

GUAY, J.F.; BOUDREAULT, S.; MICHAUD, D.; CLOUTIER, C. Impact of environmental stress on aphid clonal resistance to parasitoids: role of *Hamiltonella defensa* bacterial symbiosis in association with a new facultative symbiont of the pea aphid. **Journal of Insect Physiology**, Oxford, v. 55, n. 10, p. 919–926, 2009.

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

HANSEN, A.K.; MORAN, N.A. The impact of microbial symbionts on host plant utilization by herbivorous insects. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 23, n. 6, p. 1473–1496, 2014.

HARVEY, J.A.; VAN DAM, N.M.; GOLS, R. Interactions over four trophic levels: foodplant quality affects development of a hyperparasitoid as mediated through a herbivore and its primary parasitoid. **Journal of Animal Ecology**, Oxford, v. 72, n. 3, p. 520–531, 2003.

HILGENBOECKER, K.; HAMMERSTEIN, P.; SCHLATTMANN, P.; TELSCHOW, A.; WERREN, J.H. How many species are infected with *Wolbachia*? - a statistical analysis of current data. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 281, n. 2, p. 215–220, 2008.

HOERAUF, A.; RAO, R.U. **Wolbachia**: a bug's life in another bug. Basel: Karger Publ., 2007. 150 p. (Issues in Infectious Diseases, 5).

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

LEONARDO, T.E.; MUIRU, G.T. Facultative symbionts are associated with host plant specialization in pea aphid populations. **Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences**, London, v. 270, n. 2, p. S209-S212, 2003.

LEUNG, T.L.F.; POULIN, R. Parasitism, commensalism and mutualism: exploring the many shades of symbioses. **Vie et Milieu - Life and Environment**, Paris, v. 58, n. 2, p. 107-115, 2008.

MARGULIS, L. Symbiogenesis and symbiogenesis. In MARGULIS, L.; FESTER, R. (Ed.). **Symbiosis as a source of evolutionary innovation: speciation and morphogenesis**. Cambridge: Massachusetts Institute of Technology Press. 1991. p. 1-14.

MONTLLOR, C.B.; MAXMEN, A.; PURCELL, A.H. Facultative bacterial endosymbionts benefit pea aphids *Acyrtosiphon pisum* under heat stress. **Ecological Entomology**, London, v. 27, n. 2, p. 189-195, 2002.

MORAN, N.; BAUMANN, P. Phylogenetics of cytoplasmically inherited microorganisms of arthropods. **Trends in Ecology & Evolution**, Amsterdam, v. 9, n. 1, p. 15-20, 1994.

MORAN, N.A.; DEGNAN, P.H.; SANTOS, S.R.; DUNBAR, H.E.; OCHMAN, H. The players in a mutualistic symbiosis: insects, bacteria, viruses, and virulence genes. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 102, n. 47, p. 16919-16926, 2005.

MOYA, A.; PERETÓ, J.; GIL, R.; LATORRE, A. Learning how to live together: genomic insights into prokaryote-animal symbiosis. **Nature Reviews Genetics**, London, v. 9, n. 3, p. 218-229, 2008.

ODE, P.J. Plant chemistry and natural enemy fitness: effects on herbivore and natural enemy interaction. **Annual Review of Entomology**, Palo Alto, v. 51, p. 163-185, 2006.

ODE, P.J.; BERENBAUM, M.R.; ZANGERL, A.R.; HARDY, I.C.W. Host plant, host plant chemistry and the polyembryonic parasitoid *Copidosoma sosares*: indirect effects in a tritrophic interaction. **Oikos**, Lund, v. 104, n. 2, p. 388-400, 2004.

OLIVER, K.M.; MORAN, N.A.; HUNTER, M.S. Costs and benefits of a superinfection of facultative symbionts in aphids. **Proceedings of the Royal Society Series B: Biological Sciences**, Edinburgh, v. 273, n. 1591, p. 1273-1280, 2006.

OLIVER, K.M.; DEGNAN, P.H.; BURKE, G.R.; MORAN, N.A. Facultative symbionts in aphids and the horizontal transfer of ecologically important traits. **Annual Review of Entomology**, Palo Alto, v. 55, p. 247-266, 2010.

OLIVER, K.M.; DEGNAN, P.H.; HUNTER, M.S.; MORAN, N.A. Bacteriophages encode factors required for protection in a symbiotic mutualism. **Science**, Washington, v. 325, n. 5943, p. 992-994, 2009.

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

POPPY, G.M. Tritrophic interactions: improving ecological understanding and biological control? **Endeavour**, Oxford, v. 21, n. 2, p. 61-65, 1997.

POWER, M. E. Effects of fish in river food webs. **Science**, Washington, v. 250, n. 4982, p. 811-814, 1990.

_____. Top-down and bottom-up forces in food webs: do plants have primacy. **Ecology**, Tempe, v. 73, n. 3, p. 733-746, 1992.

PRICE, P.W.; BOUTON, C.E.; GROSS, P.; MCPHERON, B.A.; THOMPSON, J.N.; WEIS, A.E. Interactions among three trophic levels: influence of plants on interactions between insect herbivores and natural enemies. **Annual Review of Ecology and Systematics**, Palo Alto, v. 11, p. 41-65, 1980.

RATZKA, C.; GROSS, R.; FELDHAAR, H. Endosymbiont tolerance and control within insect hosts. **Insects**, Basel, v. 3, n. 2, p. 553-572, 2012.

REHMAN, A.; POWELL, W. Host selection behaviour of aphid parasitoids (Aphidiidae: Hymenoptera). **Journal of Plant Breeding and Crop Science**, Nairobi, v. 2, n. 10, p. 299-311, 2010.

RIO, R.V.M.; HU, Y.; AKSOY, S. Strategies of the home-team: symbioses exploited for vector-borne disease control. **Trends in Microbiology**, Cambridge, v. 12, n. 7, p. 325-336, 2004.

RUSSELL, J.A.; MORAN, N.A. Cost and benefits of symbiont infection in aphids: variation among symbionts and across temperatures. **Proceedings of the Royal Society. Series B: Biological Sciences**, Edinburgh, v. 273, n. 1586, p. 603-610, 2006.

RUSSELL, J.A.; LATORRE, A.; SABATER-MUÑOZ, B.; MOYA, A.; MORAN, N.A. Side-stepping secondary symbionts: widespread horizontal transfer across and beyond the Aphidoidea. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 12, n. 4, p. 1061-1075, 2003.

SABREE, Z.L.; KAMBHAMPATI, S.; MORAN, N. A. Nitrogen recycling and nutritional provisioning by *Blattabacterium*, the cockroach endosymbiont. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 106, n. 46, p. 19521-19526, 2009.

SAKURAI, M.; KOGA, R.; TSUCHIDA, T.; MENG, X.Y.; FUKATSU, T. *Rickettsia* symbiont in the pea aphid *Acyrtosiphon pisum*: novel cellular tropism, effect on host fitness, and interaction with the essential symbiont *Buchnera*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 71, n. 7, p. 4069-4075, 2005.

- SANCHEZ-CONTRERAS, M.; VLISIDOU, I. The diversity of insect-bacteria interactions and its applications for disease control. **Biotechnology and Genetic Engineering Reviews**, Newcastle upon Tyne, v. 25, p. 203-43, 2008.
- SANDSTRÖM, J.P.; RUSSELL, J.A.; WHITE, J.P.; MORAN, N.A. Independent origins and horizontal transfer of bacterial symbionts of aphids. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 10, n. 1, p. 217-228, 2001.
- SHIGENOBU, S.; WATANABE, H.; HATTORI, M.; SAKAKI, Y.; ISHIKAWA, H. Genome sequence of the endocellular bacterial symbiont of aphids *Buchnera* sp. APS. **Nature**, London, v. 407, n. 6800, p. 81-86, 2000.
- SOLOMON, E.P.; BERG, L.R.; MARTIN, D.W. **Biology**. 8th ed. Belmont: Thomas Brooks/Cole, 2008. 1379 p.
- STOUTHAMER, R.; BREEUWER, J.A.J.; HURST, G.D.D. *Wolbachia pipientis*: microbial manipulator of arthropod reproduction. **Annual Review of Microbiology**, Palo Alto, v. 53, p. 71-102, 1999.
- TSAI, J.H. Development, survivorship and reproduction of *Toxoptera citricida* (Kirkaldy) (Homoptera: Aphididae) on eight host plants. **Environmental Entomology**, College Park, v. 27, n. 5, p. 1190-1195, 1998.
- TSUCHIDA, T.; KOGA, R.; FUKATSU, T. Host plant specialization governed by facultative symbiont. **Science**, Washington, v. 303, n. 5666, p. 1989–1989, 2004.
- VINSON, S.B.; IWANTSCH, G.F. Host regulation by insect parasitoids. **The Quarterly Review of Biology**, Chicago, v. 55, n. 2, p. 143-165, 1980.
- VINSON, S.B.; PENNACCHIO, F.; CÔNSOLI, F.L. The parasitoid-host endocrine interaction from a nutritional perspective. In: EDWARDS, J.P.; WEAVER, R.J. (Ed.). **Endocrine interactions of insect parasites and pathogens**. Oxford: BIOS Scientific, 2001. p. 187–206.
- VORBURGER, C.; GEHRER, L.; RODRIGUEZ, P. A strain of the bacterial symbiont *Regiella insecticola* protects aphids against parasitoids. **Biology Letters**, London, v. 6, n. 1, p. 109-111, 2010.
- WERNEGREEN, J.J. For better or worse: genomic consequences of intracellular mutualism and parasitism. **Current Opinion in Genetics and Development**, London, v. 15, n. 6, p. 572-583, 2005.
- WERREN, J.H. Biology of *Wolbachia*. **Annual Review of Entomology**, Stanford, v. 42, p. 587-609, 1997.
- WILK, F. van der; DULLEMANS, A.M.; VERBEEK, M.; HEUVEL, J.F.J.M. van den. Isolation and characterization of APSE-1, a bacteriophage infecting the secondary endosymbiont of *Acyrtosiphon pisum*. **Virology**, New York, v. 262, n. 1, p. 104-113, 1999.

WILKINSON, T.L.; KOGA, R.; FUKATSU, T. Role of host nutrition in symbiont regulation: impact of dietary nitrogen on proliferation of obligate and facultative bacterial endosymbionts of the pea aphid *Acyrtosiphon pisum*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 73, n. 4, p. 1362-1366, 2007.

WULFF, J.A.; BUCKMAN, K.A.; WU, K.; HEIMPEL, G.E.; WHITE, J.A. The endosymbiont *Arsenophonus* is widespread in soybean aphid, *Aphis glycines*, but does not provide protection from parasitoids or a fungal pathogen. **PLoS One**, San Francisco v. 8, n. 4, p. 1-7, 2013.

XIE, J.; VILCHEZ, I.; MATEOS, M. *Spiroplasma* bacteria enhance survival of *Drosophila hydei* attacked by the parasitic wasp *Leptopilina heterotoma*. **PLoS One**, San Francisco, v. 5, n. 8, p. 1-7, 2010.

2 *Aphis citricidus* (Kirkaldy) (Hemiptera: Aphididae) – *Arsenophonus* E A EXPLORAÇÃO DE PLANTAS HOSPEDEIRAS COM QUALIDADE NUTRICIONAL DISTINTA

Resumo

Aphis citricidus (Kirkaldy) (Hemiptera: Aphididae) é uma das pragas da cultura do citrus devido aos danos causados à lavoura, mas principalmente por ser o vetor do vírus causador da Tristeza do Citrus (CTV). Assim como outros pulgões, tais insetos podem estar associados a bactérias simbiotes que podem auxiliar o pulgão durante seu desenvolvimento, na aquisição de nutrientes e na resistência a inimigos naturais. Estudos sobre relações de simbiose são essenciais para a compreensão dos inúmeros papéis que essas bactérias podem desempenhar, sendo de fundamental importância para o desenvolvimento de estratégias de manejo de pragas. Nesse trabalho buscamos avaliar o papel do endossimbionte secundário *Arsenophonus* no uso de duas plantas hospedeiras, *Citrus sinensis* e *Murraya paniculata*, pelo pulgão *A. citricidus*. Isolinhagens de *A. citricidus*, infectadas (Ars+) ou não (Ars-) por *Arsenophonus* foram estabelecidas em laboratório após coleta e caracterização molecular pelo sequenciamento do gene mitocondrial da citocromo oxidase I (COI) e pela realização de PCR diagnóstico para a verificação da associação de *A. citricidus* a simbiotes secundários. Essas isolinhagens foram utilizadas na condução de estudos comparativos da biologia do pulgão nas duas plantas hospedeiras mencionadas, com o intuito de analisar os parâmetros de desenvolvimento e sobrevivência do estágio imaturo, longevidade e fecundidade de fêmeas adultas, além do cálculo dos parâmetros da tabela de vida de fertilidade. Os resultados obtidos demonstraram a existência de diferenças significativas na adequação nutricional das plantas hospedeiras ao pulgão, indicando *C. sinensis* como o hospedeiro de maior valor nutricional para *A. citricidus*, independentemente de sua associação a *Arsenophonus*. Contudo, quando presente, *Arsenophonus* acelera o desenvolvimento imaturo do pulgão no hospedeiro de menor adequação nutricional, *M. paniculata*, além de resultar em fêmeas com maior fecundidade inicial e tamanho, indicando sua participação no melhor aproveitamento de hospedeiros menos adequados. Os dados de tabela de vida de fertilidade também evidenciaram a diferença entre as plantas hospedeiras e indicaram que pulgões infectados (Ars+) apresentam maior potencial de crescimento populacional nas duas plantas hospedeiras quando comparado ao controle. Sugere-se que pulgões infectados com *Arsenophonus* sejam mais aptos e tenham vantagens em relação àqueles não-infectados, mesmo em plantas nutricionalmente inadequadas para o seu crescimento.

Palavras-chave: Adaptação hospedeira; Crescimento populacional; Inadequação nutricional; Simbionte

Abstract

Aphis citricidus (Kirkaldy) (Hemiptera: Aphididae) is a citrus pest due to the direct damage they cause, but mainly for vectoring the Citrus Tristeza virus (CTV). Like other aphids, such insects can be associated to symbiotic bacteria that can help aphids during their development, improving nutrient acquisition and aphid resistance to natural enemies. Studies on symbiotic relationships are essential to the understanding of the many roles these bacteria may play, being crucial for the development of pest management strategies. In this study we sought to evaluate the role of the secondary endosymbiont *Arsenophonus* in the use of two host plants, *Citrus sinensis* and *Murraya paniculata*, by the aphid *A. citricidus*. *Arsenophonus*-infected (Ars+) and uninfected (Ars-) strains of *A. citricidus* were established

in the laboratory after collection, molecular characterization by sequencing of the mitochondrial gene cytochrome oxidase I (COI) and diagnostic PCR for assessment of the association of *A. citricidus* to secondary symbionts. Ars+ and Ars- strains were used for biological comparative analysis on two host plants by assessing the development and survival of immatures, longevity and fecundity of adult females; data were also used for the calculation of fertility life table parameters. We observed significant differences in the nutritional suitability of the host plants tested to aphid. *C. sinensis* was identified as much more suitable host to *A. citricidus* than *M. paniculata* regardless of aphid association with *Arsenophonus*. However, *Arsenophonus* was observed to accelerate the aphid immature development when developing on the lower quality host *M. paniculata*. Moreover, Ars+ aphids reared on *M. paniculata* produced females with higher initial fecundity and size, indicating *Arsenophonus* assists in the use of less suitable hosts. Fertility life table data also highlighted the difference between host plants and indicated infected aphids (Ars+) have greater potential for population growth than Ars- aphids. It is suggested that *Arsenophonus*-infected aphids are more suitable and have advantages in comparison to non-infected aphids even when developing on nutritionally inadequate host plants.

Keywords: Host adaptation; Population growth; Nutritional unsuitability; Symbiont

2.1 Conclusões

- *Citrus sinensis* é mais adequado nutricionalmente do que *Murraya paniculata* ao desenvolvimento de isolinhagens de *Aphis citricidus*, infectadas ou não pelo simbiote *Arsenophonus*.
- O simbiote *Arsenophonus* contribui de forma positiva para a aptidão biológica do hospedeiro *Aphis citricidus*, principalmente quando explorando *Murraya paniculata* como fonte nutricional.

3 *Arsenophonus* - UM SIMBIONTE SECUNDÁRIO DE *Aphis citricidus* (Kirkaldy) (Hemiptera: Aphididae) LETAL AO PARASITOIDE *Aphelinus asychis* (Walker) (Hymenoptera: Aphelinidae)

Resumo

O controle biológico por parasitoides é uma das estratégias mais bem sucedidas no controle de insetos pragas, visto a eficiência desses insetos na localização e exploração do hospedeiro, mas a taxa de sucesso de parasitoides depende das relações estabelecidas com o herbívoro hospedeiro e planta por ele explorada. Contudo, insetos podem estabelecer associações com diversas outras formas de vida, como bactérias simbiotes, que podem modificar drasticamente as relações de seu hospedeiro com outros níveis tróficos, já que esses simbiotes podem interferir no processo de exploração da planta hospedeira e na capacidade de resposta do sistema imunológico do hospedeiro contra inimigos naturais. Assim, para que ações bem sucedidas para o controle biológico de pragas com parasitoides possam ser implantadas, seria necessário o conhecimento das relações estabelecidas entre todos os componentes da rede de interações multitróficas representada pela planta hospedeira, o herbívoro, seus simbiotes e o inimigo natural. Esse trabalho teve por objetivo analisar o sucesso de *Aphelinus asychis* (Walker) (Hymenoptera: Aphelinidae) em parasitar o pulgão *Aphis citricidus* (Kirkaldy) (Hemiptera: Aphididae), infectados (Ars+) ou não (Ars-) com o simbiote secundário *Arsenophonus*, criado em planta hospedeira ótima (*Citrus sinensis*) ou subótima (*Murraya paniculata*). Múmias de *A. citricidus* foram coletadas e os parasitoides obtidos caracterizados pela análise de marcadores moleculares (28SD2, ITS2, COI, COII e ArgK). A associação de *A. asychis* ao simbiote *Wolbachia* foi verificada por PCR diagnóstico tendo o gene *wsp* como marcador molecular. Foram realizados experimentos de parasitismo com o intuito de verificar o tempo necessário para a formação de múmias, a porcentagem de parasitismo, o tempo total de desenvolvimento do parasitoide, além da emergência de adultos, a aceitação hospedeira e o desenvolvimento larval. Os resultados obtidos indicaram que o parasitismo por *A. asychis* não foi influenciado pela planta hospedeira utilizada pelo pulgão. Não foi detectada diferença na aceitação do hospedeiro por *A. asychis*; porém, pulgões infectados com *Arsenophonus* apresentaram menor taxa de parasitismo observada, prolongamento da fase larval do parasitoide e ausência de emergência de adultos. Assim, ficou evidente que *Arsenophonus* interfere no sucesso de parasitismo de *A. asychis*, se colocando como um grande problema para o controle biológico de pulgões devido ao completo insucesso no desenvolvimento do parasitoide.

Palavras-chave: Holobionte; Morte larval; Relação multitrófica; Simbiote secundário

Abstract

Biological control by parasitoids is one of the most successful strategies for insect pest control due to their efficiency in the location and exploitation of their hosts, but parasitoid success rates depend on the relationships established with the host herbivore and the herbivore host plant. However, insects can establish associations with several other forms of life, such as bacterial symbionts, which can dramatically alter the relationship of its host with other trophic levels, since symbionts can interfere in the process of host plant use and in the immune response of their hosts against natural enemies. Thus, successful biological pest control with parasitoids may depend on the knowledge of the interactions among all members of the multitrophic interaction network represented by the host plant, herbivore, symbionts and natural enemies. This study aimed to analyze the success of *Aphelinus asychis* (Walker)

(Hymenoptera: Aphelinidae) to parasitize *Arsenophonus*-infected (Ars+) or uninfected (Ars-) *Aphis citricidus* (Kirkaldy) (Hemiptera: Aphididae), reared on optimal (*Citrus sinensis*) or suboptimal (*Murraya paniculata*) host plants. Mummies of *A. citricidus* were collected and the parasitoids obtained were characterized by the analysis of molecular markers (28SD2, ITS2, COI, COII and ArgK). The association of *A. asychis* with *Wolbachia* was checked by diagnostic PCR using the *wsp* gene as a molecular marker. We assessed the time required for aphid mummification, percentage of parasitization, parasitoid total development time, parasitoid survival, host acceptance and parasitoid immature development. We observed aphid parasitization by *A. asychis* was not influenced by the host plant the aphid was reared on. No differences in the acceptance of the Ars+ and Ars- hosts by *A. asychis* were observed; however, *Arsenophonus*-infected aphids had lower parasitism rate and higher time to aphid mummification than uninfected hosts. Moreover, no parasitoid developed to the adult stage in Ars+ hosts. Thus, *Arsenophonus* clearly affected *A. asychis* successful parasitization, posing a major issue for the biological control of aphids due to the complete failure of the development of the parasitoid *A. asychis*.

Keywords: Holobiont; Larval death; Multitrophic relationship; Secondary symbiont

3.1 Conclusões

- *Arsenophonus*, o simbiote secundário de *Aphis citricidus*, afeta o desenvolvimento do parasitoide *Aphelinus asychis*, independentemente da qualidade da planta hospedeira do pulgão;
- O desenvolvimento do parasitoide *Aphelinus asychis* em *Aphis citricidus* infectado por *Arsenophonus* é interrompido em sua fase larval;
- *Arsenophonus* tem a capacidade de recuperar pequena proporção de seu hospedeiro, *A. citricidus*, do parasitismo por *A. asychis*.