

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

A interação *Spiroplasma* - *Lipaphis pseudobrassicae* Davis (Hemiptera: Aphididae):  
efeito na biologia e utilização de plantas hospedeiras

**Letícia Slongo Fortuna**

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

Piracicaba  
2018

Letícia Slongo Fortuna  
Engenheira Agrônoma

A interação *Spiroplasma* - *Lipaphis pseudobrassicae* Davis (Hemiptera: Aphididae): efeito na biologia e utilização de plantas hospedeiras

versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011

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

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

Piracicaba  
2018

## RESUMO

**A interação *Spiroplasma* - *Lipaphis pseudobrassicae* Davis (Hemiptera: Aphididae): efeito na biologia e utilização de plantas hospedeiras**

Os insetos são conhecidos por estabelecer relações de simbiose com bactérias há muito tempo, mas o papel das associações secundárias ainda é pouco conhecido, e por isso há necessidade de avaliações continuadas dos efeitos dessas interações nos insetos hospedeiros. Assim, esse trabalho teve como objetivo a caracterização da diversidade de simbioses associados ao pulgão *Lipaphis pseudobrassicae* Davis (Hemiptera: Aphididae), bem como o efeito dessas associações na biologia e utilização hospedeira por esse inseto. Linhagens clonais de *L. pseudobrassicae* estabelecidas em laboratório foram submetidas a PCRs diagnósticos para a verificação da associação a simbioses secundários, sendo selecionadas cinco linhagens clonais infectadas exclusivamente por *Buchnera* (S-) e cinco linhagens clonais infectadas pelo simbiote secundário *Spiroplasma* (S+). Assim, as linhagens clonais S- e S+ foram utilizadas para condução de estudos de biologia comparada em duas plantas hospedeiras, *Brassica oleracea* var. *capitata* (repolho 60 dias) e *Brassica oleracea* var. *acephala* (couve manteiga Geórgia), para a verificação do efeito da infecção por *Spiroplasma* na biologia e utilização hospedeira por *L. pseudobrassicae*. O delineamento experimental foi em blocos completamente casualizados, sendo isolinhagem e planta hospedeira tratados como fatores, com o fator infecção sendo aninhado ao fator isolinhagem. Os pulgões foram avaliados quanto à sobrevivência (%) e duração da fase ninfal de desenvolvimento (dias), fecundidade diária e total (número de ninfas por fêmea) e longevidade (dias). Para a avaliação da duração da fase ninfal, ninfas neonatas (10) de cada linhagem clonal S- e S+ foram utilizadas na infestação das plantas hospedeiras selecionadas. A mortalidade das ninfas foi inicialmente avaliada 24 horas após a sua transferência para as plantas hospedeiras para se verificar a mortalidade devido à manipulação, tendo a sua sobrevivência avaliada diariamente para observação da mortalidade e duração da fase ninfal. Cada grupo de dez ninfas de cada linhagem clonal, inoculada em cada planta hospedeira foi considerada uma repetição biológica, sendo utilizadas 12 repetições/tratamento (=120 insetos/tratamento). Para a avaliação do efeito da infecção por *Spiroplasma* no potencial reprodutivo de *L. pseudobrassicae*, quando utilizando diferentes hospedeiros, fêmeas recém-emergidas de cada linhagem clonal foram individualizadas em plantas de cada hospedeiro estudado para a observação de sua capacidade reprodutiva e longevidade. Foram utilizadas 25 repetições (1 fêmea = 1 repetição) para cada tratamento (infecção/isolinhagem/planta hospedeira). Os pulgões foram avaliados diariamente para contabilização da fecundidade (número total de ninfas/fêmea), longevidade (dias) e duração da fase reprodutiva do adulto. Os resultados obtidos indicaram que infecções de *L. pseudobrassicae* por *Spiroplasma* não influenciaram os atributos de duração da fase ninfal, duração da fase reprodutiva, longevidade e fecundidade quando utilizando couve ou repolho. A sobrevivência ninfal foi afetada pela interação isolinhagem x planta. Nesse caso, linhagens clonais de *L. pseudobrassicae*, infectadas ou não por *Spiroplasma*, diferem entre si quando explorando couve como planta hospedeira. Além dessa variável, os parâmetros avaliados pela tabela de vida demonstraram sofrer efeito da isolinhagem (aninhada à infecção), e de algumas interações (isolinhagem x planta, planta x infecção). Assim, concluímos que *Spiroplasma* interfere apenas nos parâmetros avaliados através da tabela de vida.

**Palavras-chave:** 1. Capacidade reprodutiva 2. Qualidade nutricional 3. Simbiose 4. Tabela de vida

## ABSTRACT

**The interaction *Spiroplasma* - *Lipaphis pseudobrassicae* Davis (Hemiptera: Aphididae):  
effect on the biology and use of host plants**

Insects have been known to establish symbiotic relationships with bacteria for a long time, however the role of secondary associations is still poorly known, therefore there is a need for continued evaluation of the effects of these interactions on host insects. Thus, this study aimed to characterize the diversity of symbionts associated with the aphid *Lipaphis pseudobrassicae* Davis (Hemiptera: Aphididae), as well as the effect of these associations in the biology and host use by this insect. Laboratory clonal lines of *L. pseudobrassicae* were submitted to diagnostic PCRs to verify the association to secondary symbionts. Five clonal lines exclusively infected by *Buchnera* (S-) and five clonal lines infected with the secondary symbiont *Spiroplasma* (S +) were selected. Thus, clones S- and S + were used to conduct comparative biology studies in two host plants, *Brassica oleracea* var. *capitata* (cabbage 60 days) and *Brassica oleracea* var. *acephala* (kale butter Georgia), for the verification of the effect of *Spiroplasma* infection on biology and host utilization by *L. pseudobrassicae*. The experimental design was completely randomized blocks, with isolate and host plant treated as factors, with the infection factor being nested to the isolate factor. The aphids were evaluated for survival (%) and duration of nymphal phase of development (days), daily and total fecundity (number of nymphs per female) and longevity (days). In order to evaluate the duration of the nymphal phase, neonatal nymphs (10) of each S- and S + clonal lines were used in the infestation of the selected host plants. The mortality of the nymphs was initially evaluated 24 hours after their transfer to the host plants to verify the mortality due to manipulation, and their survival was evaluated daily to observe the mortality and duration of the nymphal phase. Each group of ten nymphs of each clonal line inoculated in each host plant was considered a biological replicate, using 12 replicates / treatment (= 120 insects / treatment). For the evaluation of the effect of *Spiroplasma* infection on the reproductive potential of *L. pseudobrassicae*, when using different hosts, newly emerged females of each clonal lineage were individualized in plants of each host studied to observe their reproductive capacity and longevity. Twenty five replicates (1 female = 1 replicate) were used for each treatment (infection / isolation / host plant). The aphids were evaluated daily for fecundity (total number of nymphs / female), longevity (days) and duration of the adult reproductive phase. The results indicated that *L. pseudobrassicae* infections by *Spiroplasma* did not influence the attributes of nymphal phase and reproductive phase duration, longevity and fecundity when using kale butter or cabbage. The only variable influenced by the studied factors was nymphal survival, which was affected by the isolation x plant interaction. In this case, clonal lines of *L. pseudobrassicae*, infected or not by *Spiroplasma*, differ among them when using cabbage as host plant. In addition to this variable, the parameters evaluated by the life table showed an effect of the isolation (nested to the infection), and of some interactions (isolation x plant, plant x infection). Therefore, we conclude that *Spiroplasma* interferes only in the evaluated parameters through the life table.

**Keywords:** 1. Reproductive capacity 2. Nutritional quality 3. Symbiosis 4. Life table

## 1. INTRODUÇÃO

Como muitos seres vivos, insetos também mantêm associações com microrganismos associados interna ou externamente ao seu corpo, com os quais estabelecem relações de simbiose que variam do parasitismo ao mutualismo (SU et al., 2013). Nos últimos dois bilhões de anos, a simbiose com microrganismos tem sido um processo chave para a evolução de organismos multicelulares (HENRY et al., 2015). Embora os insetos sejam conhecidos por estabelecer relações de simbiose com bactérias há muito tempo, apenas nas últimas décadas a extensão de como isso ocorre tem se tornado aparente (MCLEAN et al., 2010). Tais relações têm ganhado atenção devido à busca pelos mecanismos que permitem a preservação dessas associações, com o objetivo de se proporcionar uma maior compreensão do processo evolutivo dessas interações.

A diversidade filogenética e funcional dos simbiossitos é notável nos insetos, no mínimo 10% de todas as espécies desta classe dependem da simbiose nutricional obrigatória (HENRY et al., 2015). Simbiossitos transmitidos verticalmente muitas vezes exercem efeitos que podem influenciar profundamente a ecologia e evolução dos hospedeiros. Entre os insetos, os simbiossitos hereditários de pulgões são, provavelmente, os mais bem estudados. Quase todos os pulgões exigem um simbiossito primário, *Buchnera aphidicola*, que fornece nutrientes essenciais que não estão disponíveis em quantidades suficientes em seu substrato alimentar, o floema da planta hospedeira (OLIVER et al., 2010). Em contraste com os simbiossitos primários, a associação hospedeiro - simbiossito secundário geralmente não é muito íntima, e tem sido sugerido que, ocasionalmente, esses simbiossitos podem ser transmitidos horizontalmente por via oral (se alimentando de plantas contaminadas com estas bactérias, por exemplo), ou pelo ataque de parasitoides (ovipositor do parasitoide já estava contaminado por ter atacado um inseto infectado com o simbiossito) (OLIVER et al., 2010; DARBY & DOUGLAS, 2003; SANDSTROM et al., 2001).

Os simbiossitos secundários vêm sendo estudados por influenciarem vários aspectos da fisiologia de seus hospedeiros, interferindo na aptidão biológica dos mesmos (LEONARDO & MUIRU, 2003; RUSSELL & MORAN, 2006; MONTLLOR et al., 2002; OLIVER et al., 2003; CHEN et al., 2000; MCLEAN et al., 2010). Os benefícios causados pelas associações secundárias incluem mudança na cor do corpo, que pode influenciar na predação, tolerância

ao calor, melhoria no desempenho do pulgão quando se alimentando de plantas hospedeiras subótimas e proteção contra inimigos naturais (GAUTHIER et al., 2015).

O pulgão da ervilha, *Acyrtosiphon pisum* (Harris) (Hemiptera: Aphididae), é uma das espécie mais utilizadas em estudos de simbiose. A maioria dos resultados relacionados à interação simbiote-hospedeiro e demais fatores envolvidos, como inimigos naturais e alimentação do inseto, tem como espécie modelo esse pulgão. Nesta espécie são conhecidas associações com oito bactérias simbiotes secundárias, sendo cinco delas  $\gamma$ -proteobactérias, *Hamiltonella defensa*, *Regiella insecticola*, *Serratia symbiotica*, *Rickettsiella viridis* e PAXS (simbiote do tipo X de pulgão da ervilha), duas  $\alpha$ -proteobactérias, *Rickettsia* e *Wolbachia*, e o mollicute *Spiroplasma* (GAUTHIER et al., 2015). Outros simbiotes facultativos, incluindo *Arsenophonus*, podem ser encontrados em algumas espécies de pulgões, mas ainda não o foi no pulgão da ervilha (OLIVER, et al., 2010; GOMEZ-VALERO, et al., 2004).

Em *A. pisum*, os efeitos causados pelos simbiotes facultativos variam conforme a bactéria associada. Tolerância ao choque térmico é um desses efeitos. A associação com *S. symbiotica* confere benefícios ao pulgão *A. pisum*, principalmente sob condições de choque térmico, como demonstrado por Montllor et al. (2002) e Russel & Moran (2006). Chen et al. (2000) também documentaram evidências de aumento da tolerância ao calor para *A. pisum* infectado com *S. symbiotica*.

Outro benefício da associação dos pulgões com simbiotes secundários é a proteção contra inimigos naturais. Como os microrganismos, especialmente as bactérias, têm a capacidade de produzir uma grande diversidade de compostos biologicamente ativos, incluindo toxinas, os insetos podem se beneficiar de microrganismos associados capazes de fornecer proteção adicional contra os inimigos (POLIN, et al., 2014). Um exemplo desse benefício é mostrado por Oliver et al. (2003), onde a bactéria *S. symbiotica*, em associação isolada com *A. pisum*, reduziu as taxas de sucesso no parasitismo do pulgão pelo inimigo natural *Aphidius ervi* Haliday (Hymenoptera: Braconidae). Além disso, as mudanças ou variações nas plantas hospedeiras podem alterar o impacto de inimigos naturais; por isso, simbiotes de defesa podem influenciar a capacidade de exploração de novos hospedeiros ou de invasão de novas áreas geográficas (OLIVER et al., 2010).

Sabe-se que alguns simbiotes protegem também contra a predação. Segundo Costopoulos et al. (2014), a sobrevivência de larvas predadoras da joaninha *Hippodamia*

*convergens* Guérin-Meneville (Coleoptera: Coccinellidae) foi diminuída quando foram alimentadas com pulgões da ervilha em associação com os simbiosites facultativos *H. defensa* e *S. symbiotica*. A maioria dos casos conhecidos dessa proteção conferida pelo simbiote envolve a produção de compostos tóxicos pelos simbiosites. Os besouros *Paederus*, por exemplo, abrigam simbiosites produtores de toxinas que impedem a predação por aranhas-lobo (KELLNER, 2003; KELLNER & DETTNER, 1996; PIEL et al., 2004).

A relação de simbiose facultativa também pode influenciar a relação inseto-planta. Existem poucos resultados sobre esse aspecto; porém, sabe-se que em alguns casos há especificidade do simbiote quanto à planta hospedeira preferencial do pulgão, como apresentado por Leonardo & Muiru (2003), onde a infecção com *R. insecticola* foi relacionada ao alto desempenho de clones de pulgão se alimentando em trevo branco (*Trifolium repens*). Tsuchida et al. (2004) encontraram resultados em um clone de *A. pisum* do Japão, onde a infecção com *R. insecticola* melhorou o desempenho em trevo branco, mas não em ervilhaca (*Vicia sativa*). Wagner et al. (2015) encontraram linhagens clonais do pulgão *Aphis craccivora* Koch (Hemiptera: Aphididae) infectadas com o simbiote facultativo *Arsenophonus* que exibiram melhor desempenho em plantas de acácia-falsa em relação aos controles não infectados, enquanto que a infecção com esse simbiote reduziu o desempenho em outras duas plantas hospedeiras, alfafa e fava.

O simbiote secundário *Spiroplasma* também influencia na utilização da dieta pelo hospedeiro (GUIDOLIN et al., 2018). Esses autores relataram o perfil proteômico obtido a partir de pulgões se alimentando de duas plantas hospedeiras, os quais foram bastante diferentes, indicando que *Spiroplasma* afetou a proteômica de *Aphis citricidus* (Kirkaldy) (Hemiptera: Aphididae) diferentemente dependendo da planta hospedeira. *Spiroplasma* é um simbiote facultativo comumente relatado associado a insetos, mas seu papel na biologia do hospedeiro ainda é questionado e explorado (GASPARICH, 2010). A maioria dos membros desse gênero são conhecidos ou suspeitos de serem parasitas, embora o grau de efeitos possa ser extremamente diverso entre diferentes espécies e sob diferentes condições, variando de evidentemente prejudicial até quase neutro e, às vezes, levemente benéfico (WHITCOMB, 1980; WHITCOMB, 1981). Várias linhagens de *Spiroplasma* descobertas mostraram usar tanto o floema das plantas, quanto os habitats do inseto hospedeiro (HACKETT, 1989); no entanto, os insetos são o maior reservatório desses microrganismos (CLARK, 1982; CLARK, 1977) e as superfícies das plantas são importantes na

transmissão horizontal entre os hospedeiros de insetos (DAVIS, 1978; MCCOY et. al, 1979; CLARK et. al, 1987).

Em pulgões, *Spiroplasma* foi mostrado pela primeira vez em *A. pisum*, e injeções em "linhagens de pulgões livres de bactérias" demonstraram que *Spiroplasma* afetou negativamente a biologia do hospedeiro (FUKATSU et. al, 2001). Mais tarde, *Spiroplasma* foi descoberto por conferir proteção contra um entomopatógeno fúngico devido à manipulação do comportamento do pulgão. Pulgões em associação com o simbiote caíam da planta e esporulavam longe dos outros insetos, limitando a propagação da doença (LUKASIK et. al, 2013). Embora esse simbiote seja transmitido verticalmente com alta fidelidade, desde que a taxa de transmissão não seja estritamente 100%, a taxa de infecção por *Spiroplasma* provavelmente declina para zero à medida que a geração hospedeira prossegue (FUKATSU et. al, 2001). Alguns membros desse gênero são mantidos em ciclos no floema de plantas e nos corpos de insetos sugadores de plantas que atuam como vetores (WHITCOMB, 1980; WHITCOMB, 1981). Pode ser possível que *Spiroplasma* seja, às vezes, transmitido de inseto infectado para não infectado via floema de plantas. Alternativamente, a transmissão horizontal via parasitoides também é concebível (HUIGENS et. al, 2000).

Como apresentado, alguns simbioses secundários influenciam na dieta do seu hospedeiro, e essa intervenção pode ter importantes consequências ecológicas e evolutivas. Esses microrganismos apresentam um conjunto de ferramentas com potencial para facilitar a herbivoria do seu hospedeiro, oferecendo capacidade para sintetizar nutrientes, digerir polímeros e neutralizar toxinas de plantas (HANSEN & MORAN, 2014). O simbiote pode ser rapidamente perdido devido a problemas no processo de transmissão para a progênie (DYKSTRA, et al., 2014), da mesma forma que adquirido através de eventos de transmissão horizontal (RUSSELL, et al., 2003; OLIVER, et al, 2008). E, sendo assim, o ganho ou a perda do simbiote pode alterar rapidamente o tipo de planta utilizada pelo herbívoro, mudando abruptamente as especificações ecológicas da linhagem (WAGNER et al., 2015).

O papel das associações com simbioses secundários ainda é pouco conhecido ou pouco esclarecido, e por isso há necessidade de avaliações continuadas dos efeitos dessas interações com insetos hospedeiros e nas suas relações com os demais níveis tróficos. A influência dos simbioses secundários na relação de herbívoros com a planta hospedeira, incluindo pulgões, torna evidente que esses simbioses podem alterar a resposta do



herbívoro aos metabólitos de defesa das plantas e/ou às suas características nutricionais inadequadas, apontando para a possível influência na resposta de insetos aos mecanismos de resistência de plantas a herbívoros, alterando assim a capacidade de utilização dessas plantas pelos insetos (HANSEN & MORAN, 2014). Assim, esse trabalho teve por objetivo a caracterização da diversidade de simbiontes associados ao pulgão *Lipaphis pseudobrassicae* Davis (Hemiptera: Aphididae), bem como o efeito dessas associações na capacidade desse inseto em utilizar duas variedades de brassicas: *Brassica oleracea* var. *capitata* (repolho 60 dias) e *Brassica oleracea* var. *acephala* (couve manteiga Geórgia).

## 2. CONCLUSÕES

- *Spiroplasma* foi o único simbiote secundário encontrado em associação a *Lipaphis pseudobrassicae* nas condições avaliadas neste trabalho
- *Spiroplasma* não interferiu nos parâmetros de duração da fase ninfal, duração da fase reprodutiva, longevidade e fecundidade de *Lipaphis pseudobrassicae* quando utilizando couve ou repolho
- *Spiroplasma*, juntamente com a linhagem, interferiu em todos os parâmetros estimados da tabela de vida, com exceção do  $R_0$ ;

## REFERÊNCIAS

- Chen DQ, Montllor CB, Purcell AH (2000) Fitness effects of two facultative endosymbiotic bacteria on the pea aphid, *Acyrtosiphon pisum*, and the blue alfalfa aphid *A. Kondoi*. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, 95, 315–323
- Clark TB (1977) *Spiroplasma* sp., a new pathogen in honey bees. **J Invertebr Pathol**; 29:112–3.
- Clark TB (1982) Spiroplasmas: diversity of arthropod reservoirs and host-parasite relationships. **Science**; 217:57–9.
- Clark TB, Henegar RB, Rosen L, Hackett KJ, Whitcomb RF, Lowry JE, et al (1987) New Spiroplasmas from insects and flowers: isolation, ecology, and host association. **Isr J Med Sci**; 23:687–90.
- Costopoulos K, Kovacs JL, Kamins A, Gerardo NM (2014) Aphid facultative symbionts reduce survival of the predatory lady beetle *Hippodamia convergens*. **BMC ecology**, 14(1), 5
- Darby AC, Douglas AE (2003) Elucidating the transmission patterns of an insect-borne bacterium. **Appl. Environ. Microbiol.** 69: 4403–4407
- Davis RE (1978) *Spiroplasma* associated with flowers of the tulip tree (*Liriodendron tulipifera* L.). **Can J Microbiol**; 24:954–9.
- Dykstra HR, Weldon SR, Martinez AJ, White JA, Hopper KR, Heimpel GE, Asplen MK, Oliver KM (2014) Factors limiting the spread of the protective symbiont *Hamiltonella defensa* in *Aphis craccivora* aphids. **Appl Environ Microbiol**, 80: 5818–5827
- Ferreira SE (2013) Causa da resistência de *Lipaphis pseudobrassicae* (Davis, 1914) (Hemiptera: Aphididae) ao parasitoide *Diaeretiella rapae* (McIntosh, 1855) (Hymenoptera: Braconidae, Aphidiinae) e sua influência sobre o parasitismo de *Myzus persicae* (Sulzer, 1776). 72f., 2013. **Dissertação de Mestrado - Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia.**
- Fukatsu T, Tsuchida T, Nikoh N, Koga R (2001) *Spiroplasma* symbiont of the pea aphid, *Acyrtosiphon pisum* (Insecta: Homoptera). **Applied and Environmental Microbiology**, 67(3), 1284-1291.
- Gauthier JP, Outreman Y, Mieuze L, Simon JC (2015) Bacterial communities associated with host-adapted populations of pea aphids revealed by deep sequencing of 16S ribosomal DNA. **PLoS ONE**, 10, e0120664
- Gasparich GE (2010) *Spiroplasmas* and *Phytoplasmas*: Microbes associated with plant hosts. **Biologicals** 38, 193–203.
- Gilbert MTP, Moore W, Melchior L, Worobey M (2007) DNA extraction from dry museum beetles without conferring external morphological damage. **PLoS One**, 2 (3), e272
- Gomez-Valero L, Soriano-Navarro M, Perez-Brocal V, Heddi A, Moya A, García-Verdugo JM, Latorre A (2004) Coexistence of *Wolbachia* with *Buchnera aphidicola* and a secondary symbiont in the aphid *Cinara cedri*. **J. Bacteriol.** 186:6626–33
- Guay JF, Boudreault S, Michaud D, Cloutier C (2009) 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. **J. Insect Physiol**, 55, 919–926. (doi:10.1016/j.jinsphys.2009.06.006)
- Guidolin AS, Cataldi TR, Labate CA, Francis F, Cónsoli FL (2018) *Spiroplasma* affects host aphid proteomics feeding on two nutritional resources. **Scientific reports**, 8(1), 2466.
- Hackett KJ, Clark TB (1989) Ecology of spiroplasmas. In: Whitcomb RF, Tully JG, editors. *The mycoplasmas*, vol. 5. **New York: Academic Press**; p. 113–200.
- Hansen AK, Moran NA (2014) The impact of microbial symbionts on host plant utilization by herbivorous insects. **Molecular ecology**, 23(6), 1473-1496

- Haselkorn TS (2010) The *Spiroplasma* heritable bacterial endosymbiont of *Drosophila*. **Fly**, 4(1), 80-87.
- Henry LM, Maiden MCJ, Ferrari J, Godfray HCJ (2015) Insect life history and the evolution of bacterial mutualism. **Ecology letters**, 18, 516-525
- Huigens EM, Luck RF, Klaassen RH, Maas MF, Timmermans MJ, Touthamer R. (2000) Infectious parthenogenesis. **Nature** 405:178–179.
- Kellner, RL (2003) Stadium-specific transmission of endosymbionts needed for pederin biosynthesis in three species of *Paederus* rove beetles. **Entomol Exp Appl**, 107:115–124
- Kellner, RLL, Dettner K (1996) Differential efficacy of toxic pederin in deterring potential arthropod predators of *Paederus* (Coleoptera: Staphylinidae) offspring. **Oecologia**, 107:293–300
- Leonardo TE, Muiru GT (2003) Facultative symbionts are associated with host plant specialization in pea aphid populations. **Proc. R. Soc. Lond. B** 270, S209–S212. (doi:10.1098/rsbl.2003.0064)
- Lukasik P, Guo H, Van Asch M, Ferrari J, Godfray HC (2013) Protection against a fungal pathogen conferred by the aphid facultative endosymbionts *Rickettsia* and *Spiroplasma* is expressed in multiple host genotypes and species and is not influenced by co-infection with another symbiont. **J. Evol. Biol.** 26, 2654–2661.
- Maia A, Luiz AJ (2006) Programa SAS para análise de tabelas de vida e fertilidade de artrópodes: método Jackknife. **Embrapa Meio Ambiente-Comunicado Técnico (INFOTECA-E)**
- Mclean AHC, Van Asch M, Ferrari J, Godfray HCJ (2010) Effects of bacterial secondary symbionts on host plant use in pea aphids. Proceedings of the Royal Society of London Series B: **Biological Sciences**, 278, 760-766
- Mccoey RE, Williams DS, Thomas DL (1979) Isolation of mycoplasmas from flowers. In: Proceedings of the US-ROC plant mycoplasma seminar. Taipei, Taiwan: **National Science Council**; p. 75–81.
- Montllor CB, Maxmen A, Purcell AH (2002) Facultative bacterial endosymbionts benefit pea aphids *Acyrtosiphon pisum* under heat stress. **Ecol. Entomol**, 27, 189–195
- Oliver KM, Campos J, Moran NA, Hunter MS (2008) Population dynamics of defensive symbionts in aphids. **Proc. R. Soc. London Sci. Ser. B** 275:293–99
- Oliver KM, Degnan PH, Burke GR, Moran NA (2010) Facultative symbionts in aphids and the horizontal transfer of ecologically important traits. **Annual review of entomology**, 55, 247-266
- Oliver KM, Russell JA, Moran NA, Hunter MS (2003) Facultative bacteria in aphids confer resistance to parasitic wasps. **PNAS**, 100, 1803–1807
- Piel J, Höfer I, Hui D (2004) Evidence for a symbiosis island involved in horizontal acquisition of pederin biosynthetic capabilities by the bacterial symbiont of *Paederus fuscipes* beetles. **J Bacteriol** 186:1280–1286
- Polin S, Simon JC, Outreman Y (2014) An ecological cost associated with protective symbionts of aphids. **Ecology and evolution**, 4(6), 836-840
- Russell JA, Latorre A, Sabater-Muñoz B, Moya A, Moran NA (2003) Side-stepping secondary symbionts: widespread horizontal transfer across and beyond the Aphidoidea. **Mol. Ecol.** 12:1061–75
- Russell JA, Moran NA (2006) Costs and benefits of symbiont infection in aphids: variation among symbionts and across temperatures. Proceedings of the Royal Society of London Series B: **Biological Sciences**, 273, 603–610
- Sandstrom J, Russell JA, White, JP, Moran NA (2001) Independent origins and horizontal transfer of bacterial symbionts of aphids. **Molecular Ecology**, 10, 210–228
- Simon C, Frati F, Beckenbach A, Crespi B, Liu H, Flook P (1994). Evolution, weighting, and phylogenetic utility of mitochondrial gene sequences and a compilation of conserved polymerase chain reaction primers. **Ann. Entomol. Soc. Am.** 87: 651D701

- Su Q, Zhou X, Zhang Y (2013) Symbiont-mediated functions in insect hosts. **Communicative & integrative biology**, 6 (3), e23804
- Tsuchida T, Koga R, Fukatsu T (2004) Host plant specialization governed by facultative symbiont. **Science** 303:1989
- Tsuchida T, Koga R, Shibao H, Matsumoto T, Fukatsu T (2002) Diversity and geographic distribution of secondary endosymbiotic bacteria in natural populations of the pea aphid, *Acyrtosiphon pisum*. **Mol. Ecol.** 11, 2123–2135. (doi:10.1046/j.1365-294X.2002.01606.x)
- Wagner SM, Martinez AJ, Ruan YM, Kim KL, Lenhart PA, Dehnel AC, White JA (2015) Facultative endosymbionts mediate dietary breadth in a polyphagous herbivore. **Functional Ecology**, 29 (11), 1402-1410
- Whitcomb RF (1981) The biology of spiroplasmas. **Annu. Rev. Entomol.** 26:397–425.
- Whitcomb RF (1980) The genus *Spiroplasma*. **Annu. Rev. Microbiol.** 34: 677–709.