

Cambios en las relaciones planta-áfido-endosimbionte mediados por estrés oxidativo provocado por ozono

*Tesis presentada para optar al título de Doctor de la Universidad de Buenos Aires,
Área Ciencias Agropecuarias*

Marta Cecilia Telesnicki

Lic. en Ciencias Biológicas - Universidad de Buenos Aires- 2009

Lugar de trabajo: IFEVA- CONICET- FAUBA



FAUBA

Escuela para Graduados Ing. Agr. Alberto Soriano
Facultad de Agronomía – Universidad de Buenos Aires



COMITÉ CONSEJERO

Director de tesis

Claudio Marco Ghera

Ing. Agrónomo (UBA)

Co-director

María Alejandra Martínez-Ghera

Lic. en Ciencias Biológicas (CAECE)

Dr. (Oregon State University)

Consejero de Estudios

Joel Arneodo

Biólogo (UNC)

Dr. (UNC)

JURADO DE TESIS

Director de tesis

Claudio Marco Ghera

Ing. Agrónomo (UBA)

JURADO

Susana Puntarulo

Bioquímica (UBA)

Dra. en Bioquímica (UBA)

JURADO

Walter Farina

Lic. en Ciencias Biológicas (UBA)

Dr. en Ciencias Biológicas (UBA)

JURADO

Jorge Zavala

Ing. Agrónomo (UBA)

Doctor (Friedrich-Schiller Universität)

Fecha de defensa de la tesis: 31 de Marzo de 2014

A mis padres
A Mauricio
Mi familia

Agradecimientos

A Claudio Ghersa, M. Alejandra Martínez-Ghersa y Joel Arneodo por su guía, motivación y constante apoyo.

A Analía Menéndez, Romina Cavagnaro, Andrea Ueno y Luis Pérez, por los esfuerzos codo a codo durante los experimentos, la discusión de resultados y escritura.

A Luciana D'Acunto, Fernanda Reyes, Marina Oleiro, a mis compañeros de oficina, a “la Mitocondria” entera, a los “Simbioikos” por la contención, la escucha y las risas que balancean el trabajo.

A mis padres y a Mauricio, por el constante apoyo y comprensión.

A IFEVA, CONICET y FAUBA por brindarme un espacio, infraestructura y financiamiento.

Declaro que el material incluido en esta tesis es, a mi mejor saber y entender, original producto de mi propio trabajo (salvo en la medida en que se identifique explícitamente las contribuciones de otros), y que este material no lo he presentado, en forma parcial o total, como una tesis en ésta u otra institución.

Publicaciones derivadas de la tesis

1. **Telesnicki, M. C.**; Ghera, C. M; Martínez-Ghera, M A; Arneodo, J. Molecular identification of the secondary endosymbiont *Hamiltonella defensa* in the rose-grain aphid *Metopolophium dirhodum*. **Revista Argentina de Microbiología 44 (4): 255-258.**
2. **Telesnicki, M. C.**; Martínez-Ghera, M. A.; Arneodo, J. D.; Ghera, C. M. Ozone pollution direct effect on aphids: revisiting the evidence at individual and population scales. En revisión

ÍNDICE GENERAL

Dedicatoria	v
Agradecimientos	vii
Declaración	ix
Publicaciones derivadas de la tesis	xi
ÍNDICE DE CUADROS	xv
INDICE DE FIGURAS	xvii
Abreviaturas	xix
Resumen	xxi
Abstract	xxiii
Capítulo 1	1
INTRODUCCION GENERAL	1
1.1. El incremento del ozono en la troposfera es parte del cambio global y afecta a los cultivos	3
1.2. Los áfidos son importantes plagas de los cultivos	4
1.3. Las consecuencias de la contaminación con ozono sobre los áfidos aún son inciertas	6
1.4. Las especies reactivas de oxígeno como interfaz para estudiar las interacciones planta-insecto en un contexto de contaminación con ozono	7
1.5. La simbiosis ofrece oportunidades para enfrentar los desafíos del ambiente	8
1.6. Objetivos e hipótesis de la tesis	10
1.7. Estructura de la tesis	11
IDENTIFICACIÓN DE UN NUEVO ENDOSIMBIONTE SECUNDARIO EN <i>METOPLOPHIUM DIRHODUM</i>	13
2.1. Introducción	15
2.2. Materiales y Métodos	16
2.3. Resultados	19
2.4. Discusión	20
EFFECTO DIRECTO DEL OZONO SOBRE LOS ÁFIDOS	23
3.1. Introducción	25
3.2. Materiales y Métodos	27
3.3. Resultados	32
3.4. Discusión	37

Capítulo 4.....	41
EFFECTOS INDIRECTOS DEL OZONO SOBRE LOS ÁFIDOS.....	41
4.1. Introducción.....	43
4.2. Materiales y Métodos.....	44
4.3. Resultados.....	48
4.3.1. Experimento inducción de antioxidantes en plantas de trigo.....	48
4.3.2. Evaluación del efecto indirecto del ozono sobre los áfidos.....	51
4.4. Discusión.....	54
Capítulo 5.....	57
DISCUSIÓN GENERAL.....	57
BIBLIOGRAFÍA.....	65

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 3.1. Concentraciones de ozono empleadas en los tratamientos de exposición directa de áfidos a ozono (Media \pm error estándar).....	28
Cuadro 3.2. Composición de la dieta artificial.....	28
Cuadro 3.3. Proporción de áfidos alados en cada población al finalizar el experimento (Media \pm Desvío Estándar)	35
Cuadro 4.1. Concentraciones de ozono empleadas en los tratamientos de exposición directa de áfidos a ozono (Media \pm error estándar).....	45

INDICE DE FIGURAS

Figura 1.1. Principales reacciones de formación de ozono en la tropósfera a partir de óxidos de nitrógeno reactivo (NOx) y compuestos orgánicos volátiles (VOCs).....	4
Figura 1.2. Representación esquemática del modo de alimentación de los áfidos sobre las plantas.....	5
Figura 1.3. Representación de la suma compleja de efectos a los que se exponen áfidos y plantas en los experimentos de exposición simultánea al ozono.....	7
Figura 1.4. Modelo de los efectos directos e indirectos del ozono sobre los áfidos y sus consecuencias en el crecimiento poblacional.....	11
Figura 2.1. La disposición del gen que codifica para la subunidad 16s ribosomal en un operón distinto del de la subunidad 23s permite distinguir a <i>Buchnera aphidicola</i> del resto de los endosimbiontes.	18
Figura 2.2. Detección de Eubacteria en individuos de <i>Metopolophium dirhodum</i> por PCR.....	19
Figura 2.3. Detección de <i>Hamiltonella defensa</i> en individuos de <i>Metopolophium dirhodum</i> por PCR	20
Figura 3.1. Dispositivos empleados para exponer los áfidos a ozono sobre dieta artificial.....	29
Figura 3.2. Parámetros de estrés oxidativos en áfidos previamente a la exposición y al cabo de la exposición a ozono.....	33
Figura 3.3. Efecto directo del ozono sobre la movilidad de los áfidos.....	33
Figura 3.4. Efectos directos del ozono sobre la mortalidad de los áfidos	34
Figura 3.5. Crecimiento de las poblaciones de áfidos establecidas a partir de individuos expuestos a ozono.....	34
Figura 3.6. Parámetros de estrés oxidativos en áfidos expuestos a ozono.	35
Figura 3.7. Detección de a) <i>Buchnera aphidicola</i> y b) <i>Hamiltonella defensa</i> por PCR, en áfidos expuestos a ozono y en su progenie.....	36
Figura 4.1. Línea de tiempo del experimento de inducción de antioxidantes en plantas de trigo.....	46
Figura 4.2. Línea de tiempo del experimento de evaluación de efectos indirectos del ozono sobre los áfidos.....	47
Figura 4.3. Peroxidación de lípidos (TBARS) en plantas de trigo a lo largo del tiempo. Las barras rayadas corresponden al período de aclimatación de las plantas en las cámaras de exposición. La exposición a ozono se realizó durante los tres días	

subsiguientes, se tomaron muestras al cabo de cada jornada de exposición y los tres días posteriores a la exposición. * $p < 0,05$; *** $p \leq 0,0001$	49
Figura 4.4. Lesiones visibles provocadas por la exposición a ozono en láminas de plantas de trigo.....	50
Figura 4.5. Potencial antioxidante reactivo total (TRAP) en plantas de trigo expuestas a ozono, a lo largo del tiempo. Las barras rayadas corresponden a una semana de aclimatación de las plantas en las cámaras de exposición. La exposición a ozono se realizó durante los tres días subsiguientes y se tomaron muestras de plantas al cabo de cada jornada de exposición. Finalizada la exposición se tomaron muestras diarias los 3 días posteriores. Las letras representan diferencias significativas ($\alpha:0,05$).....	51
Figura 4.6. Parámetros de estrés oxidativo en plantas expuestas a ozono, previo al inicio del tratamiento con áfidos. a) Potencial antioxidante reactivo total (TRAP) y b) Peroxidación de lípidos (TBARS) en las plantas empleadas para la evaluación del éxito y crecimiento poblacional de los áfidos. c) Peroxidación de lípidos (TBARS) en las plantas empleadas para la evaluación del estrés oxidativo en áfidos tras 48 hs de alimentación.....	52
Figura 4.7. Éxito de la colonización y tasa de crecimiento poblacional de áfidos sobre plantas previamente expuestas a ozono. Los áfidos fueron transferidos a las plantas 0 ó 72 hs pasada la exposición a ozono. a) Éxito promedio de colonización sobre casa maceta al cabo de 24 hs de transferidos los insectos. b) Tasa de crecimiento poblacional calculada a partir de los recuentos periódicos del número de individuos en cada maceta.	53
Figura 4.8. Peroxidación de lípidos (TBARS) en áfidos que se alimentaron durante 48 hs de plantas previamente expuestas a ozono.....	54
Figura 5.1. Estado actual del modelo de efectos directos e indirectos del ozono sobre los áfidos propuesto en esta tesis.	60

Abreviaturas

O₃: Ozono

ppb: Partes por billón

ppm: Partes por millón

TBARS: (del inglés) Especies Reactivas al Ácido Tiobarbitúrico

TRAP: (del inglés) Potencial Antioxidante Reactivo Total

[mM]: Concentración milimolar

ϵ : Coeficiente de extinción molar

Resumen

Cambios en las relaciones planta-áfido-endosimbionte mediados por estrés oxidativo provocado por ozono

El aumento del ozono en la tropósfera a niveles perjudiciales para los seres vivos es parte del cambio global. Actualmente, el 2-15% del rendimiento de los principales cultivos se pierde por el ozono. Sin embargo, este impacto debe considerarse en el contexto de la interacción con otros factores de estrés biótico y abiótico. El ozono modifica el balance oxidativo de las plantas y con ello, la susceptibilidad a plagas de insectos. En esta tesis se estudiaron los efectos directos e indirectos del ozono sobre las relaciones planta-áfido-endosimbionte, con énfasis en los antioxidantes como moduladores del crecimiento poblacional. Se evaluó el efecto directo del ozono sobre los áfidos mediante un experimento con dietas artificiales. El ozono no afectó los antioxidantes en los insectos, aunque afectó la peroxidación de lípidos (TBARS): los TBARS fueron mayores en el tratamiento de ozono alto que en la dosis intermedia aunque similares al control. La dispersión de los áfidos fue menor y la mortalidad fue mayor en ambos tratamientos con ozono. No obstante, el crecimiento de las poblaciones establecidas a partir de los áfidos sobrevivientes y la asociación con endosimbiontes primarios y secundarios no fueron afectados por el ozono. Los áfidos (no expuestos) se establecieron exitosamente en plantas previamente expuestas o no a ozono y sus poblaciones crecieron a tasas similares aunque las plantas ozonificadas tuvieran daños visibles. En conclusión, las respuestas idiosincráticas de los áfidos frente al ozono podrían surgir de la interacción entre efectos directos e indirectos y el efecto directo podría reducir el impacto de los brotes epidémicos porque afecta la supervivencia y la dispersión de los áfidos. Además, la incorporación de los endosimbiontes al marco de estudio permitió identificar preguntas importantes que aportarán al futuro conocimiento de los efectos de la contaminación con ozono sobre los áfidos, tales como si los endosimbiontes facultativos podrían disminuir los efectos del ozono protegiéndolos contra el estrés oxidativo o suplementando su nutrición.

Palabras Clave: Cambio Global, Ozono Troposférico, Interacción Planta-Insecto, *Buchnera aphidicola*, Endosimbionte primario, Endosimbionte Facultativo, Especies Reactivas de Oxígeno, Antioxidantes.

Abstract

Changes in plant-aphid-endosymbiont interactions mediated by ozone oxidative stress

Tropospheric ozone increase to harmful concentrations is part of global change. Currently, the main crops yield is reduced by 2-15% due to the effects of ozone. However, this impact should be considered in the context of the interaction with other biotic and abiotic stress factors. Ozone alters the oxidative balance of plants and its susceptibility to insect pests. In this thesis, the direct and indirect effects of ozone on plant-aphid-endosymbiont interaction were addressed, with emphasis on antioxidants as modulators of aphid population growth. We evaluated the direct effect of ozone on aphids in an artificial diet experiment. Ozone did not affect the antioxidant concentration in the insects, although affected lipid peroxidation (TBARS): TBARS were higher in the high ozone treatment than in the intermediate dose, although similar to the control. Aphid dispersion was lower and mortality was higher in both ozone treatments. However, the population growth of aphids previously exposed to ozone and the association with primary and secondary endosymbionts were unaffected by ozone. Aphids (unexposed to ozone) established successfully and their populations grew at similar rates on plants which were previously exposed to ozone or not, although exposed plants showed visible ozone damage. In conclusion, the idiosyncratic responses of aphids to ozone could arise from the interaction between direct and indirect effects and the direct effect may potentially reduce the impact of aphid outbreaks and virus transmission since it affects aphid survival and dispersion. Furthermore, the incorporation of aphids' endosymbionts to the study framework allowed the identification of important questions that will contribute to the future understanding of the effects of ozone pollution on aphids, such as if facultative endosymbionts may diminish the harmful effects of ozone providing protection against oxidative stress or nutritional supplementation.

Keywords: Global Change, Tropospheric Ozone, Plant-Insect Interaction, *Buchnera aphidicola*, Primary Endosymbiont, Facultative Endosymbiont, Reactive Oxygen Species, Antioxidants.

INTRODUCCION GENERAL

1.1. El incremento del ozono en la troposfera es parte del cambio global y afecta a los cultivos

El ozono (O_3) es un gas que se forma y se destruye de forma continua en la atmósfera mediante reacciones fotoquímicas (Figura 1.1). En la estratósfera, estas reacciones fotoquímicas evitan la llegada de los rayos del UV-C a la superficie terrestre y corresponde a lo que comúnmente se llama “capa de ozono”. Sin embargo, los efectos del ozono no siempre son positivos. La acumulación de ozono en la tropósfera, producto de las actividades humanas (IPCC, 2007), tiene impactos negativos sobre la vegetación, la salud humana y los materiales (Ashmore, 2005). Los principales precursores de ozono son los óxidos de nitrógeno reactivo (NO_x : monóxido y dióxido de nitrógeno) y los compuestos orgánicos volátiles (VOCs) que reaccionan en presencia de luz solar (Figura 1.1). Estos precursores pueden tener un origen natural (VOCs emitidos por la vegetación, NO_x del suelo) o antrópico (combustión de combustibles fósiles, actividad industrial). Además, la concentración de ozono se puede incrementar debido a las intrusiones desde las capas superiores de la tropósfera y desde la estratósfera y debido al transporte de ozono desde regiones contaminadas distantes (Vingarzan, 2004).

En la actualidad, los niveles basales de ozono en la atmósfera son suficientes como para afectar negativamente el crecimiento y productividad de los cultivos en varias regiones del mundo (Booker *et al.*, 2009). Se estima que los niveles basales de ozono en la tropósfera se incrementaron entre dos y cinco veces respecto de la concentración a principios del siglo veinte (Vingarzan, 2004) y se calcula que las pérdidas de rendimiento asociadas al ozono varían entre 2,2% y 5,5% para el maíz, entre 3,9% y 15% para el trigo y entre 8,5% y 14% para el cultivo de soja (Wilkinson *et al.*, 2012). El ozono disminuye la tasa de fotosíntesis, acelera la senescencia de las hojas, disminuye el crecimiento y rendimiento de las plantas (Meyer *et al.*, 2000; Xu *et al.*, 2007). Además de provocar lesiones en los tejidos vegetales, el ozono altera el funcionamiento de los mecanismos de defensa y reparación en las plantas.

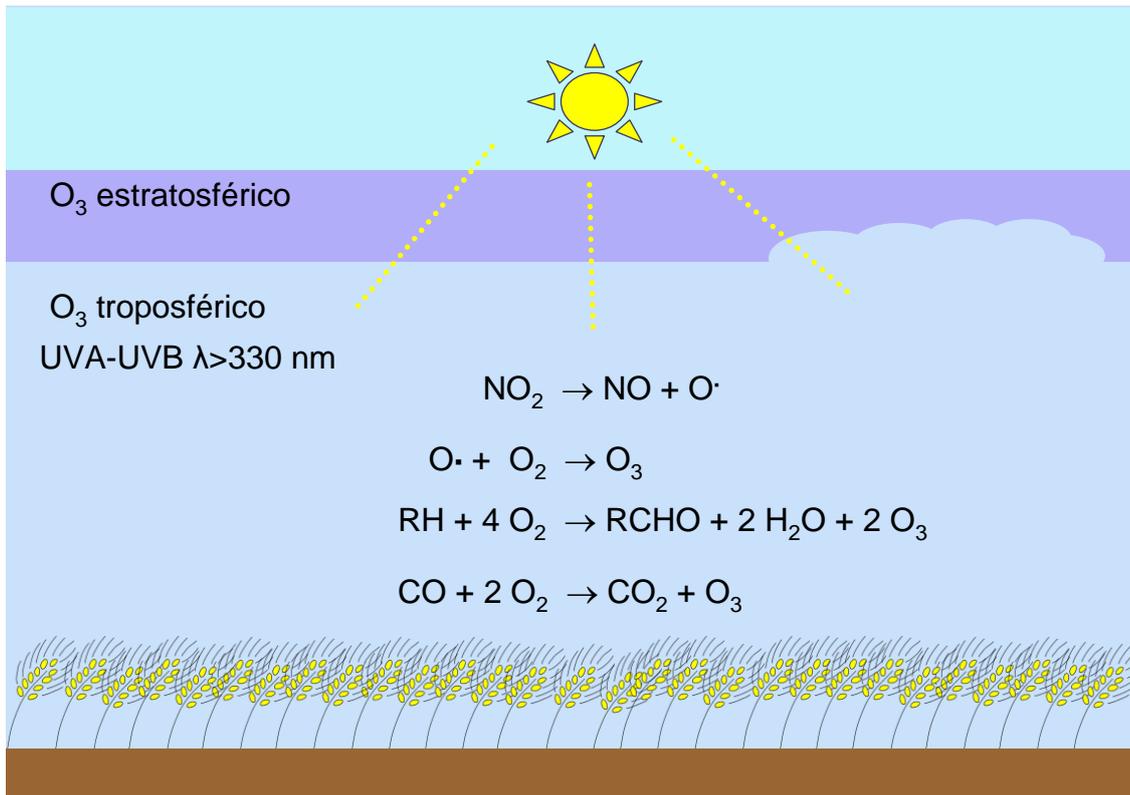


Figura 1.1. Principales reacciones de formación de ozono en la tropósfera a partir de óxidos de nitrógeno reactivo (NO_x) y compuestos orgánicos volátiles (VOCs). NO: monóxido de nitrógeno, NO₂: dióxido de nitrógeno, RH: compuesto orgánico volátil. Adaptado de Iriti y Faoro (2009).

1.2. Los áfidos son importantes plagas de los cultivos

Los áfidos (Hemiptera: Aphididae) reducen el rendimiento de los cultivos por el daño directo que provoca su alimentación y porque la mayoría de las especies son vectores de virus que provocan enfermedades en las plantas (Ng & Perry, 2004; van Emden & Harrington, 2007). El daño por alimentación no involucra solamente la remoción de fotoasimilados, sino que además altera el transporte de fuente a destino (Goggin, 2007) y algunas especies producen una saliva con efecto fitotóxico (Dedryver *et al.*, 2010). Estos insectos tienen un tiempo generacional corto y la capacidad de reproducirse de forma partenogenética, lo que explica sus altas tasas de crecimiento poblacional. Además, dado que tienen un tamaño corporal pequeño y una cutícula delgada (que los torna susceptibles a la deshidratación) requieren de tiempos prolongados de interacción con la planta para sustraer cantidades suficientes de alimento.

Los áfidos tienen un aparato bucal picador-chupador que les permite atravesar el tejido vegetal por vía apoplástica hasta acceder a los elementos del tubo criboso del floema (Figura 1.2). Las piezas bucales de los áfidos están modificadas formando un estilete con dos canales: el alimentario y el salival. Los áfidos insertan el estilete entre

dos células epidérmicas, atraviesan el tejido por vía apoplástica y evalúan la calidad de la planta picando algunas células en su recorrido al floema. A medida que atraviesan el tejido secretan una saliva gelificante, que forma una vaina alrededor del estilete y tiene una doble función: por un lado, actúa como lubricante facilitando el movimiento de entrada y salida del estilete y por otro, sella las punciones realizadas a las células vegetales, evitando la oclusión del floema (Guerrieri & Digilio, 2008). Una vez alcanzado el haz vascular, los áfidos secretan una saliva acuosa, denominada “saliva líquida” rica en enzimas líticas que actúan sobre los tejidos vegetales. Algunas de las enzimas caracterizadas hasta el momento incluyen: fenoloxidasas y peroxidasas, que actuarían transformando los compuestos fenólicos en compuestos de menor toxicidad (Giordanengo *et al.*, 2010).

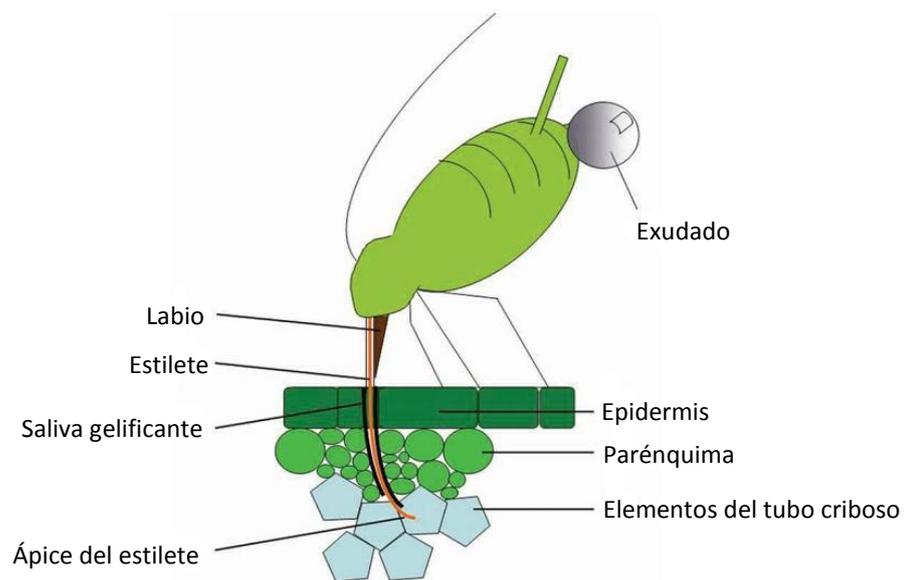


Figura 1.2. Representación esquemática del modo de alimentación de los áfidos sobre las plantas (Adaptado de Guerrieri & Digilio, 2008).

Este modo de alimentación, característico de los hemípteros, tiene repercusiones en la activación de las defensas de las plantas. Las plantas cuentan con dos vías principales de defensa contra herbívoros y patógenos, mediadas por el ácido jasmónico y el ácido salicílico (Thaler *et al.*, 2010). Tradicionalmente se relacionó la vía del jasmónico con las defensas contra insectos masticadores y las defensas mediadas por ácido salicílico con las defensas contra patógenos. Sin embargo, se demostró que los áfidos (y los hemípteros en general) pueden activar y ser susceptibles a ambas vías de defensa (Smith & Boyko, 2007; Thaler *et al.*, 2010), aunque las respuestas de los áfidos frente a las defensas mediadas por ácido salicílico son más consistentes que las mediadas por el jasmónico (Thaler *et al.*, 2010). Esta similitud entre las respuestas de las plantas frente a los hemípteros y los patógenos (Kaloshian & Walling, 2005) ha conducido a diferentes hipótesis de trabajo. Considerando que las vías del ácido jasmónico y del ácido

salicílico son antagonicas (Zarate *et al.*, 2007), algunos autores han propuesto que los hemípteros manipulan las defensas en su beneficio, activando una vía que antagoniza con la que activa las defensas apropiadas, lo que les permitiría mantener una alimentación prolongada sobre una misma planta (Schultz, 2002; Zarate *et al.*, 2007; Walling, 2008). Alternativamente, otros autores sugieren que la activación de la vía del salicílico frente al ataque de áfidos se relaciona con el reconocimiento de los endosimbiontes de los áfidos (Smith & Boyko, 2007).

1.3. Las consecuencias de la contaminación con ozono sobre los áfidos aún son inciertas

Una de las maneras en las que se espera que el cambio global afecte la productividad de los agroecosistemas es a través de cambios en las epidemias de insectos (Fuhrer, 2003). Como se mencionó previamente, el incremento de la concentración de ozono en la atmósfera modifica la susceptibilidad de las plantas al ataque de los insectos. Sin embargo, nuestra comprensión desde la óptica de los insectos es más limitada. En particular, las respuestas de los áfidos frente al ozono son variables. Hasta el momento, se han detectado efectos tanto positivos, como negativos y neutros sobre los áfidos (Warrington, 1989; Jackson, 1995; Holopainen & Kossi, 1998; Holopainen, 2002; Awmack *et al.*, 2004; Menéndez *et al.*, 2010; Peltonen *et al.*, 2010; Mondor *et al.*, 2010). En los primeros trabajos se detectó un efecto positivo del ozono sobre el crecimiento individual de los áfidos (Warrington, 1989; Jackson, 1995), aunque luego se demostró que el crecimiento individual no permite predecir el crecimiento poblacional (Holopainen & Kossi, 1998; Awmack *et al.*, 2004; Mondor *et al.*, 2010). En los trabajos posteriores se volvió evidente que diferentes parámetros poblacionales de la misma especie podían cambiar en sentidos opuestos bajo un mismo nivel de ozono. Por ejemplo, en un experimento realizado con el áfido *Cinara pilicornis*, la exposición a ozono redujo el tiempo de desarrollo de los áfidos, pero la tasa de crecimiento de las ninfas de la generación siguiente fue menor y en suma no afectó el crecimiento poblacional (Holopainen & Kossi, 1998). En contraste, Awmack y colaboradores, 2004 encontraron que el ozono redujo el crecimiento poblacional aunque no afectó la tasa de crecimiento individual, el tiempo de desarrollo, el peso de los individuos ni el número de embriones por adulto. En la mayoría de estos trabajos, los áfidos y las plantas fueron expuestos a ozono de manera conjunta y las explicaciones de los resultados se centraron en cambios en la calidad nutricional de las plantas: senescencia prematura, relocalización de nutrientes desde tejidos dañados por ozono y lignificación prematura (Holopainen, 2002).

Este enfoque minimiza la complejidad de los efectos, que pueden operar de manera simultánea en estos sistemas (Figura 1.3). Mientras que la mayoría de los trabajos destaca los efectos directos del ozono sobre las plantas y sus consecuencias sobre los insectos (efectos indirectos del ozono) mediante variaciones en la calidad nutricional,

otras posibilidades han sido escasamente exploradas. Por ejemplo, el ozono tiene efectos directos y negativos en otros insectos, en los que provoca acumulación de daño oxidativo y mortalidad (Cross *et al.*, 2002; Holmstrup *et al.*, 2011). El trabajo de Jackson, 1995 es el único que evaluó los efectos directos del ozono sobre los áfidos y concluyó que no eran significativos. Sin embargo, esta evaluación se restringió al impacto del ozono sobre el crecimiento individual y no se evaluaron efectos de toxicidad ni parámetros poblacionales. En caso de demostrarse efectos directos del ozono sobre los áfidos, cabría también la posibilidad de evaluar los efectos indirectos del ozono sobre las plantas, mediados por los áfidos. En otras palabras, esto correspondería a reconocer que el ozono podría modificar la capacidad de los áfidos de establecerse en una planta.

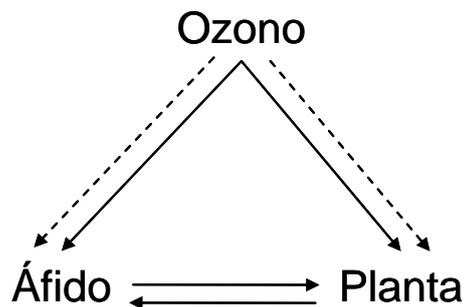


Figura 1.3. Representación de la suma compleja de efectos a los que se exponen áfidos y plantas en los experimentos de exposición simultánea al ozono. Las flechas de trazo completo representan los efectos directos y las de trazo quebrado los indirectos.

Además de que estas cadenas de efectos directos e indirectos pueden presentarse de forma simultánea, los efectos que se detectan en una escala dada, no pueden ser extrapolados directamente a otra diferente, tal como ocurre con la tasa de crecimiento individual y la de crecimiento poblacional en áfidos expuestos a ozono (Holopainen & Kossi, 1998; Awmack *et al.*, 2004; Mondor *et al.*, 2010). En resumen, a partir de este análisis resulta más evidente que mejorar nuestra comprensión de los efectos del ozono sobre los áfidos requiere primero desacoplar esta suma de efectos para luego integrarlos a través de las distintas escalas.

1.4. Las especies reactivas de oxígeno como interfaz para estudiar las interacciones planta-insecto en un contexto de contaminación con ozono

El ozono ingresa a la planta a través de los estomas y rápidamente se degrada dando lugar a la acumulación de especies reactivas de oxígeno (ROS, del inglés *Reactive Oxygen Species*) en el apoplasto. La percepción de ROS en la planta induce un estallido oxidativo endógeno (Kangasjärvi *et al.*, 2005) que es similar al que ocurre en la respuesta hipersensible contra patógenos (Zuccarini, 2009) y cuando la planta es atacada por insectos (Kerchev *et al.*, 2012). Es decir que el ozono activa mecanismos de

defensa comunes a otras amenazas. Este fenómeno de comunicación cruzada entre factores de estrés biótico y abiótico podría incrementar o disminuir la susceptibilidad de las plantas al ataque de insectos (Rouhier & Jacquot, 2008; Bidart-Bouzat & Imeh-Nathaniel, 2008; Menéndez *et al.*, 2009; Peltonen *et al.*, 2010) y modificar también la capacidad de los insectos de explotar a las plantas en un ambiente con crecientes concentraciones de ozono. Las especies reactivas del oxígeno son, además, parte de la defensa de las plantas (Johnson & Felton, 2001). El incremento de la concentración de ROS provoca daño oxidativo directo a los áfidos (Smith & Boyko, 2007), que es contrarrestado por enzimas y compuestos antioxidantes en los insectos (Lukasik, 2007). Es decir que ROS y antioxidantes son una moneda de cambio importante en la interacción planta-insecto, que además puede ser modificada por el ozono.

Las reacciones oxidativas provocadas por el ozono no son exclusivas de las plantas, sino que el ozono también provoca daño oxidativo en animales (Thiele *et al.*, 1997; Wagner *et al.*, 2001; Cross *et al.*, 2002). En los insectos, la exposición a ozono provoca peroxidación de lípidos y, aplicado en altas dosis, provoca mortalidad, lo que hace del ozono un gas útil para el tratamiento de productos almacenados (Cross *et al.*, 2002; Holmstrup *et al.*, 2011). Sin embargo, los efectos directos del ozono han sido poco estudiados en los áfidos (Jackson, 1995).

En resumen, el aumento en la concentración de ozono en la tropósfera reduce el rendimiento de los cultivos agrícolas y podría modificar el impacto de las plagas agrícolas, aunque la información disponible hasta el momento impide realizar proyecciones claras al respecto. Por otro lado, dado que el ozono conduce a la acumulación de ROS en los seres vivos, la inclusión del estrés oxidativo en la presente tesis resulta ineludible. Tal como se mencionó anteriormente, los ROS y los antioxidantes son una moneda de cambio importante en la interacción planta-insecto, que además puede impactar a diferentes niveles de organización. A nivel molecular, los ROS afectan la señalización de vías de defensa y reparación. A nivel celular, la acumulación excesiva de ROS puede llevar a la muerte celular. A nivel tisular, puede llevar al malfuncionamiento de órganos y de allí a variaciones en rasgos de historia de vida de los organismos que pueden a su vez traducirse en variaciones de las tasas vitales a nivel poblacional.

1.5. La simbiosis ofrece oportunidades para enfrentar los desafíos del ambiente

Las asociaciones simbióticas son un fenómeno ubicuo en la naturaleza que permite a animales y plantas adquirir nuevas capacidades metabólicas (Chaston y Goodrich-Blair, 2010; Moran, 2007) y explotar nichos que de otra manera serían inaccesibles. Por ejemplo, los áfidos se alimentan exclusivamente del floema de las plantas, que es pobre en aminoácidos esenciales. Sin embargo, la asociación con *Buchnera aphidicola* (Enterobacteriaceae) es el simbiote primario de los áfidos, excepto en las familias Phylloxeridae y Adelgidae, y en algunas especies de

Hormaphididae (Douglas, 1998). Esta simbiosis mutualística tiene base nutricional dado que la bacteria sintetiza metionina, cisteína y triptófano (aminoácidos esenciales que los áfidos no pueden obtener a partir de la dieta), a partir de ácido glutámico (Douglas, 1998b). La relación entre áfidos y *B. aphidicola* se considera como un mutualismo obligado, dado que no se conocen formas de vida libre de la bacteria y los áfidos que pierden al endosimbionte son de menor tamaño y de fecundidad reducida (Baumann *et al.*, 1995; Douglas, 1998a). Estas bacterias se alojan dentro de los simbiosomas, que son vesículas dentro de un tipo de células llamado bacteriocitos o micetocitos. Los bacteriocitos se agrupan en una estructura bilobada dentro de la cavidad del cuerpo de los áfidos llamada bacterioma o micetoma (Baumann *et al.*, 1995). La transmisión de *Buchnera* es estrictamente vertical. La asociación áfido-*Buchnera* se remonta a 150-250 millones de años atrás, cuando un ancestro de los áfidos actuales fue infectado por una bacteria de vida libre. A partir de entonces comenzó la co-especiación y diversificación sincrónica del hospedador y el simbiote, tal como lo demuestra la congruencia de los árboles filogenéticos.

Además de esta asociación, es frecuente que los áfidos alberguen endosimbiontes facultativos que no son estrictamente necesarios para la supervivencia del hospedador. Muchas proveen beneficios sólo en condiciones ambientales particulares e incluso pueden tener efectos negativos sobre el *fitness* (Russell & Moran, 2006; Castañeda *et al.*, 2010; Vorburger & Gouskov, 2011). Estos endosimbiontes pueden hallarse libres en el hemocele, en algunos tipos de células e incluso dentro del micetoma ocupado por *B. aphidicola* (Tsuchida *et al.*, 2002; Sakurai *et al.*, 2005; Moran *et al.*, 2005). Mientras que la transmisión de *B. aphidicola* es estrictamente vertical, de madres a hijas, los endosimbiontes facultativos pueden transmitirse de forma vertical horizontal u horizontal (Douglas, 1998b). Los beneficios mejor descritos de la simbiosis con endosimbiontes secundarios son la defensa contra avispas parasitoides y la protección contra el estrés térmico (Haynes *et al.*, 2003; Haine, 2008).

Los mutualismos se establecen y disuelven en escalas de tiempo evolutivas. Sin embargo, las tasa de cambio en estos procesos podrían modificarse en el presente escenario de cambio global (Tylianakis *et al.*, 2008; Kiers *et al.*, 2010), generando nuevos interrogantes: 1) Si estas simbiosis pueden cambiar de mutualismo a antagonismo. 2) Si la relación simbiótica entre organismos puede desaparecer. 3) Si la pérdida de la simbiosis puede llevar a la extinción de especies. Evaluar estas preguntas en el contexto de las relaciones áfido-endosimbionte puede ser de importancia para comprender las respuestas variables de los áfidos expuestos a dosis elevadas de ozono. Si relacionamos nuestro conocimiento previo sobre las simbiosis áfido-bacteria con los interrogantes planteados previamente, se plantean las siguientes posibilidades: 1) que la protección contra factores de estrés ambiental que brindan los endosimbiontes funcione bajo ciertos rangos de variación ambiental, por fuera de los cuales los costos de la asociación superen a los beneficios (Russell & Moran, 2006; Castañeda *et al.*, 2010;

Vorburger & Gousskov, 2011). En esta situación, si las bacterias retienen factores asociados a patogenicidad, la relación podría cambiar a un antagonismo, ó 2) podría romperse la asociación. Dependiendo del grado de interdependencia de los simbioses, uno de las especies podría extinguirse (3).

1.6. Objetivos e hipótesis de la tesis

El objetivo general de esta tesis es determinar si el ozono puede alterar las relaciones planta-áfido-endosimbiontes. Los objetivos específicos de esta tesis son:

- Describir los efectos de diferentes regímenes de estrés por ozono sobre el crecimiento de las poblaciones de áfidos.
- Evaluar el efecto directo del ozono sobre los áfidos a nivel individual y poblacional.
- Evaluar el rol de los antioxidantes como reguladores de la dinámica poblacional de los áfidos.
- Caracterizar la biota endosimbionte de la población de áfidos empleada en los experimentos de esta tesis.
- Evaluar cambios en la composición de la biota endosimbionte (presencia/ausencia) en áfidos sometidos a diferentes condiciones de estrés y asociarlo a la capacidad de generar nuevas colonias de áfidos en plantas no estresadas.

La hipótesis general es que los episodios de ozono troposférico afectan la dinámica poblacional de los áfidos modificando su poder antioxidante directamente, e indirectamente a través del impacto sobre los endosimbiontes y las plantas huésped (Figura 1.4). La **hipótesis específica 1** es que los episodios de estrés agudo por ozono alteran el balance oxidativo de los áfidos. La **hipótesis específica 2** es que la colonización de nuevas plantas depende del potencial antioxidante de los insectos. La **hipótesis específica 3** es que la exposición a ozono reduce la movilidad de los áfidos. La **hipótesis específica 4** es que el daño oxidativo provocado por el ozono puede desacoplar la simbiosis con *B. aphidicola* y *H. defensa*. La **hipótesis específica 5** es que el ozono tiene un efecto indirecto positivo sobre el crecimiento de las poblaciones, mediado por la incorporación de antioxidantes de origen vegetal.

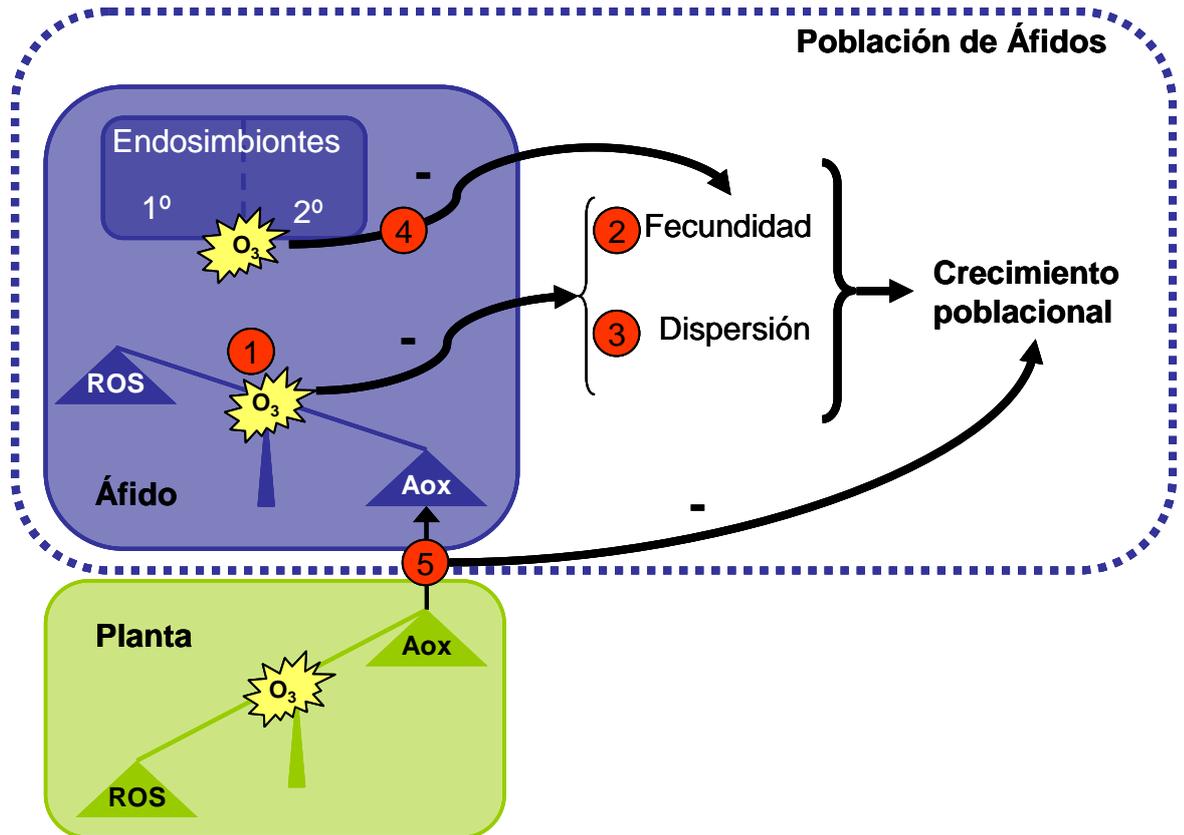


Figura 1.4. Modelo de los efectos directos e indirectos del ozono sobre los áfidos y sus consecuencias en el crecimiento poblacional. Los números corresponden a las hipótesis específicas que se evalúan en la tesis.

1.7. Estructura de la tesis

La tesis consta de cinco capítulos. El primero corresponde a la introducción general, en el que se presentan los antecedentes, objetivos e hipótesis que motivaron este trabajo. En el segundo capítulo de la tesis se describe la asociación del áfido *Metopolophium dirhodum* con el endosimbionte secundario *H. defensa*, previamente desconocida. En el tercer capítulo se evalúan los efectos directos del ozono en términos de las hipótesis específicas 1, 2, 3 y 4. En el cuarto capítulo se evalúa el efecto indirecto del ozono sobre los áfidos en términos de la hipótesis específica 5. En el quinto capítulo se realiza una síntesis final y discusión general de los resultados de este trabajo.

**IDENTIFICACIÓN DE UN NUEVO ENDOSIMBIONTE SECUNDARIO EN
*METOPLOPHIUM DIRHODUM***

2.1. Introducción

Las interacciones simbióticas permiten a los áfidos incorporar nuevas capacidades metabólicas que posibilitan un mejor ajuste al ambiente (Moran, 2007). Además de la simbiosis obligada con *Buchnera aphidicola* (ya mencionada en el capítulo 1) los áfidos albergan a otras bacterias endosimbiontes que reciben el nombre de secundarias o facultativas (Moran & Baumann, 2000). A diferencia de la simbiosis con *B. aphidicola*, la asociación con estas bacterias no es estrictamente necesaria para la supervivencia del hospedador. Muchas proveen beneficios sólo en condiciones ambientales particulares e incluso pueden tener efectos negativos sobre el *fitness* (Russell & Moran, 2006; Castañeda *et al.*, 2010; Vorburger & Gousskov, 2011). Los endosimbiontes secundarios pueden hallarse libres en el hemocele, en algunos tipos de células e incluso dentro del micetoma ocupado por *B. aphidicola* (Tsuchida *et al.*, 2002; Sakurai *et al.*, 2005; Moran *et al.*, 2005). Además de transmitirse verticalmente de madres a hijas, los endosimbiontes secundarios se transmiten horizontalmente dentro y entre especies (Oliver *et al.*, 2010).

Existen al menos seis endosimbiontes secundarios de áfidos: *Hamiltonella defensa*, *Serratia symbiotica*, *Regiella insecticola*, *Rickettsia* sp., *Spiroplasma* sp. y *Arsenophonus* sp. (Tsuchida *et al.*, 2002; Oliver *et al.*, 2003; Russell & Moran, 2006; Haine, 2008; Wille & Hartman, 2009). *H. defensa* bloquea el desarrollo larval de las avispa parasitoides *Aphidius ervi* y *A. eadyi* (Hymenoptera: Braconidae) (Oliver *et al.*, 2003; Degan *et al.*, 2009), aunque la efectividad de esta depende de la presencia de un bacteriófago (Moran *et al.*, 2005; Weldon *et al.*, 2013). *S. symbiotica* también provee defensa contra el parasitoide *A. ervi* (Russell & Moran, 2006; Haine, 2008). Además, el ambiente puede regular la presencia y la densidad de endosimbiontes primarios y secundarios en pulgones (Wilkinson *et al.*, 2007). En muchos casos a pesar de cohabitar el mismo insecto, el simbiote obligado y el facultativo pueden responder de diferentes maneras al estrés nutricional al que se ve sometido el huésped. En un estudio hecho con diferentes dietas la densidad del secundario aumentó con dietas pobres en nitrógeno mientras que la del endosimbionte primario aumentó con dietas ricas (Wilkinson *et al.*, 2007). Más aún, a diferencia de la asociación estable entre los áfidos y sus simbiotes primarios, la presencia o ausencia de los facultativos puede estar fuertemente regulada no solo por fallas en la transmisión sino por la calidad del ambiente (Mandrioli & Manicardi, 2013).

La simbiosis con *R. insecticola* provee defensa contra hongos (Haine, 2008) y existen algunas evidencias de que permitiría a *Acyrtosiphon pisum* utilizar al trébol blanco (*Trifolium repens*) como planta hospedadora (Tsuchida *et al.*, 2004), aunque otro trabajo demuestra lo contrario y sugiere la existencia de interacciones entre el genotipo del hospedador y el genotipo del endosimbionte (Leonardo, 2004). Los efectos de la simbiosis sobre los hospedadores dependen de la temperatura (Russell & Moran, 2006). Por un lado, la presencia de *S. symbiotica* y *H. defensa* redujo los efectos negativos del

estrés térmico sobre el fitness de los áfidos. Sin embargo, cuando la exposición al estrés fue prolongada, la presencia de *S. symbiotica* tuvo un efecto negativo sobre la supervivencia de los insectos. Por otro lado, la presencia de *R. insecticola* tuvo un efecto negativo sobre la supervivencia de los áfidos expuestos a estrés térmico. Se presume que los efectos positivos de *S. symbiotica* en condiciones de estrés térmico están asociados a un efecto positivo de este endosimbionte sobre *B. aphidicola* (Montllor *et al.*, 2002; Russell & Moran, 2006), poniendo en relieve la importancia de las interacciones entre los distintos endosimbiontes presentes en el áfido. No obstante, las interacciones entre endosimbiontes también pueden ser antagónicas, como el caso de la presencia de *Rickettsia sp.*, que tiene efectos negativos sobre los áfidos (Sakurai *et al.*, 2005).

La mayoría de estas asociaciones áfido-bacteria fueron descritas en una sola especie de áfido (*Acyrtosiphon pisum*), mientras que existen al menos 14 especies de áfidos que provocan perjuicios importantes a la agricultura (van Emden & Harrington, 2007). El pulgón amarillo de los cereales *Metopolophium dirhodum* (Walker, 1849) provoca pérdidas en los cultivos asociadas a la alimentación directa y a la propagación de virus (Leclercq-Le Quilicq *et al.*, 1995). Esta especie, de origen paleártico, actualmente tiene una distribución mundial y fue registrado en Sudamérica entre las décadas de 1960 y 1970, momento en el que provocó un daño considerable en los cultivos de trigo (Blasco & Torres, 1977; Lopes-da-Silva & Vieira, 2007). A pesar de su relevancia, nuestro conocimiento sobre la biología de *M. dirhodum* es limitado. Así como ocurre con la mayoría de las especies de áfidos, su biota endosimbionte es desconocida. El objetivo de este capítulo es describir la biota endosimbionte de la población de *M. dirhodum* empleada en los experimentos del tercer y cuarto capítulo de esta tesis.

2.2. Materiales y Métodos

2.2.1. Áfidos y Extracción de ADN

Los individuos de *M. dirhodum* empleados provienen de una cría en condiciones controladas de temperatura ($22^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$) y luz (12:12) establecida a partir de áfidos colectados en el campo experimental de IFEVA, Facultad de Agronomía, Universidad de Buenos Aires ($34^{\circ} 35' \text{S}$, $58^{\circ} 29' \text{O}$), durante Enero y Febrero de 2011. En Octubre de 2011 se colectaron individuos adicionales en el campo, que fueron procesados inmediatamente.

Las extracciones de ADN total se realizaron partiendo de áfidos individuales siguiendo un protocolo modificado a partir de Doyle y Doyle (1987). Cada áfido fue molido en 500 μl de buffer CTAB 2% al que se le agregó un 0,2% de β -mercaptoetanol. Una vez homogeneizado, se incubó a 65°C durante 30 minutos, agitando cada 5 minutos. Posteriormente se agregó 500 μl de Cloroformo-Alcohol isoamílico (24:1), se

agitó enérgicamente y se centrifugó a 10000 rpm durante 10 minutos. La fase acuosa fue recuperada en un tubo nuevo al que se le agregaron 0,7 volúmenes de alcohol isopropílico, se mezcló suavemente y se dejó reposar durante 35 minutos a temperatura ambiente. Pasado ese lapso, se centrifugó a 12000 rpm durante 15 minutos, se secó el pellet en estufa durante 15 minutos y se resuspendió en 15 µl de agua estéril. El rendimiento y calidad de la extracción fueron determinados empleando un espectrofotómetro NanoDrop 1000 spectrophotometer (NanoDrop Technologies, Wilmington DE, USA). Las muestras fueron almacenadas a -18°C.

2.2.2. Amplificaciones de PCR

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés) es una técnica molecular que permite amplificar selectivamente fragmentos pequeños de ADN presentes en una muestra. La amplificación requiere de un par de secuencias o cebadores (en inglés: *primers*) que enmarquen la secuencia de interés y se logra a partir de una serie de pasos de desnaturalización, hibridación y elongación de las cadenas de ADN. Estos ciclos se repiten hasta enriquecer la muestra en la secuencia de interés. En el caso del diagnóstico de endosimbiontes en los áfidos se emplean cebadores específicos de bacterias. El resultado se evalúa empleando electroforesis en un gel de agarosa, que separa los fragmentos de ADN según su tamaño relativo y donde la presencia/ ausencia del producto de la amplificación se traduce en la presencia/ ausencia de una banda. En otras palabras, la presencia de una banda del tamaño del fragmento esperado corresponde con la presencia de la bacteria en el insecto.

En la mayoría de los taxa bacterianos, el gen que codifica para la subunidad 16S ribosomal está unido al de la subunidad 23S por medio de un espaciador intergénico (IGS). Sin embargo, los genes de las subunidad 16S y 23S no están en el mismos operón en el caso de *Buchnera* (Figura 2.1) (Shigenobu *et al.*, 2000; Tamas *et al.*, 2002). Esta característica distintiva permite diagnosticar la presencia de endosimbiontes secundarios. Las secuencias correspondientes al gran parte del gen codificante de la subunidad 16S ribosomal, el espaciador intergénico y parte del gen codificante de la subunidad 23S se amplificaron empleando el par de cebadores 10F/480R (Sandström *et al.*, 2001). Los productos de esta aplicación fueron clonados y secuenciados. Luego se compararon las secuencias obtenidas con las disponibles en GenBank para lograr la identificación de los endosimbiontes secundarios presentes en la población.

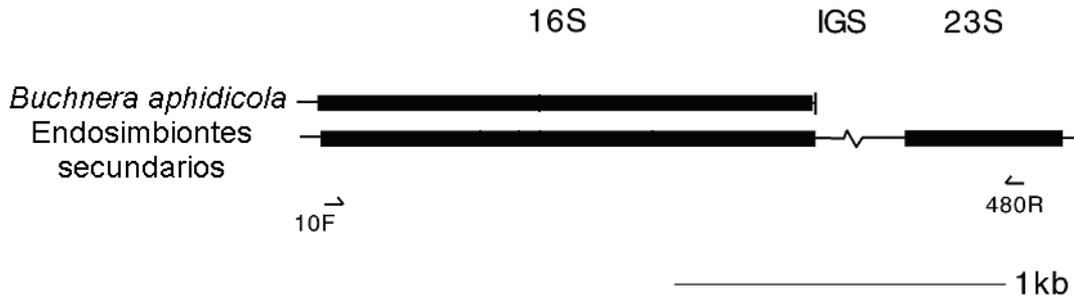


Figura 2.1. La disposición del gen que codifica para la subunidad 16s ribosomal en un operón distinto del de la subunidad 23s permite distinguir a *Buchnera aphidicola* del resto de los endosimbiontes. 16S y 23S corresponden a los genes que codifican para la subunidad 16s y 23s de los ribosomas, respectivamente. IGS corresponde al interespaciador intergénico que une a estos dos genes en Eubacteria. 10F y 480R corresponden a los cebadores empleados para detectar a los endosimbiontes secundarios por PCR (Adaptado de Sandström et al., 2001).

Las reacciones de PCR se realizaron en un termociclador Eppendorf Mastercycler® (Eppendorf AG, Hamburgo, Alemania), con las siguientes condiciones: 30 ciclos de 94°C por 1 minuto, 54°C por 1 minuto y 68°C por 3 minutos. El fragmento correspondiente tiene un tamaño esperado de 2,25 kb y se visualizó en un gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio. En todas las reacciones se empleó alguno de los siguientes controles negativos: *Schizaphis graminum*, que no alberga endosimbiontes secundarios (Sandström et al., 2001) o *Epinotia* sp (Lepidoptera: Tortricidae), tras evaluar su estado de infección en un mismo experimento con *S. graminum*.

El diagnóstico de *Hamiltonella* se confirmó con PCR con los cebadores específicos PABSF y el primer general inverso 16SB1 (Darby et al., 2001; Douglas et al., 2006), también dirigidos a una porción del ARNr 16S cuyo producto es un fragmento de 1,66 kb. Las amplificaciones se realizaron siguiendo las mismas condiciones que para el par 10F/480R.

2.2.3. Clonado y Secuenciación

El producto de la amplificación del ADN extraído a uno de los *M. dirhodum* con el par de cebadores universales para eubacteria 10F y 480R, fue purificado del gel de agarosa y clonado por electroporación en *E. coli* DH5α empleando el kit PCR 2.1 TOPO TA (Invitrogen, Carlsbad CA, EEUU) siguiendo las indicaciones del fabricante. Las bacterias transformadas se cultivaron en LB con ampicilina. El plásmido se purificó con el kit QIAprep® Spin Miniprep Kit (QIAGEN GmbH, Hilden, Alemania), siguiendo el protocolo provisto por el fabricante. Dos clones fueron secuenciados en un analizador ABI PRISM XL (Applied Biosystems, Foster City CA, EEUU) en el Instituto de Biotecnología (INTA Castelar, Argentina). El secuenciado se realizó con los

cebadores para plásmidos M13F y M13R (Invitrogen, Carlsbad CA, EEUU), y un nuevo par de cebadores diseñado para la porción central del inserto: HintForw (5'-CATTGAAACTG GGTCGCTA-3') y HintRev (5'-TGTCCTAGGCCTCTAGACG AA-3'). Las secuencias obtenidas se compararon con las bases de datos genéticos.

2.3. Resultados

Las primeras amplificaciones realizadas con los cebadores universales para Eubacteria resultaron positivas en las tres muestras de *M. dirhodum* y en el control positivo (*Escherichia coli*), y negativas en el caso de *S. graminum* (control negativo), *Epinotia* sp, *Cydia pomonella* y agua (Figura 2.2). Para descartar que las infecciones con Eubacteria correspondieran a contaminaciones se realizaron nuevas extracciones a partir de pulgones lavados en solución de hipoclorito de sodio al 10%. Tanto las muestras de áfidos lavados como aquellos sin lavar resultaron en amplificaciones del tamaño esperado, al igual que el control positivo. Por el contrario, dos muestras de Delfacidae, los dos controles negativos (*Epinotia* sp) y el agua no mostraron ninguna banda. A partir de estos resultados se evaluó si la identidad del endosimbionte secundario coincidía con *Hamiltonella defensa* mediante PCR empleando el par de cebadores específicos para *Hamiltonella* PABSF/16SB1. Se amplificaron fragmentos del tamaño esperado en las cuatro reacciones realizadas con *M. dirhodum*, mientras que no se detectaron bandas en el control negativo (*S. graminum*) ni en la muestra de agua (Figura 2.3). Finalmente, este resultado fue confirmado con la secuenciación del fragmento amplificado con los cebadores para Eubacteria.

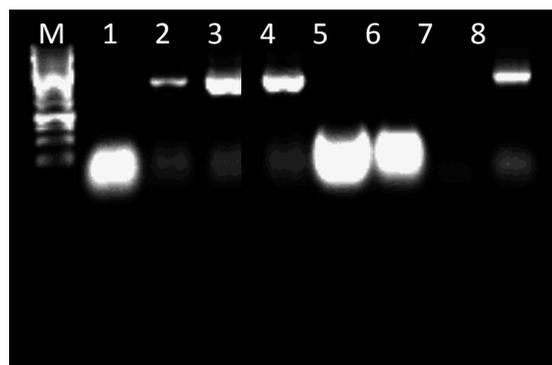


Figura 2.2. Detección de Eubacteria en individuos de *Metopolophium dirhodum* por PCR. M= marcador de peso molecular (GeneRuler™ 1 kb DNA ladder, Fermentas), 1= *Epinotia* sp, 2, 3 y 4= áfidos criados en laboratorio, 5= *Cydia pomonella*, 6= *Schizaphis graminum* control negativo, 7= agua, 8= *Escherichia coli* control positivo.

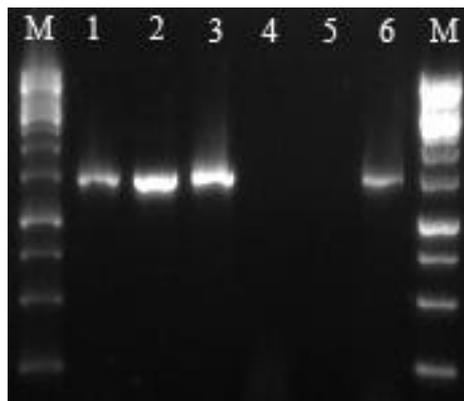


Figura 2.3. Detección de *Hamiltonella defensa* en individuos de *Metopolophium dirhodum* por PCR. M= marcador de peso molecular (GeneRuler™ 1 kb DNA ladder, Fermentas), 1 y 2= áfidos criados en laboratorio, 3= áfido colectado en el campo experimental, 4= *Schizaphis graminum* control negativo, 5= agua, 6= áfido criado en laboratorio a partir del cual se realizaron las secuenciaciones parciales del genoma bacteriano.

Se analizaron dos clones correspondientes a las amplificaciones realizadas con los cebadores de Eubacteria. Las secuencias de ambos clones fueron completamente idénticas. Una de ellas, correspondiente al clon HdMd2, fue depositada en GenBank bajo el número de acceso JQ293090. Este fragmento de 2254 pares de bases corresponde a la secuencia parcial del ADN ribosomal de la unidad 16S, el espaciador intergénico y la secuencia parcial del ADN ribosomal de la unidad 23S. Se comparó esta secuencia con aquellas publicadas empleando BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) y se detectó la mayor similitud con *Hamiltonella defensa* del áfido *Acyrtosiphon pisum* (99,8%, N° de acceso en GenBank CP001277). Al comparar con las secuencias disponibles de líneas de *Hamiltonella* en otros áfidos y con el psílido *Cacopsylla pyri*, todas de menor tamaño que la del clon HdMd2, la similitud fue superior al 99%. En contraste, la menor similitud corresponde a la secuencia de *H. defensa* en *Bemisia tabaci* (98,2%, N° de acceso en Genbank AY264676).

2.4. Discusión

Este trabajo constituye la primera aproximación al estudio de la microbiota asociada a *M. dirhodum*. La presencia de *H. defensa* en la población bajo estudio permite evaluar los efectos del ozono sobre esta simbiosis además de *B. aphidicola*. La asociación de *H. defensa* con insectos fue descrita inicialmente en *Bemisia tabaci* (Clark *et al.*, 1992; Darby *et al.*, 2001), luego en áfidos de los géneros *Acyrtosiphon*, *Amphorophora*, *Aphis*, *Chaitophorus*, *Cinara*, *Hyperomyzus*, *Macrosiphum*,

Microlophium, *Periphyllus*, *Sitobion*, *Uroleucon*, *Pemphigus* y *Geopemphigus* (Sandström *et al.*, 2001; Haynes *et al.*, 2003; Russell *et al.*, 2003; Degnan & Moran, 2008; Alkheldir, 2009) y en el psílido *Cacopsylla pyri* (Russell *et al.*, 2003). Por lo tanto, la identificación molecular de *H. defensa* en *M. dirhodum* extiende la gama de hospederos previamente conocida para este endosimbionte. Además, se verificó un alto grado de similitud entre las secuencias de *Hamiltonella* obtenidas (Telesnicki *et al.*, 2012) y aquellas previamente publicadas, provenientes de hospederos taxonómicamente diferentes. Este alto grado de similitud era esperado debido a que las secuencias corresponden a regiones conservadas.

Idealmente, la asociación con múltiples endosimbiontes podría ampliar el nicho ecológico del hospedador, dado que se incorporan nuevas capacidades metabólicas (Douglas, 1998b). En consecuencia, podríamos esperar que en un contexto de estrés ambiental dado por el cambio global, las poblaciones que estén asociadas a endosimbiontes secundarios tengan un mayor éxito. Sin embargo, la interacción entre los endosimbiontes puede ser antagonista o beneficiosa, lo que incorpora una fuente de heterogeneidad en la población de áfidos. Si la interacción es antagonista, la pérdida de *B. aphidicola* podría reducir el éxito reproductivo de un clon de áfidos dentro de la población. Este caso correspondería al extremo patogénico de la interacción endosimbionte-áfido. En el otro extremo, la interacción positiva entre los endosimbiontes, favorece la persistencia de *B. aphidicola* y del clon infectado en la población. Como se mencionó previamente, los endosimbiontes secundarios pueden rescatar a los primarios en condiciones de estrés térmico (Montllor *et al.*, 2002; Wernegreen, 2012), aunque la intensidad y duración del estrés impone un límite al aumento de la frecuencia la asociación con endosimbiontes secundarios en la población, en la medida que imponen costos en términos del fitness (Russell & Moran, 2006). Aunque el efecto del ozono sobre estas interacciones simbióticas aún no ha sido estudiado, la interacción entre el estrés por ozono y la temperatura podría modificar la gama de condiciones ambientales en las que los beneficios de la asociación con endosimbiontes secundarios compensan los costos para el hospedador.

EFECTO DIRECTO DEL OZONO SOBRE LOS ÁFIDOS

3.1. Introducción

Los áfidos y la contaminación con ozono tienen importancia económica como resultado de sus impactos negativos sobre los cultivos (revisado en el capítulo 1), sin embargo, las posibles consecuencias de la contaminación con ozono sobre la interacción áfido-planta están lejos de ser comprendidas. Se sabe que el efecto del ozono sobre de los áfidos puede ser positivo, negativo o neutro, dependiendo de la edad de la planta y las condiciones de exposición (Warrington, 1989; Jackson, 1995; Holopainen, 2002; Menéndez *et al.*, 2010). En la mayoría de estos trabajos la exposición a ozono se hizo de forma simultánea, lo que implica la generación de interacciones complejas de efectos, tal como se discutió en la introducción general. Jackson, 1995 llevó adelante un estudio alimentado a los áfidos con dieta artificial para evaluar los efectos directos del contaminante sobre su crecimiento individual, concluyendo que no eran significativos. Sin embargo, esta evaluación se restringió al impacto del ozono sobre el crecimiento individual y no se evaluaron parámetros a nivel poblacional. En consecuencia, por la escasez de información aún se desconoce en qué medida el contaminante puede afectar a los insectos, como estos efectos directos modulan su acción sobre las plantas, y menos aún cómo interactúan con los cambios ambientales y alimenticios mediados por la planta.

El movimiento y dispersión de los áfidos puede ser particularmente sensible a los efectos directos del ozono. Los áfidos son generalmente considerados como insectos sedentarios aunque una parte importante de su impacto como plaga se asocia a los desplazamientos: dentro de la planta, entre plantas de un mismo lote, entre lotes y a escala regional (Irwin *et al.*, 2007). Además, dado que las temperaturas altas favorecen la dispersión de los áfidos, una de las consecuencias esperadas del cambio global es que los áfidos abandonen las plantas más frecuentemente (Ma & Ma, 2012a,b), lo que podría incrementar el riesgo de propagación de enfermedades. La contaminación con ozono podría asimismo alterar los desplazamientos de los áfidos. El ozono atraviesa el canopy de los cultivos y puede alcanzar niveles considerables a pocos centímetros del suelo (Jaggi *et al.*, 2006). Es decir que los áfidos están expuestos al ozono de manera directa en todo el rango de escalas en los que se desplazan. Dado que el ozono puede reducir la movilidad de los insectos (Sousa *et al.*, 2012), la capacidad de dispersión de los áfidos no queda garantizada en condiciones de contaminación por ozono.

En consecuencia, parte de nuestra dificultad para pronosticar el impacto de la contaminación con ozono troposférico sobre las epidemias de áfidos podría reducirse con una mayor comprensión de los efectos directos del ozono sobre estos insectos. Por lo tanto, en este capítulo se exploran procesos que potencialmente podrían ser modificados por la exposición directa a la contaminación con ozono.

El efecto directo del ozono más frecuente en los animales es el daño oxidativo (Cross *et al.*, 2002; Holmstrup *et al.*, 2011). Como se mencionó en el capítulo 1, el daño oxidativo es consecuencia de la acumulación excesiva de especies reactivas de oxígeno

(ROS) y puede comprometer el funcionamiento de las células o llevar a la muerte celular (Dowling & Simmons, 2009). Las plantas se defienden de los áfidos mediante el incremento de la concentración de ROS, que provoca daño oxidativo directo a los áfidos (Smith & Boyko, 2007), y por su parte los áfidos detoxifican las defensas vegetales mediante sustancias antioxidantes (Lukasik, 2007). Una evidencia complementaria a lo anterior, es que los áfidos se benefician de alimentarse de plantas con mayor contenido de antioxidantes (Kerchev *et al.*, 2012). En otros insectos (moscas y escarabajos) se registraron efectos directos negativos del ozono en términos de estrés oxidativo y mortalidad (Cross *et al.*, 2002; Holmstrup *et al.*, 2011). La primera hipótesis que se pondrá a prueba en este capítulo es que los episodios de estrés agudo por ozono provocan daño oxidativo en los áfidos. Si la hipótesis es verdadera, se espera: i) que exista una relación inversa entre los niveles de antioxidantes en áfidos y las dosis de ozono ambiental; ii) que el nivel de daño oxidativo aumente con las dosis de ozono ambiental. A partir del rol de los antioxidantes de los áfidos en la interacción con las defensas de las plantas, la segunda hipótesis que se pondrá a prueba es que el éxito en la colonización de nuevas plantas depende del potencial antioxidante de los insectos. Si esta hipótesis es cierta, se espera que los áfidos expuestos a ozono tengan un menor potencial antioxidante total y un menor éxito en la colonización de plantas nuevas. Como se mencionó previamente, la exposición de otros insectos a ozono redujo su movilidad (Sousa *et al.*, 2012). Por lo tanto, la tercera hipótesis que se pondrá a prueba es que la exposición a ozono reduce la movilidad de los áfidos.

A nivel poblacional, la exposición simultánea de áfidos y plantas a ozono redujo la tasa de crecimiento de las poblaciones de áfidos respecto al control (Awmack *et al.*, 2004; Menéndez *et al.*, 2010). El fracaso de la maduración de los embriones en condiciones de estrés por ozono es comparable al efecto de la aplicación de antibióticos para eliminar la simbiosis de los áfidos con *Buchnera aphidicola*, lo que lleva a la hipótesis de que esta simbiosis podría ser afectada por el ozono. Como se destacó en la introducción, esta asociación es tan estrecha que no se conoce *B. aphidicola* de vida libre ni puede cultivarse en el laboratorio, y la eliminación de la bacteria en ninfas lentifica el desarrollo, reduce el tamaño corporal a la adultez, y no dejan descendencia o tienen baja fecundidad y una descendencia con malformaciones que muere durante el desarrollo sin llegar a la adultez (van Emden & Harrington, 2007). Sumado a *B. aphidicola*, *M. dirhodum* cuenta con *H. defensa* como endosimbionte secundario (Capítulo 2). La cuarta hipótesis que se pondrá a prueba en este capítulo es que el daño oxidativo provocado por el ozono puede disrumpir la simbiosis con *B. aphidicola* y *H. defensa*. Se predice que a partir de cierta dosis umbral de ozono, los áfidos perderán la asociación con estas bacterias. Si se considera que la frecuencia de infección con endosimbiontes secundarios son variables entre poblaciones de una mismas especie (Tsuchida *et al.*, 2002), se espera que la estabilidad de la simbiosis con *B. aphidicola* sea mayor a la de *H. defensa*.

3.2. Materiales y Métodos

3.3.1. *Procedimientos Experimentales*

Todos los experimentos se llevaron a cabo en el campo experimental de IFEVA, Facultad de Agronomía, Universidad de Buenos Aires (34° 35'S, 58° 29'O). Se realizó un ensayo piloto para explorar las condiciones experimentales apropiadas para evaluar la hipótesis de efecto directos del ozono sobre los áfidos y posteriormente se realizaron dos experimentos para evaluar el efecto directo del ozono sobre los áfidos. En todos los casos los áfidos fueron alimentados con dietas artificiales durante la exposición a ozono para aislar los efectos directos del ozono de los indirectos (mediados por las plantas).

3.3.2. *Cría de Áfidos*

En el experimento piloto de 2010 se emplearon individuos de la especie *Schizaphis graminum* criados en plantas de trigo var. Gaucho (Produce). A partir del hallazgo de la asociación de *Metopolophium dirhodum* con la bacteria endosimbionte secundaria *Hamiltonella defensa* (Capítulo 2), los experimentos posteriores se realizaron con esta especie de áfidos. La cría de *M. dirhodum* se llevó a cabo en plantas de trigo var. Cronox (Don Mario), una variedad de características similares al trigo var. Gaucho que mantuvo su disponibilidad en el mercado. En ambos casos, los individuos que se emplearon para iniciar la cría fueron colectados en una población espontánea sobre *Lolium multiflorum* y otras Gramíneas en el campo experimental de IFEVA, Facultad de Agronomía, Universidad de Buenos Aires (34° 35'S, 58° 29'O). La cría se realizó en condiciones controladas de temperatura ($22\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$) y fotoperiodo (12 Luz: 12 Oscuridad).

3.3.3. *Exposición a Ozono*

La exposición a ozono se realizó en cámaras de techo abierto (“open top”) de 8m^3 con paredes de PVC transparente y refrigeración por aire acondicionado. En este sistema, el ozono se produce con un generador por descarga y se distribuye entre las cámaras. El flujo de ozono hacia cada una de las cámaras se regula con una llave paso y además cada cámara recibe un flujo constante de aire filtrado con carbón activado. De esta manera se generan condiciones de exposición a ozono contrastantes en cada cámara, que son registradas por un monitor de ozono API-Teledyne modelo 450 (Teledyne Advanced Pollution Instrumentation San Diego, CA) que detecta las moléculas de ozono basándose en la absorción a 254 nm. Durante los experimentos se monitoreó la concentración de ozono dentro de las cámaras y en el campo experimental (Cuadro 3.1.).

Cuadro 3.1. Concentraciones de ozono empleadas en los tratamientos de exposición directa de áfidos a ozono (Media \pm error estándar)

Experimento	Ozono (ppb)			
	Control	Medio	Alto	Ambiente
Piloto	1,8 \pm 1,2	---	123,0 \pm 5,4	0,0 \pm 0,0
1° Experimento efectos directos	0,1 \pm 0,1	45,3 \pm 1,9	166,6 \pm 1,3	0,0 \pm 0,0
2° Experimento efectos directos	0,3 \pm 0,1	50,3 \pm 0,4	135,3 \pm 9,7	1,7 \pm 1,3

3.3.4. Dieta Artificial y Dispositivos de Alimentación

Para evaluar los efectos directos del ozono sobre los áfidos es necesario exponerlos aislados de la planta. Dado que los áfidos se alimentan de manera continua, se emplearon dietas artificiales para mantener a los áfidos durante las exposiciones a ozono. La dieta artificial consiste de una solución acuosa de sacarosa y 20 aminoácidos (Cuadro 3.2.). Se empleó esta formulación sin vitaminas ni minerales para evitar interacciones entre el ozono y la dieta que pudieran confundir los efectos del ozono sobre los parámetros de estrés oxidativo del insecto. De todas maneras, esta dieta es suficiente para permitir la reproducción de los insectos (Kim & Jander, 2007).

Cuadro 3.2. Composición de la dieta artificial empleada para alimentar a los áfidos en los experimentos de exposición directa a ozono

	[mM]		[mM]
Aminoácidos			
Alanina	10	Leucina	6
Arginina	16	Lisina	10
Asparagina	20	Metionina	5
Ácido Aspártico	10	Fenilalanina	3
Cisteína	3.3	Prolina	7
Ácido Glutámico	10	Serina	10
Glutamina	10	Treonina	11,8
Glicina	10	Triptofano	4
Histidina	10	Tirosina	2
Isoleucina	6	Valina	7
Sacarosa	440		

La dieta artificial se colocó entre dos láminas de Parafilm® extendidas sobre una placa de petri de 55 mm de diámetro o sobre la boca de un tubo de centrífuga de 50 ml. Los insectos fueron colocados sobre la última lámina de film. Este dispositivo se rodea con una malla plástica y se recubre con tela voile para confinar a los áfidos dentro del dispositivo o jaula (Figura 3.1.). La permeabilidad de estos dispositivos al ozono se verificó de forma semi-cuantitativa con tiras de papel sensible al ozono (MN OZONE test strips, Macherey-Nagel).



Figura 3.1. Dispositivos empleados para exponer los áfidos a ozono sobre dieta artificial. La imagen de la izquierda muestra la placa de petri con el sachet de dieta artificial formado por las dos láminas de Parafilm. La imagen del centro muestra el dispositivo armado con la malla plástica y la cubierta de voile sobre la placa de petri y la imagen de la derecha muestra el sachet montado sobre la boca de un tubo de centrífuga y la cubierta de voile.

3.3.5. Determinación de Parámetros de Daño Oxidativo

Los agentes oxidantes provocan la peroxidación de los lípidos de membrana. Dado que estos peróxidos son inestables, reaccionan dando por resultado malondialdehído. La formación de este producto final en una muestra puede cuantificarse haciéndolo reaccionar con ácido tiobarbitúrico (TBA), lo que da nombre a la técnica de TBARS ó especies reactivas al ácido tiobarbitúrico (Yagi, 1976). El producto de esta reacción es el complejo MDA-TBA que tiene un pico de absorción específico en 532 nm. La peroxidación de lípidos de los áfidos se evaluó de acuerdo con el protocolo empleado por Łukasik y col. (2009). El medio de reacción consiste en una mezcla de homogeneizado de la muestra (1 g/ 9 ml de buffer fosfato 30 mM, KCl 120 mM, pH= 7,4), butilhidroxitolueno (BHT) 4 % (P/V) en etanol, ácido tricloroacético 20 % (P/V), y ácido tiobarbitúrico 0,7 % (P/V). La mezcla se incubó durante 1 hora a 100 °C. Se lee la absorbancia a 532 nm ($\epsilon = 1,56 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$).

Una medida complementaria a la anterior es la estimación del potencial antioxidante total en la muestra. Este potencial se estima haciéndolo reaccionar con un sustrato oxidado cuya forma reducida pueda ser cuantificada y comparándola con la capacidad de un antioxidante conocido (TROLOX, ácido úrico) para reducir el mismo

sustrato. Los resultados se expresan como unidades equivalentes del antioxidante de referencia. En nuestros ensayos se emplearon dos técnicas: el potencial antioxidante reactivo total (TRAP), donde el producto de la reacción se mide con un luminómetro (Lissi *et al.*, 1995) y kits comerciales de potencial antioxidante total (Randox, Antrim, Reino Unido).

3.3.6. Experimento Piloto 2010

Se aplicó un diseño factorial completo de dos factores con dos niveles cada uno: ozono (0, 120 ppb) y tiempo (inicial, 6 hs de exposición). El día previo al experimento se armaron 36 jaulas con dietas artificiales y se colocaron 25 áfidos en cada una de ellas. Al día siguiente se verificó el estado de los insectos y se asignaron al azar a cada uno de los cuatro tratamientos. Cada réplica consistió en 4 jaulas (100 áfidos), los tratamientos de exposición se aplicaron sobre las cámaras y cada uno se replicó dos veces, salvo el de 6 hs de exposición a 123 ppb de ozono que tuvo 3 réplicas. Una vez finalizada la exposición se congelaron los áfidos en nitrógeno líquido y se conservaron a -80°C . Las muestras fueron usadas para determinar la concentración de especies reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS, estimador de la peroxidación de lípidos) la concentración de antioxidantes totales en las muestras (ver más adelante). Se evaluó el efecto del ozono sobre la producción de TBARS y la concentración de antioxidantes mediante ANOVA de un factor y el método de Tukey para comparaciones a posteriori. El cumplimiento de los supuestos de normalidad y homogeneidad de varianzas se logró transformando la variable concentración de TBARS con raíz cuadrada y la concentración de antioxidantes se transformó con logaritmo decimal.

3.3.7. Experimentos 2011

La puesta a prueba de las hipótesis de este capítulo requirió de dos experimentos. En el primer experimento se evaluó la primera y la tercera hipótesis y en el segundo se evaluaron las hipótesis restantes. En ambos casos se aplicaron tres dosis contrastantes de ozono durante las primeras seis horas de luz del día. Cada dosis de ozono se aplicó a dos cámaras independientes y se incorporó a las cámaras dentro del análisis estadístico como fuente de variación aleatoria. En el primer experimento, se colocaron ocho jaulas con 25 áfidos en cada una de las cámaras que posteriormente fueron agrupadas en dos submuestras (pseudoréplicas) a partir de las cuales se obtuvieron dos determinaciones de TBARS y TRAP por cámara. La ventaja de emplear cuatro jaulas con 25 áfidos en lugar de una con 100 individuos es que se reduce el riesgo de perder toda la muestra ante una falla de la dieta artificial. El éxito de las dietas artificiales para retener a los insectos es variable dado que la composición de la dieta es un sustituto limitado para el contenido del floema, lo que podría favorecer que los individuos continúen a la búsqueda de una fuente de alimento alternativa (Honek *et al.*, 1998; Lombaert *et al.*, 2006; Sadeghi *et al.*, 2009). A partir de este antecedente, la proporción de áfidos

dispersados se empleó como un estimador de la movilidad de los insectos para evaluar la tercera hipótesis. Los áfidos fueron recontados al cabo de la exposición en 4 jaulas al azar en cada cámara, a partir de los individuos faltantes se calculó la proporción de áfidos dispersados y se incorporó la mortalidad asociada al tratamiento como variable ad hoc. Los insectos vivos de las jaulas se agruparon para obtener dos muestras por jaula y fueron congelados inmediatamente con nitrógeno líquido y mantenidos a -70°C para evaluar los parámetros de estrés oxidativo.

El objetivo del segundo experimento fue evaluar el efecto de la exposición a ozono sobre la capacidad de los áfidos para establecer nuevas poblaciones y evaluar efectos del ozono sobre la persistencia de la simbiosis con *B. aphidicola* y *H. defensa*. Para alcanzar el primer objetivo, se transfirieron 10 áfidos por planta una vez finalizada la exposición a ozono (3 plantas por tratamiento) y se realizaron recuentos 1, 5 y 25 días posteriores. Para las PCR diagnósticas de endosimbiontes, se tomaron muestras de insectos en tres instancias: inmediatamente después de la exposición (0 hs post exposición) y el día siguiente (24 hs post exposición) se tomaron muestras de áfidos expuestos a ozono y a partir de áfidos de la progenie de los áfidos expuestos se evaluó el efecto del ozono en la F1. Todas las muestras se conservaron a -70°C hasta el momento de la extracción de ADN.

3.3.8. Detección de Bacterias Endosimbiontes por PCR

Las extracciones de ADN total se realizaron a partir de áfidos individuales siguiendo un protocolo modificado a partir de Doyle & Doyle (1987). El rendimiento y calidad de la extracción se determinó con un espectrofotómetro NanoDrop 1000 (NanoDrop Technologies, Wilmington DE, EEUU). Los cebadores empleados para la detección de *B. aphidicola* fueron AAGCTTGCTTTCTTGTCGGCGA/CTTCTGCGGGTAACGTCA CAAA, cuyo producto es un fragmento de 423 bp del gen rrs de la subunidad 16s del ribosoma. Los cebadores empleados en la detección de *H. defensa* fueron los cebadores PABSF, específico para esta bacteria, y el primer 16SB1, de amplio uso para el diagnóstico de endosimbiontes secundarios (Darby *et al.*, 2001; Douglas *et al.*, 2006). Las reacciones de PCR se realizaron en un termociclador Eppendorf Mastercycler® (Eppendorf AG, Hamburgo, Alemania) bajo las siguientes condiciones: 30 ciclos de 1 minuto a 94°C , 1 minuto a 55°C y 2 minutos a 72°C para *B. aphidicola* y 40 ciclos de 30 segundos a 95°C , 30 segundos a 55°C y 30 segundos a 72°C para *H. defensa*. Los productos de estas amplificaciones se separaron en geles de agarosa al 1% teñidos con Bromuro de Etidio. En las PCR de *B. aphidicola* se empleó ADN extraído de *Epinotia* sp. (Lepidoptera: Tortricidae), dado que esta bacteria se asocia exclusivamente con áfidos. En el caso de las PCR de *H. defensa*, se empleó ADN extraído de *Schizaphis graminum* (Hemiptera: Aphididae), que carece de endosimbiontes secundarios (Sandström *et al.*, 2001).

3.3.9. *Análisis Estadístico*

El primer experimento se analizó con un diseño anidado de dos factores. La exposición a ozono se incorporó como un factor fijo con tres niveles y las cámaras de ozono como un factor aleatorio con seis niveles. El segundo experimento se analizó con un diseño anidado de tres factores: exposición a ozono (factor fijo, tres niveles), cámaras de ozono (factor aleatorio, seis niveles) y tiempo pasada la exposición como factor fijo de con tres niveles (0, 1, 30 días). Se evaluó la normalidad de los residuos de todas las variables con el test de Shapiro-Wilks y Q-Q plot, y la homogeneidad de varianzas se evaluó con el test de Levene. El efecto de las cámaras de ozono no fue significativo por lo que se quitó este factor del modelo. Las medias de los factores que resultaron significativos en el ANOVA se compararon con el test de Tukey. Todos los análisis estadísticos se realizaron en InfoStat (Infostat, 2008).

3.3.Resultados

3.3.1. *Experimento Piloto 2010*

El tratamiento con ozono provocó un incremento de la peroxidación de lípidos (TBARS) en los insectos, sin embargo no fue el único tratamiento donde se registró un incremento dado que el nivel de TBARS en los áfidos expuestos a aire filtrado fue superior que en las condiciones iniciales ($F_{\text{ozono} \times \text{tiempo}, 1,5} = 12,57, p=0,016$, Figura 3.2). A pesar de que la concentración de TBARS fue máxima en el tratamiento de ozono y significativamente mayor que en las cámaras con aire filtrado, el nivel de daño en este tratamiento fue estadísticamente superior al de las condiciones iniciales. Por otro lado, no se registraron diferencias significativas en el nivel de antioxidantes de los insectos al comparar el tratamiento con ozono con las condiciones iniciales ($F_{1,4}=2,10, p=0,221$, Figura 3.2). El efecto del ozono sobre la concentración de antioxidantes no pudo analizarse en el tratamiento de aire filtrado debido a que algunas determinaciones resultaron ineficaces, lo que llevó a la pérdida de replicación en dicho tratamiento. A partir de estos resultados se revisaron las condiciones ambientales del día de la exposición, se consideró a la radiación solar como un posible factor de estrés adicional y los experimentos posteriores se realizaron durante las primeras 6 horas de luz del día.

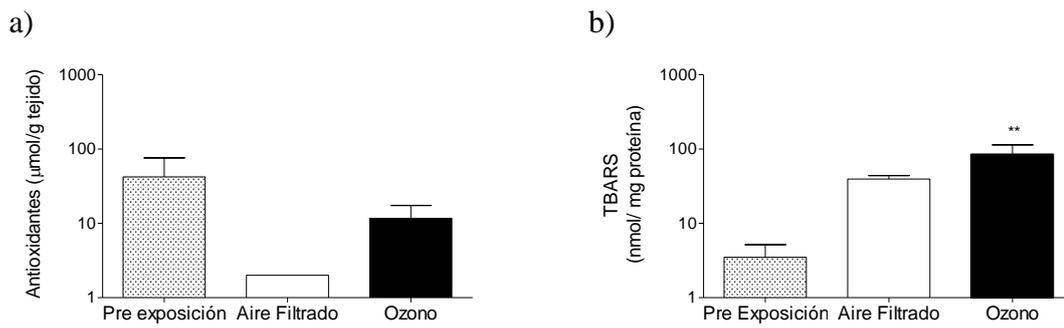


Figura 3.2. Parámetros de estrés oxidativos en áfidos previamente a la exposición y al cabo de la exposición a ozono. a) Concentración de antioxidantes. b) Peroxidación de lípidos (TBARS)

3.3.2. Experimento 2011

La exposición directa al ozono afectó la movilidad de los insectos. La proporción de áfidos que escaparon de las dietas artificiales fue mayor en el control ($F_{2, 25} = 4,15$, $p=0,0278$; DMS Tukey $_{25 \text{ gl}, \alpha:0,05} = 0,069$, Figura 3.3), mientras que ambos tratamientos con ozono redujeron la movilidad de los insectos.

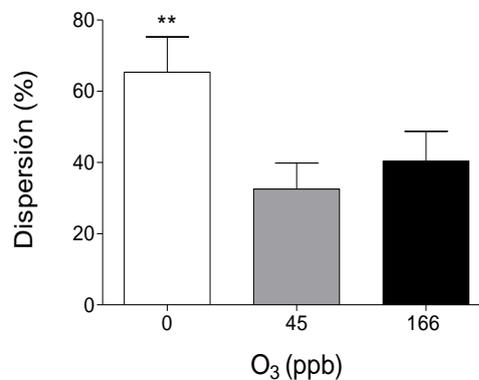


Figura 3.3. Efecto directo del ozono sobre la movilidad de los áfidos

El ozono también aumentó la mortalidad de los áfidos en ambas dosis de ozono comparadas con el control ($F_{2, 25} = 10,01$, $p=0,0006$; DMS Tukey $_{25 \text{ gl}, \alpha:0,05} = 0,111$, DMS Tukey $_{25 \text{ gl}, \alpha:0,1} = 0,097$, Figura 3.4). Sin embargo, las poblaciones establecidas a partir de los sobrevivientes de cada tratamiento crecieron de forma similar (Día 1 $F_{2, 7} = 1,23$, $p=0,3492$; Día 5 $F_{2, 7} = 0,51$, $p=0,6202$; Día 30 $F_{2, 7} = 0,79$, $p=0,4888$, Figura 3.5). La proporción de individuos alados en el recuento final tampoco difirió entre tratamientos ($F_{2, 7} = 0,04$, $p=0,9592$, Cuadro 3.3).

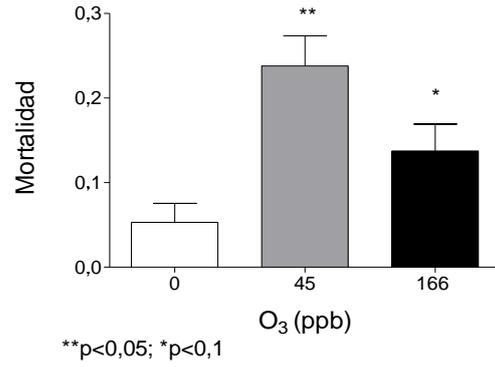


Figura 3.4. Efectos directos del ozono sobre la mortalidad de los áfidos

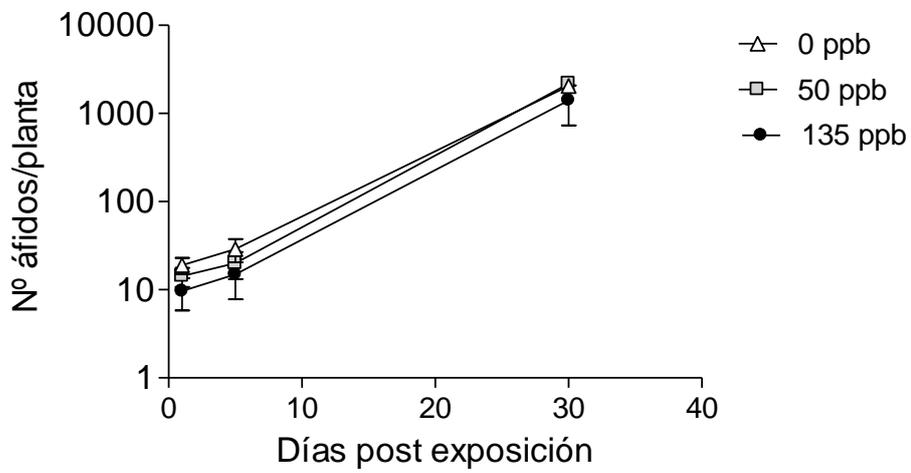


Figura 3.5. Crecimiento de las poblaciones de áfidos establecidas a partir de individuos expuestos a ozono (Media±Desvío Estándar)

Cuadro 3.3. Proporción de áfidos alados en cada población al finalizar el experimento (Media \pm Desvío Estándar)

Ozono (ppb)	Áfidos alados
0	0,23 \pm 0,008
50	0,23 \pm 0,015
135	0,20 \pm 0,012

La peroxidación de lípidos (TBARS) fue mayor en el tratamiento de 166 ppb que en el tratamiento de 45 ppb, aunque no fue diferente del control ($F_{2,8} = 9,58$, $p = 0,0075$, DMS Tukey $_{8 \text{ gl}, \alpha:0,05} = 1,7337$, Figura 3.6.a)). Además, el nivel de antioxidantes fue marginalmente mayor en el control que en el tratamiento de 45 ppb aunque no fue diferente del tratamiento de 166 ppb ($F_{2,8} = 4,10$, $p = 0,0595$, DMS Tukey $_{8 \text{ gl}, \alpha:0,1} = 31,61$, Figura 3.6.b)). La simbiosis de los áfidos con *B. aphidicola* y *H. defensa* fue persistente en todos los tratamientos. La detección de estas bacterias por PCR fue positiva en ambos casos (Figura 3.7).

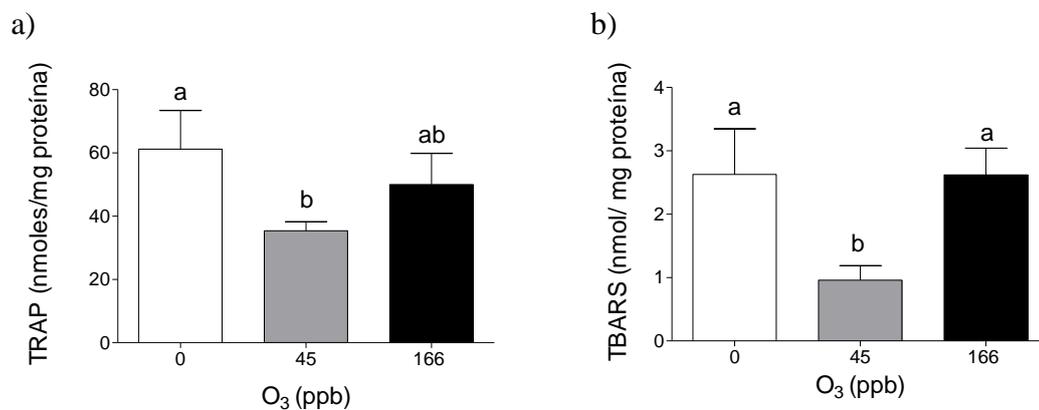
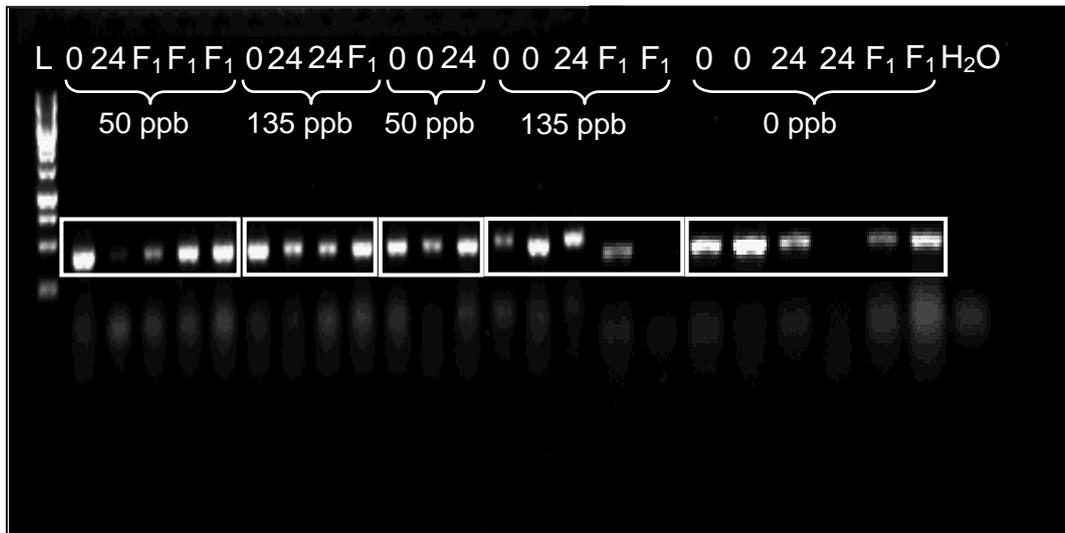


Figura 3.6. Parámetros de estrés oxidativo en áfidos expuestos a ozono. a) Potencial Antioxidante Reactivo Total (TRAP), b) Peroxidación de lípidos (TBARS)

a)



b)

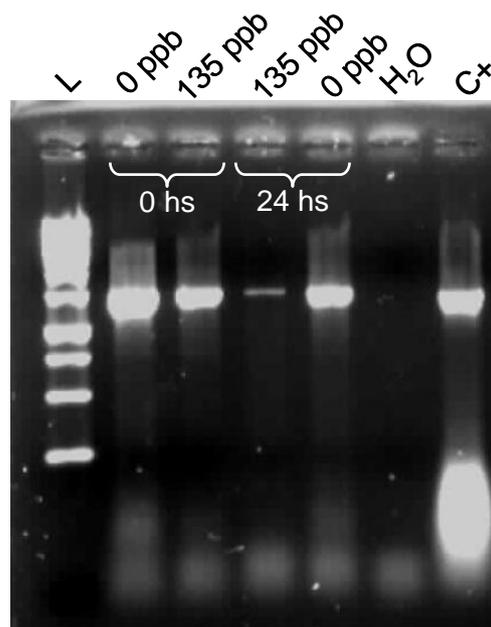


Figura 3.7. Detección de a) *Buchnera aphidicola* y b) *Hamiltonella defensa* por PCR, en áfidos expuestos a ozono y en su progenie. 0 y 24 hs corresponden al tiempo pasado luego de la exposición a ozono y F1 corresponde a la progenie. 0, 50 y 135 ppb corresponde a la dosis de ozono empleada. L es el marcador de peso molecular y C+ corresponde al control positivo.

3.4. Discusión

La concentración de antioxidantes en los insectos fue marginalmente modificada por la exposición a ozono y el nivel de daño oxidativo mostró un patrón irregular (Figura 3.6.). Comparados con los resultados del experimento piloto, los niveles de peroxidación de lípidos registrados en todos los tratamientos corresponden al rango registrado en la condición previa a la exposición, sugiriendo que la interacción del ozono con las condiciones ambientales presentes en el experimento piloto fue importante para producir las diferencias que se observaron en dicha situación. Los resultados actuales rechazan parcialmente la hipótesis de que los episodios de estrés agudo por ozono reduzcan el nivel interno de antioxidantes en los áfidos, porque el contenido de antioxidantes sólo se redujo en el tratamiento de 50 ppb de ozono. Sin embargo, la consideración conjunta de este resultado con las diferencias en la peroxidación de lípidos podría estar reflejando cierta dinámica en la acumulación de daño y antioxidantes. En términos generales, el nivel de peroxidación de lípidos detectado en estos experimentos (incluyendo los controles) fue mayor a lo reportado para áfidos en la bibliografía, donde valores de TBARS raramente alcanzan a 1 nmol/mg de proteína (Łukasik *et al.*, 2009, 2012). Estas diferencias podrían deberse a que las condiciones experimentales empleadas. Mientras que los trabajos de Łukasik y col. (2009, 2012) se realizaron en cámaras de cría bajo condiciones reguladas y probablemente de baja irradiancia, los experimentos presentados en este capítulo se realizaron en condiciones de campo, más irregulares y con variación en la radición diaria.

La información presentada en este capítulo invita a reconsiderar el impacto de los efectos directos del ozono sobre los áfidos a la hora de evaluar las consecuencias de este componente del cambio global sobre las interacciones planta-áfido. Los áfidos están aislados de la planta en numerosas situaciones durante su ciclo de vida (Dill *et al.*, 1990; van Emden & Harrington, 2007). Esto remarca la importancia de conocer las consecuencias de la exposición directa de los áfidos al ozono. Como surge de los datos de esta tesis, el ozono tiene efectos sobre los insectos a nivel individual y a nivel poblacional. Jackson (1995) evaluó el efecto del ozono sobre la tasa de crecimiento relativa individual de los áfidos empleando una dosis de ozono de 100 ppb, comparable a las empleadas en los experimentos de esta tesis. Dado que no encontró diferencias entre tratamientos, y al reducido tamaño de sus muestras no evaluó los efectos del ozono a nivel poblacional, como por ejemplo, cambios en la tasa de nacimientos. Si bien el crecimiento individual puede ilustrar sobre cambios fisiológicos, no es una variable adecuada para hacer inferencias sobre el crecimiento de las poblaciones de áfidos en condiciones de contaminación gaseosa (Holopainen & Kossi, 1998; Awmack *et al.*, 2004; Mondor *et al.*, 2010). Es conocido que la tasa de crecimiento relativa individual no permite estimar a los posibles efectos de los contaminantes en el “trade-off” entre tejidos somáticos y reproductivos (Mondor *et al.*, 2010) que pueden resultar

de los efectos fisiológicos de los contaminantes. En esta tesis se demostró que el ozono puede afectar la movilidad y la mortalidad de los áfidos (Figuras 3.3 y 3.4).

La dispersión de los áfidos, alados y ápteros, dentro de una misma planta y entre plantas de un mismo campo ocurre frecuentemente caminando (van Emden & Harrington, 2007). Estos desplazamientos ocurren normalmente cuando la calidad de la planta de la que se alimentan disminuye, por lo que dispersarse puede proveer una ventaja adaptativa cuando la calidad del recurso no es óptima (Honek *et al.*, 1998; Lombaert *et al.*, 2006). El empleo de dietas artificiales favorece el desarrollo de este comportamiento. El ozono redujo la dispersión de los áfidos (Figura 3.3). Además de las implicancias de este resultado en la dispersión de los áfidos en los cultivos, este resultado sugiere que el ozono podría tener implicancias en las relaciones tróficas. Dado que los áfidos incrementan sus desplazamientos en presencia de enemigos naturales (Dill *et al.*, 1990), surge la pregunta sobre el potencial incremento de la tasa de parasitoidismo en los ambientes contaminados por ozono.

La exposición a ozono incrementó la mortalidad de los áfidos aunque el efecto del tratamiento a 45 ppb fue mayor que del tratamiento a 166 ppb (Figura 3.4). Esta diferencia podría asociarse a que la dispersión de los áfidos en el tratamiento de 166 ppb fue ligeramente mayor a la del tratamiento de 45 ppb aunque esta diferencia no fue significativa estadísticamente. A diferencia otros trabajos (Holmstrup *et al.*, 2011; Sousa *et al.*, 2012) que evaluaron la toxicidad del ozono sobre los insectos, las dosis de ozono empleadas en estos experimentos fueron mucho menores (la dosis máxima en estos experimentos fue de 166 ppb mientras que en los trabajos de Holmstrup *et al.* y Sousa *et al.* se emplearon 50 ppm). La detección de efectos letales con dosis comparables a las registradas durante los picos de contaminación reales destaca la relevancia que pueden tener estos efectos en condiciones naturales.

A pesar de estas diferencias en la dispersión y mortalidad de los áfidos, el crecimiento posterior de las poblaciones de áfidos y la proporción de individuos alados no fueron afectados por la exposición previa a ozono (Figura 3.5). A partir de estos resultados, la hipótesis de que el éxito en la colonización de nuevas plantas dependa del potencial antioxidante de los insectos fue rechazada. Los niveles de antioxidantes se mantuvieron estables entre tratamientos y las poblaciones de áfidos crecieron de forma similar (Figura 3.5). De todos modos, cabe destacar que el procedimiento experimental pudo haber favorecido este resultado porque los áfidos fueron transferidos manualmente a las plantas destino para que todas las poblaciones se iniciaran con un mismo número de fundadores.

Las dos bacterias endosimbiontes caracterizadas en la población persistieron en todas las condiciones de ozono, rechazando la tercera hipótesis del capítulo. La persistencia de *B. aphidicola* en todos los tratamientos es congruente con el crecimiento poblacional similar de todas las poblaciones, dado que si los áfidos perdieran a *B. aphidicola* se esperaría una menor tasa de crecimiento poblacional. No sabemos si *H. defensa* tuvo algún rol protector respecto a *B. aphidicola*, porque nuestro diseño experimental no contemplaba la manipulación de este endosimbionte. Sin embargo,

considerando que los niveles de estrés oxidativo fueron bajos comparados con el experimento piloto, la posibilidad de que no se haya alcanzado un nivel de estrés oxidativo suficiente para poner en riesgo la persistencia de estas asociaciones persiste.

La reducción de la dispersión, sumada al incremento de la mortalidad por la exposición directa a ozono, podría conducir a una menor propagación de enfermedades en cultivos. A partir de los resultados del presente capítulo, estos efectos podrían asociarse parcialmente a la acumulación de daño oxidativo y se descarta la influencia de los endosimbiontes.

EFECTOS INDIRECTOS DEL OZONO SOBRE LOS ÁFIDOS

4.1. Introducción

Una parte importante de los mecanismos de tolerancia al estrés abiótico en las plantas depende de su capacidad para incrementar la concentración de antioxidantes en sus tejidos para controlar la propagación del daño provocado por la acumulación de especies reactivas de oxígeno generadas por el estrés (Sharma & Davis, 1997; Kangasjärvi *et al.*, 2005). Los sistemas antioxidantes de las plantas incluyen enzimas, tales como superóxido dismutasa, ascorbato peroxidasa, glutatión peroxidasa y catalasa, así como también antioxidantes de bajo peso molecular como ascorbato, glutatión, α -tocoferol, carotenoides, flavonoides y prolina (Gill & Tuteja, 2010). Un complejo balance entre oxidantes y antioxidantes permite que los ROS puedan cumplir sus funciones biológicas de señalización al mismo tiempo que la planta pueda evitar los efectos potencialmente tóxicos de estas moléculas.

La modificación del balance entre oxidantes y antioxidantes no solo actúa modificando las respuestas de las plantas al ambiente abiótico sino que además puede influir en las consecuencias de la acción de los agentes de estrés biótico, como los generados por bacterias, hongos y artrópodos, incluyendo a los áfidos. Es decir que puede haber situaciones conflictivas en las que el estrés abiótico promueva un incremento en los antioxidantes para contrarrestar los ROS, mientras que el desafío de patógenos o insectos requiera una disminución de los antioxidantes para lograr el incremento local de ROS que frene su expansión (Rouhier & Jacquot, 2008). En particular, el estrés oxidativo provocado por el ozono incrementa el nivel de ciertos antioxidantes, que también son importantes para los áfidos. Algunas de las evidencias al respecto provienen del estudio del aumento en la producción de ascorbato en plantas expuestas a ozono (Fangmeier *et al.*, 1994; Kollist *et al.*, 2000), así como también de la mayor sensibilidad al ozono que presentan los mutantes *vtc1* de *Arabidopsis thaliana* que carecen de la enzima GDP-manosa pirofosforilasa, involucrada en la síntesis de ascorbato (Kangasjärvi *et al.*, 2005). La exposición a ozono también puede incrementar el contenido de glutatión (Foyer & Noctor, 2005). Aunque el ascorbato es un antioxidante que tiene múltiples funciones en la regulación del metabolismo de los insectos en general, su efecto sobre los compuestos pro-oxidantes presentes en las plantas de las que se alimentan los insectos ha recibido el mayor interés (Goggin *et al.*, 2010). En la interacción planta-áfido, los antioxidantes podrían disminuir el daño en los áfidos, provocado por las defensas vegetales (Łukasik & Goławska, 2013). Por ejemplo, el incremento del nivel de vitamina C en plantas de papa aumentó la fecundidad de los áfidos (Kerchev *et al.*, 2012). En consecuencia, podría especularse que las plantas que poseen altos niveles de antioxidantes inducidos por ozono resulten más favorables a los áfidos.

En el presente capítulo se evalúa como hipótesis que el ozono tiene un efecto indirecto sobre el crecimiento de las poblaciones de áfidos, mediado por la ingesta de antioxidantes de origen vegetal. La primera predicción asociada a esta hipótesis es que la exposición a ozono incrementa el potencial antioxidante de las plantas de trigo. La segunda predicción es que el aumento en la concentración de antioxidantes en las plantas incrementa el éxito con el que los áfidos las colonizan y su tasa de crecimiento poblacional. La tercera predicción es que los áfidos que se alimentan de plantas previamente expuestas a ozono sufren menor daño oxidativo.

4.2. Materiales y Métodos

4.2.1. Procedimientos Experimentales

Todos los experimentos se llevaron a cabo en el campo experimental de IFEVA, Facultad de Agronomía, Universidad de Buenos Aires (34° 35'S, 58° 29'O). Se realizó un ensayo piloto para explorar las condiciones experimentales que permitieran incrementar el potencial antioxidante de las plantas mediante la exposición a ozono y posteriormente evaluar la hipótesis de efecto indirecto del ozono sobre los áfidos.

4.2.2. Cría de Áfidos

En los experimentos de este capítulo se emplearon áfidos de la especie *Metopolophium dirhodum* criados en plantas de trigo var. Cronox (Don Mario), en las mismas condiciones detalladas en el capítulo 3 de esta tesis.

4.2.3. Exposición a Ozono

La exposición a ozono se realizó en las mismas cámaras mencionadas en el capítulo 3 de esta tesis. Durante los experimentos se monitoreó la concentración de ozono dentro de las cámaras y en el campo experimental (Cuadro 4.1.).

Cuadro 4.1. Concentraciones de ozono empleadas en los tratamientos de exposición directa de áfidos a ozono (Media \pm error estándar)

Experimento	Ozono (ppb)		
	Control	Ozono	Ambiente
1° Experimento	0,2 \pm 0,2	211 \pm 23	4,1 \pm 1,7
2° Experimento	3,3 \pm 0,7	148 \pm 12	--
3° Experimento	No detectable	127 \pm 16	--

4.2.4. Determinación de Parámetros de Daño Oxidativo

La determinación bioquímica de la peroxidación de lípidos y del potencial antioxidante reactivo total se realizó de la misma manera que se mencionó en el capítulo 3 de esta tesis.

4.2.5. Experimento Inducción de Antioxidantes en Plantas de Trigo

El objetivo de este experimento es caracterizar la dinámica temporal del daño y antioxidantes en plantas de trigo para identificar el momento adecuado para evaluar los efectos indirectos del ozono sobre los áfidos. En este experimento se emplearon dos dosis contrastantes de ozono que se aplicaron durante seis horas, por tres días consecutivos. Dado que las plantas se cultivaron en invernáculo para luego ser expuestas en las cámaras de exposición, las plantas fueron aclimatadas en las cámaras de exposición con un flujo de aire filtrado durante una semana previo a la exposición a ozono. Las evaluaciones de los parámetros de estrés oxidativo se realizaron con muestras tomadas al inicio y al final de la aclimatación, los tres días de la exposición a ozono y los tres días posteriores a la exposición (Figura 4.1).

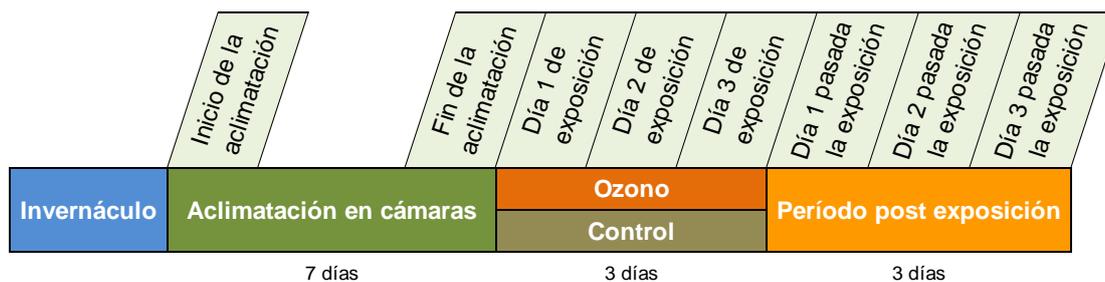


Figura 4.1. Línea de tiempo del experimento de inducción de antioxidantes en plantas de trigo.

4.2.6. Experimentos Efectos Indirectos del Ozono sobre los Áfidos

La evaluación de los efectos indirectos del ozono sobre los áfidos requirió de dos experimentos. En ambos casos, se repitió la metodología de exposición descrita en la sección anterior y se colocó a los áfidos sobre las plantas a las 0 ó 72 horas finalizada la exposición (Figura 4.2). En el primer experimento se evaluó la capacidad de los áfidos de establecerse y crecer poblacionalmente en plantas con distinta historia de estrés por ozono. Se emplearon seis cámaras de ozono, a tres se les aplicó un flujo de aire enriquecido con ozono y a tres aire filtrado. En cada cámara se colocaron 8 macetas con plantas de trigo. Inmediatamente después de finalizar el último día de exposición, se cosecharon plantas de dos macetas para realizar las determinaciones bioquímicas de daño oxidativo, dos macetas recibieron 10 áfidos cada una (tratamiento 0 hs) y las plantas restantes permanecieron en las cámaras de ozono sin más exposición. Al cabo de 72 hs pasada la exposición se procedió de la misma manera con las macetas restantes. Las muestras para las determinaciones bioquímicas fueron congeladas inmediatamente y conservadas a -70°C hasta el momento del análisis. Las macetas con áfidos fueron cubiertas con cilindros de mylar de 60 cm de altura para evitar que los áfidos pasaran de una planta a otra. Los áfidos fueron recontados al día siguiente para estimar el éxito en el establecimiento y cada dos días durante los siguientes 25 días, para estimar la tasa de crecimiento poblacional.

En el segundo experimento se evaluó si la historia de estrés por ozono modificaba parámetros de estrés oxidativo en los áfidos. Se emplearon ocho cámaras de ozono, a cuatro se les aplicó un flujo de aire enriquecido con ozono y a cuatro aire filtrado. En cada cámara se colocaron 12 macetas con plantas de trigo. Inmediatamente después de finalizar el último día de exposición, se cosecharon plantas de dos macetas para realizar las determinaciones bioquímicas de daño oxidativo, cuatro macetas recibieron 25 áfidos cada una (tratamiento 0 hs) y las plantas restantes permanecieron en las cámaras de ozono sin más exposición. Al cabo de 72 hs pasada la exposición se procedió de la misma manera con las macetas restantes. Los áfidos permanecieron alimentándose de las plantas durante 48 hs. Al cabo de este período se agrupó a los áfidos de una misma

combinación ozono-tiempo en una única muestra, se los congeló inmediatamente y se los conservó a -70°C hasta el momento de la realización de las determinaciones bioquímicas. Al igual que en el primer experimento, las macetas con áfidos fueron recubiertas con cilindros de mylar para evitar la migración de insectos entre las plantas.

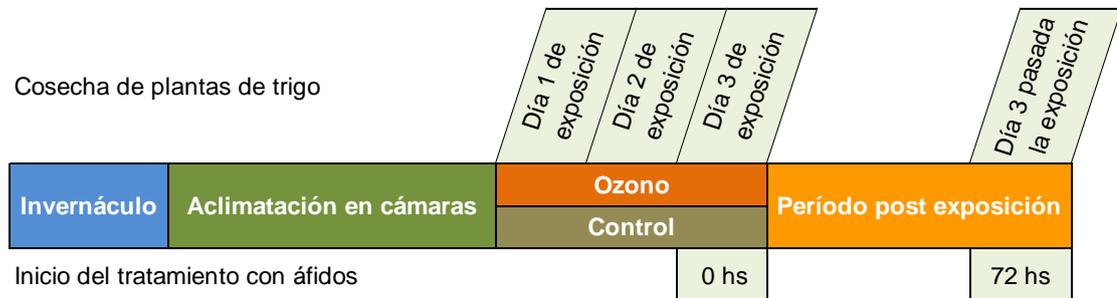


Figura 4.2. Línea de tiempo del experimento de evaluación de efectos indirectos del ozono sobre los áfidos.

4.2.7. Análisis Estadístico

4.2.7.1. Experimento inducción de antioxidantes en plantas de trigo

Los TBARS correspondientes al período de aclimatación se compararon con ANOVA de un factor, previa transformación con logaritmo decimal para alcanzar los supuestos de homogeneidad de varianzas y normalidad. Los datos de TBARS correspondientes a las cosechas restantes no cumplieron los supuestos del ANOVA a pesar de la transformación de los datos. Por lo tanto se realizó una prueba no paramétrica (Kruskal Wallis) para comparar las cosechas realizadas durante y pasada la exposición a ozono. Los valores de TRAP de todas las cosechas se compararon en un único ANOVA de un factor y las medias se compararon con el test de Tukey. Todos los análisis estadísticos se realizaron en InfoStat (Infostat, 2008).

4.2.7.2. Experimentos efectos indirectos del ozono sobre los áfidos

El primer experimento se analizó con un diseño anidado de tres factores. La exposición a ozono se incorporó como un factor fijo con dos niveles, el tiempo pasada la exposición se incorporó como un factor fijo de dos niveles cruzado con el factor ozono y las cámaras de ozono como un factor aleatorio con seis niveles, anidado en la interacción tiempo x ozono. En el segundo experimento, dado que la cantidad de áfidos disponibles limitaba el número de repeticiones, no se pudo incluir el efecto de las cámaras y se analizó con un diseño factorial de dos factores: exposición a ozono (factor fijo, dos niveles) y tiempo pasada la exposición (factor fijo, dos niveles). Se evaluó la

normalidad de los residuos de todas las variables con el test de Shapiro-Wilks y Q-Q plot, y la homogeneidad de varianzas se evaluó con el test de Levene. En ambos experimentos los valores de TBARS medidos en plantas fueron transformados con logaritmo decimal para lograr el cumplimiento de los supuestos del análisis. Las medias de los factores que resultaron significativos en el ANOVA se compararon con el test de Tukey. Todos los análisis estadísticos se realizaron en InfoStat (Infostat, 2008).

4.3. Resultados

4.3.1. Experimento Inducción de Antioxidantes en Plantas de Trigo

El nivel de peroxidación de lípidos en las plantas experimentales incrementó durante el período de aclimatación en las cámaras de exposición, la semana previa al inicio del tratamiento de ozono ($F_{1,15}=32,66$, $p=0,0001$, Figura 4.3). El nivel de peroxidación, alcanzado durante la aclimatación no se modificó por la exposición a ozono hasta el tercer día, cuando se registró mayor daño en las plantas expuestas a ozono que en las control ($H_{14,45}=34,36$, $p=0,001$, Figura 4.3). Además, finalizada la exposición, todas las plantas expuestas a ozono presentaron daños visibles, mientras que las plantas de las cámaras control no (Figura 4.4). El potencial antioxidante reactivo total también se incrementó durante la aclimatación y luego se redujo en todos los tratamientos, independientemente del nivel de ozono ($F_{\text{tiempo } 6,45}=7,82$; $p<0,0001$; DMS Tukey $25 \text{ gl}, \alpha:0,05=111,69$; Figura 4.5).

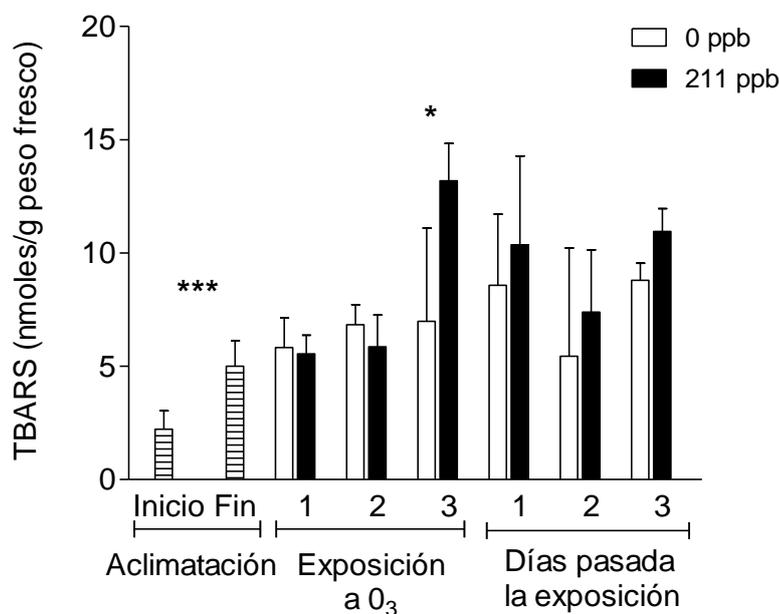


Figura 4.3. Peroxidación de lípidos (TBARS) en plantas de trigo a lo largo del tiempo. Las barras rayadas corresponden al período de aclimatación de las plantas en las cámaras de exposición. La exposición a ozono se realizó durante los tres días subsiguientes, se tomaron muestras al cabo de cada jornada de exposición y los tres días posteriores a la exposición. * $p < 0,05$; *** $p \leq 0,0001$



Control



Ozono

Figura 4.4. Lesiones visibles provocadas por la exposición a ozono en láminas de plantas de trigo.

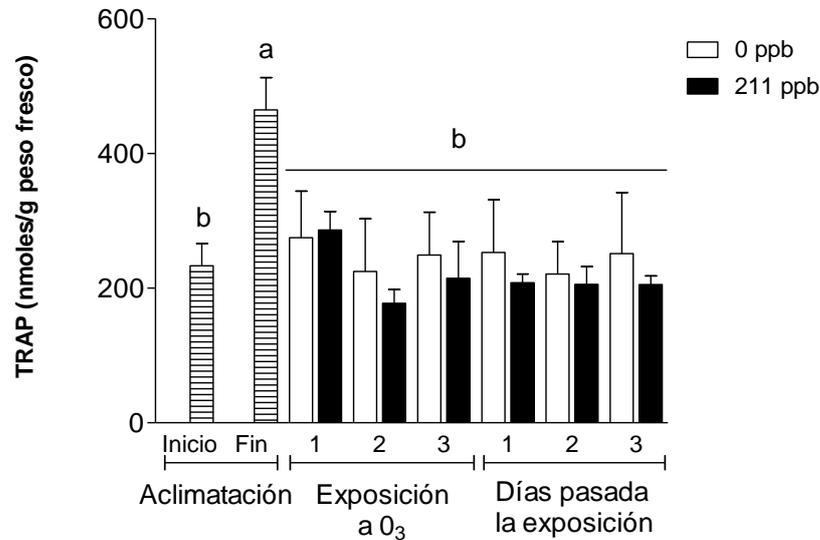


Figura 4.5. Potencial antioxidante reactivo total (TRAP) en plantas de trigo expuestas a ozono, a lo largo del tiempo. Las barras rayadas corresponden a una semana de aclimatación de las plantas en las cámaras de exposición. La exposición a ozono se realizó durante los tres días subsiguientes y se tomaron muestras de plantas al cabo de cada jornada de exposición. Finalizada la exposición se tomaron muestras diarias los 3 días posteriores. Las letras representan diferencias significativas ($\alpha:0,05$).

4.3.2. Evaluación del Efecto Indirecto del Ozono sobre los Áfidos

El potencial antioxidante reactivo total de las plantas que se ofrecieron a los áfidos en el experimento de crecimiento poblacional tras 72 hs de finalizada la exposición a ozono fue marginalmente superior al de las plantas que se ofrecieron a los áfidos inmediatamente después de finalizada la exposición a ozono (0 hs, $F_{\text{Tiempo } 1,8} = 4,73$; $p=0,06$; Figura 4.6a). La peroxidación de lípidos en estas mismas plantas fue marginalmente afectada por la interacción entre el ozono y el tiempo. Sin embargo la exposición a ozono redujo la peroxidación de lípidos en ambos momentos de muestreo (0 y 72 hs pasada la exposición a ozono ($F_{\text{Tiempo} \times \text{Ozono } 1,8} = 4,78$; $p=0,06$; $F_{\text{Ozono } 1,8} = 8,86$; $p=0,018$; Figura 4.6b). La peroxidación de lípidos en las plantas que se emplearon para la alimentación de los áfidos durante 48 hs y posterior evaluación de parámetros de estrés oxidativo fue menor en las plantas de 72 hs post exposición que a las 0 hs pasada la exposición aunque no se registraron efectos del ozono ($F_{\text{Tiempo} \times \text{Ozono } 1,6} = 0,37$; $p=0,56$; $F_{\text{Tiempo } 1,6} = 10,24$; $p=0,01$; $F_{\text{Ozono } 1,6} = 0,01$; $p=0,92$; Figura 4.6c).

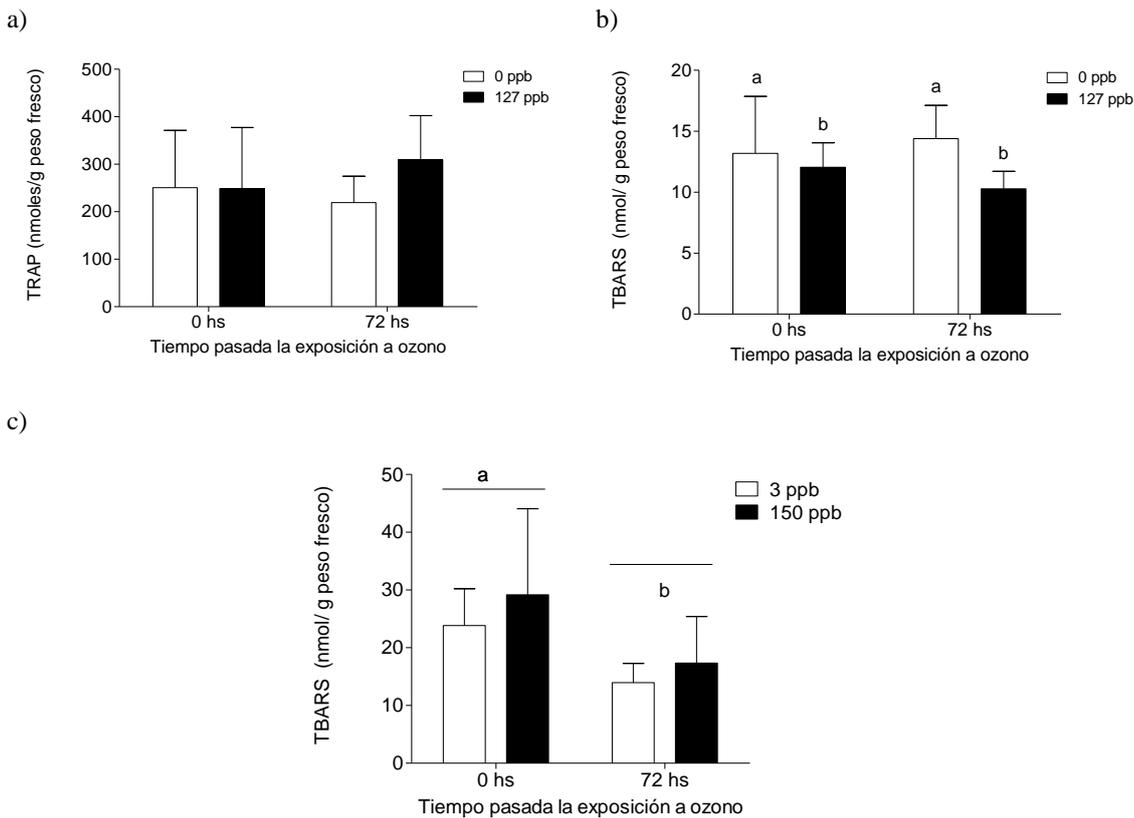
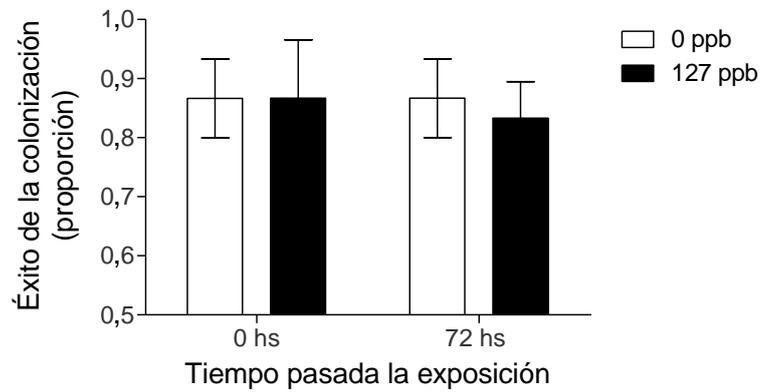


Figura 4.6. Parámetros de estrés oxidativo en plantas expuestas a ozono, previo al inicio del tratamiento con áfidos. a) Potencial antioxidante reactivo total (TRAP) y b) Peroxidación de lípidos (TBARS) en las plantas empleadas para la evaluación del éxito y crecimiento poblacional de los áfidos. c) Peroxidación de lípidos (TBARS) en las plantas empleadas para la evaluación del estrés oxidativo en áfidos tras 48 hs de alimentación.

Los áfidos se establecieron satisfactoriamente en todas las situaciones experimentales ($F_{\text{Tiempo} \times \text{Ozono}} 1,8 = 0,05$; $p=0,84$; $F_{\text{Ozono}} 1,8 = 0,05$; $p=0,84$; $F_{\text{Tiempo}} 1,8 = 0,05$; $p=0,84$; Figura 4.7a) y sus poblaciones crecieron a tasas similares en los dos tratamientos de ozono, tanto cuando las plantas se infestaron inmediatamente luego de la exposición a ozono como 72 hs después de finalizada la misma ($F_{\text{Tiempo} \times \text{Ozono}} 1,8 = 0,43$; $p=0,52$; $F_{\text{Ozono}} 1,8 = 0,17$; $p=0,68$; $F_{\text{Tiempo}} 1,8 = 4,43$; $p=0,06$; Figura 4.7b). La peroxidación de lípidos en los áfidos que se alimentaron de plantas previamente expuestas a ozono fue similar en todos los tratamientos ($F_{\text{Tiempo} \times \text{Ozono}} 1,11 = 0,06$; $p=0,81$; $F_{\text{Ozono}} 1,11 = 0,03$; $p=0,87$; $F_{\text{Tiempo}} 1,11 = 0,53$; $p=0,48$; Figura 4.8).

a)



b)

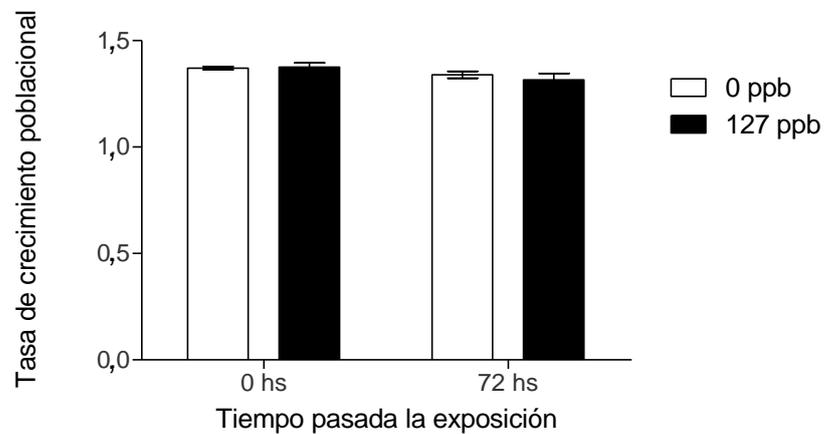


Figura 4.7. Éxito de la colonización y tasa de crecimiento poblacional de áfidos sobre plantas previamente expuestas a ozono. Los áfidos fueron transferidos a las plantas 0 ó 72 hs pasada la exposición a ozono. a) Éxito promedio de colonización sobre casa maceta al cabo de 24 hs de transferidos los insectos. b) Tasa de crecimiento poblacional calculada a partir de los recuentos periódicos del número de individuos en cada maceta.

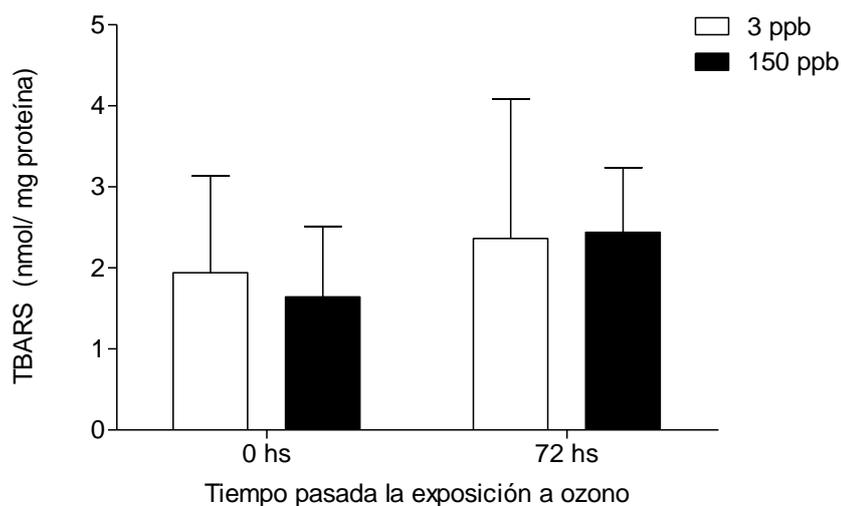


Figura 4.8. Peroxidación de lípidos (TBARS) en áfidos que se alimentaron durante 48 hs de plantas previamente expuestas a ozono

4.4. Discusión

En este capítulo se abordaron los efectos indirectos del ozono sobre los áfidos y el rol de los antioxidantes en el crecimiento de las poblaciones de áfidos. El experimento piloto permitió establecer la importancia del período de aclimatación previo a la exposición a ozono, ya que la peroxidación de lípidos y el potencial antioxidante reactivo total aumentaron durante este período aún sin exponer las plantas al contaminante (Figuras 4.3 y 4.5). En los experimentos posteriores los resultados fueron variables, y no se observó una clara relación entre la exposición a ozono y el valor de daño en las plantas medido a través de la peroxidación de lípidos (TBARS) (Figura 4.6). Sin embargo, los niveles de peroxidación de lípidos son comparables a los obtenidos en otros trabajos donde la exposición a ozono fue crónica y a dosis que raramente superaban los 100 ppb de ozono (Biswas *et al.*, 2007; Inada *et al.*, 2012), aunque muy superiores a los detectados por Li y colaboradores (2013) al cabo de uno y diez días de exposición a 80 y 120 ppb de ozono. Cabe mencionar además que en ninguno de los trabajos mencionados se detectaron lesiones visibles provocadas por ozono, mientras que todas las plantas expuestas a ozono en los experimentos del presente capítulo presentaron lesiones visibles (Figura 4.4).

En el caso del potencial antioxidante reactivo total, no se registró un aumento en las plantas expuestas a ozono en ninguno de los tres experimentos descritos en este capítulo (Figuras 4.4, 4.6). Este resultado contradice los antecedentes bibliográficos (Rai *et al.*, 2007; Inada *et al.*, 2012; Li *et al.*, 2013) y la primera predicción de la hipótesis de este capítulo. Estas diferencias podrían estar asociadas a distintos factores.

Una posibilidad es que las plantas de trigo requieran una exposición a ozono crónica y desde un momento temprano del ciclo fenológico para lograr el ajuste la actividad de las enzimas antioxidantes, la aclimatación al estrés y la acumulación de antioxidantes (Biswas *et al.*, 2007; Rai *et al.*, 2007; Inada *et al.*, 2012). No obstante, el trabajo de Li y colaboradores (2013) demuestra que los cambios en la expresión de genes y en la actividad enzimática aparecen al cabo de un día de exposición a ozono, lo que es compatible con el modo de exposición aguda empleado en estos experimentos.

Cabe destacar también que la actividad enzimática no puede ser considerada de forma aislada para comprender los mecanismos de detoxificación del ozono. Algunas enzimas remueven los ROS directamente, otras los remueven oxidando moléculas como el ácido ascórbico y el glutatión y otras son necesarias para el reciclado de estos antioxidantes (Foyer & Noctor, 2011). Esta diversidad de elementos dificulta la comprensión del estado de la planta en condiciones de estrés, que necesariamente deben interpretarse de forma integral. En este sentido, el uso de un potencial antioxidante reactivo total podría dar una idea general del estado oxidativo de la planta, aunque podría a la vez enmascarar diferencias en la localización y el funcionamiento de los antioxidantes (Kollist *et al.*, 2000). Más aún, la concentración de antioxidantes varía a lo largo del ciclo fenológico de los cultivos. En el cultivo de trigo, los principales cambios ocurren en la hoja bandera, desde anthesis hasta el llenado de grano donde se acoplan la translocación de carbohidratos y la senescencia, cuyo efecto sobre los antioxidantes puede enmascarar el del ozono (Fangmeier *et al.*, 1994; Bender *et al.*, 1994). Los distintos cultivares también varían en su susceptibilidad al ozono. Biswas y colaboradores (2007) demostraron que los cultivares más recientes de trigo tienen una mayor sensibilidad al ozono que está asociada a la reducción de la capacidad antioxidante, entre otras características fisiológicas.

Todas las plantas expuestas a ozono presentaron lesiones visibles, por lo que puede presumirse que las plantas afectadas deberían diferenciarse de las del tratamiento control en cuanto a su calidad para alimentar a los áfidos. En este sentido, es conocido que el crecimiento de las plantas en condiciones de estrés puede generar efectos benéficos para los áfidos (Koricheva *et al.*, 1998). Alternativamente, si se considera que parte de las defensas contra insectos son los compuestos pro-oxidantes de las plantas, podría presumirse que el estado oxidativo en las plantas expuestas a ozono podría ser aún menos favorable para los insectos. Sin embargo el nivel de peroxidación de lípidos de los áfidos no fue afectado por la historia de exposición a ozono de las plantas de las que se alimentaron (Figura 4.8). En este caso se podría pensar que el balance oxidativo de las plantas se haya restablecido pasada la exposición a ozono. Por otro lado, las poblaciones se establecieron y crecieron a tasas similares en plantas expuestas o no a ozono (Figura 4.7). Es posible pensar que las plantas hayan diferido en alguna característica nutricionalmente relevante no medida y que los áfidos compensaran estas diferencias incrementando la ingesta en las plantas de menor calidad (Prosser *et al.*, 1992). Además de la modificación en la tasa de

ingesta, la asociación de los áfidos con endosimbiontes secundarios permitiría también compensar las deficiencias nutricionales de la dieta (Wilkinson *et al.*, 2007). Ambos factores podrían considerarse de relevancia para comprender la falta de respuesta biológica en los áfidos que se alimentaron de plantas con diferente de historia de estrés, que por otro lado no estuvo asociada a modificaciones en el potencial antioxidante total como se esperaba inicialmente.

DISCUSIÓN GENERAL

El impacto de la contaminación con ozono sobre el rendimiento de los cultivos debe considerarse en el contexto de la interacción con otros factores de estrés biótico y abiótico. El ozono modifica el balance oxidativo de las plantas (Sharma & Davis, 1997; Kangasjärvi *et al.*, 2005) y con ello, podría modificar la susceptibilidad a las plagas de insectos. Los áfidos son plagas de cultivos importantes cuyo principal impacto está asociado a la transmisión de enfermedades (Ng & Perry, 2004). En esta tesis se estudiaron los efectos directos e indirectos del ozono sobre las relaciones planta-áfido-endosimbionte, con énfasis en el rol de los antioxidantes como moduladores del crecimiento poblacional.

Hasta ahora se creía que los efectos del ozono sobre los insectos eran principalmente indirectos, es decir mediados por las plantas (Holopainen, 2002). De esta manera, en la mayoría de los trabajos que evalúan las consecuencias del ozono sobre los áfidos exponen plantas y áfidos a ozono de manera conjunta (Holopainen & Kossi, 1998; Awmack *et al.*, 2004; Menéndez *et al.*, 2010; Mondor *et al.*, 2010). A diferencia de estos trabajos, en esta tesis se evaluaron los efectos directos e indirectos de forma aislada y se plantea a los antioxidantes como una variable importante para entender los resultados posibles de la interacción planta-áfido en un contexto de contaminación por ozono. Además, se consideró la posibilidad de que estos efectos estuvieran mediados por la interacción con mutualistas (Figura 5.1).

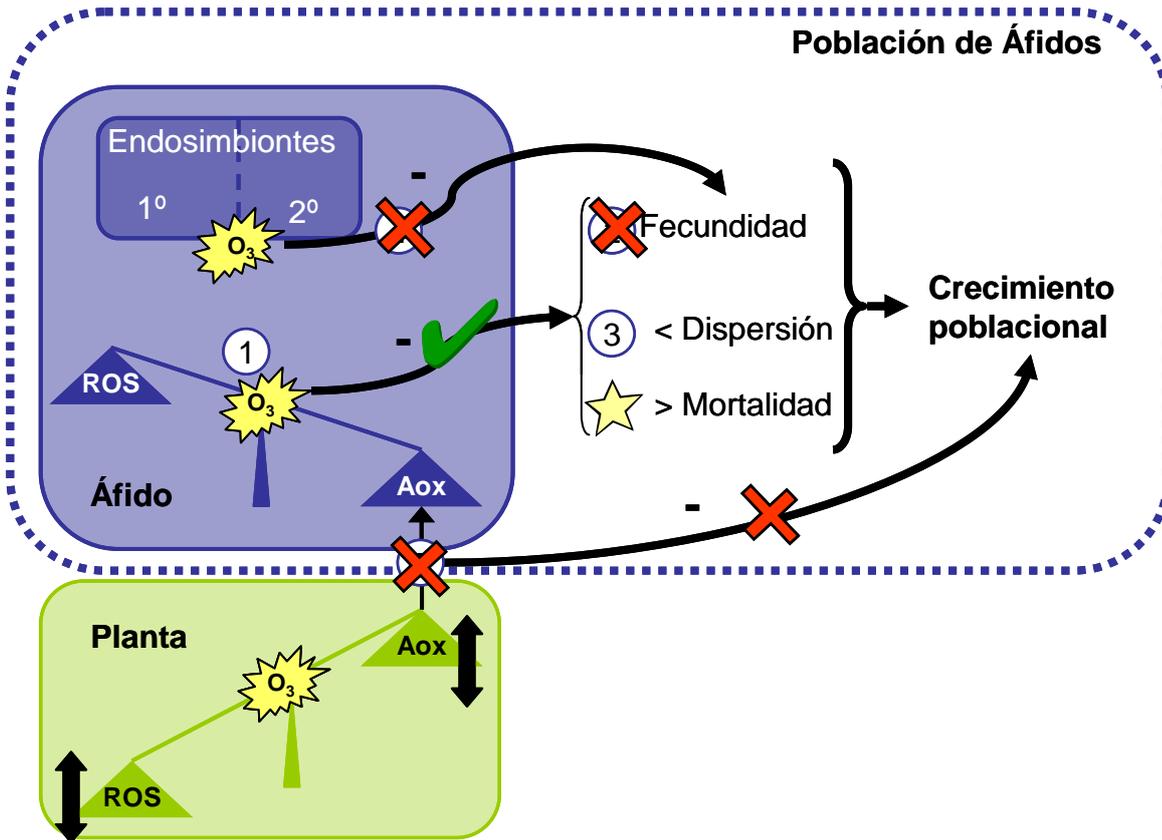


Figura 5.1. Estado actual del modelo de efectos directos e indirectos del ozono sobre los áfidos propuesto en esta tesis. Sobre esta figura se representan los principales hallazgos de esta tesis. “v” representa los mecanismos que fueron verificados, “x” representa los mecanismos que fueron rechazados y la estrella de cinco puntas representa los mecanismos incorporados al modelo a partir de los resultados de esta tesis.

Aislar el efecto directo del ozono sobre los áfidos y comprender las implicancias de este efecto en su ciclo de vida es fundamental para lograr una buena apreciación del potencial impacto de estos insectos en un contexto de contaminación por ozono. El conocimiento previo de los efectos directos del ozono sobre los áfidos estaba limitado a la comprensión de las consecuencias de la exposición sobre la tasa de crecimiento individual de los insectos, sin considerar de forma explícita las consecuencias sobre la fecundidad ni el crecimiento de las poblaciones (Jackson, 1995). En esta tesis, el abordaje de los efectos directos del ozono sobre los áfidos incluyó variables con impacto a distintos niveles. Además, se desarrolló una metodología de exposición que permitió evaluar la efectividad del tratamiento de exposición a ozono, lo que incrementa la confiabilidad de los resultados aquí expuestos.

A nivel bioquímico, se evaluó el efecto del ozono sobre los áfidos en términos de estrés oxidativo. La acumulación de daño por estrés oxidativo por efecto de la exposición a ozono es una respuesta ampliamente descrita en los seres vivos (Wagner *et al.*, 2001; Cross *et al.*, 2002). Sin embargo, esta posibilidad no había sido previamente explorada en áfidos en el contexto de la contaminación ambiental. Los resultados de esta tesis aportan evidencias de la acumulación de daño oxidativo en los áfidos expuestos a ozono a la vez que abren nuevas preguntas sobre la capacidad endógena de los áfidos para detoxificar los ROS derivados de la exposición a ozono. En los experimentos de esta tesis se registró mortalidad de áfidos asociada a la exposición a ozono, lo que sugiere que el nivel de exposición a ozono superó la capacidad de evitar el daño oxidativo. Dado que sólo tiene sentido evaluar el daño oxidativo en individuos vivos, el patrón irregular en el nivel de peroxidación de lípidos detectado en esta tesis podría estar asociado al empleo de dosis excesivamente altas para los áfidos.

Sin embargo, los áfidos están presentes en los ambientes contaminados con ozono y no hay referencias a la mortalidad de los áfidos en los experimentos donde los áfidos son expuestos a ozono mientras se alimentan de las plantas. Esto destaca la importancia de considerar el contexto biótico y abiótico de los áfidos a la hora de evaluar los efectos del ozono. Por una lado, el contexto biótico puede ser un controlador importante de la capacidad de detoxificación de los ROS en los áfidos, dado que la alimentación en diferentes plantas hospedadoras modula la actividad de los antioxidantes (Łukasik, 2009; Łukasik *et al.*, 2012; Łukasik & Goławska, 2013). Por otro lado, la diferencia en los niveles de peroxidación de lípidos que sufrieron los áfidos en el experimento piloto del capítulo de efectos directos del ozono respecto de los experimentos siguientes sugiere que la interacción del ozono con las condiciones ambientales puede llevar a resultados muy diferentes.

Los áfidos están expuestos al ozono de forma directa en momentos agronómicamente importantes de su ciclo de vida, lo que podría reducir la eficiencia de transmisión de virus que ocasionan enfermedades en los cultivos. Aunque podría considerarse que los morfotipos ápteros están especializados en la reproducción, se ha demostrado su importancia como vectores de virus entre plantas de un mismo lote (van Emden & Harrington, 2007). Los agentes externos, como el viento y la lluvia, hacen caer a estos individuos al suelo o transportarlos por distancias relativamente cortas (plantas vecinas) o medianas. Mientras estos insectos caminan hasta alcanzar una planta nueva son particularmente susceptibles a los efectos directos del ozono. Por su parte, los morfotipos alados son principalmente responsables de la transmisión de virus en una gama más amplia de escalas y pasan mayor tiempo asilados de las plantas y expuestos a los efectos directos del ozono.

El efecto directo del ozono fue un modulador importante del crecimiento poblacional de *M. dirhodum*. La reducción de la dispersión, sumada al incremento de la mortalidad por la exposición directa a ozono, podría conducir a una menor propagación de enfermedades en cultivos. A pesar de que en el contexto del capítulo 3 la hipótesis de que el éxito en la colonización de nuevas plantas dependa del potencial antioxidante de los insectos haya sido rechazada, cabe la posibilidad que el procedimiento experimental favoreciera este resultado. En dicho experimento, los áfidos fueron transferidos manualmente desde las dietas artificiales a las plantas de trigo. Sin embargo, si repitiera el experimento permitiendo la dispersión natural de los áfidos, el éxito de la colonización de los áfidos expuestos a ozono fuera menor y sus poblaciones crecieran de modo diferente. Se ha demostrado cierta generalidad en el mecanismo de acción de los perjuicios del ozono sobre los insectos (Cross *et al.*, 2002; Holmstrup *et al.*, 2011). En consecuencia, podría esperarse que los efectos directos detectados a nivel individual y poblacional en la presente tesis sean aplicables a otras especies de áfidos.

En la aproximación a los efectos indirectos del ozono sobre los áfidos no se detectó un efecto biológico sobre los áfidos a pesar de que las plantas sufrieron cambios visibles con la exposición a ozono. Resulta llamativo que las poblaciones de áfidos se establecieran y crecieran a tasas similares en todas situaciones dado que las plantas mostraron daño visible provocado por el ozono. La falta de un efecto biológico sobre los áfidos en este experimento, además de conducir al rechazo de la hipótesis específica 5 de esta tesis, sugiere que otros mecanismos de defensa tampoco fueron afectados por el ozono. A partir de los resultados obtenidos en esta tesis, podría pensarse que si los áfidos fueran expuestos a ozono de forma simultánea, la interacción entre los efectos directos e indirectos podría tener un efecto nulo o negativo. Sin embargo, si la exposición a ozono lograra inducir la acumulación de antioxidantes como se propuso inicialmente (Rai *et al.*, 2007; Inada *et al.*, 2012; Li *et al.*, 2013), el resultado de la interacción entre el efecto directo y el indirecto podría dar como resultado un incremento en la “performance” de los áfidos.

Otros trabajos mostraron que los efectos del ozono sobre los insectos están asociados a cambios en el valor nutricional de las plantas (Awmack *et al.*, 2004). Aunque el valor nutricional de las plantas no fue considerado de en esta tesis, los áfidos pueden modificar la ingesta acorde a la calidad de la planta y así compensar posibles déficit nutricionales (Prosser *et al.*, 1992). Esta posibilidad es compatible con los resultados de la presente tesis donde todas las poblaciones de áfidos crecieron de forma similar, independientemente de la historia de estrés de las plantas.

En un contexto de estrés ambiental dado por el cambio global, podríamos esperar que en las poblaciones de áfidos que estén asociadas a endosimbiontes secundarios tengan un mayor éxito. La asociación con endosimbiontes secundarios provee a los áfidos de protección contra enemigos naturales, patógenos y estrés térmico. Sin embargo, existen evidencias de que los mecanismos que operan detrás de estos

beneficios son indirectos. Por ejemplo, la capacidad de *S. symbiotica* de reducir los efectos negativos del estrés térmico sobre los áfidos estaría asociadas a un efecto positivo de este endosimbionte sobre *B. aphidicola* (Montllor *et al.*, 2002; Russell & Moran, 2006). Es decir que la presencia del endosimbionte secundario podría resguardar los beneficios nutricionales que *Buchnera aphidicola* otorga a los áfidos. Aunque en el capítulo sobre los efectos directos del ozono se descartó que los endosimbiontes tuvieran un rol en las respuestas de los áfidos en condiciones de contaminación con ozono, es posible que ocurrieran cambios funcionales en los simbioses que no fueron contemplados en el diseño del experimento. En el futuro, la funcionalidad de *B. aphidicola* podría evaluarse a través de la expresión de GroEL, una proteína de origen bacteriano que se encuentra en la saliva de los áfidos y que ha demostrado ser un buen indicador de la funcionalidad de esta simbiosis (Douglas, 1998a). También podría evaluarse si los endosimbiontes secundarios tienen algún rol protector en condiciones de estrés por ozono, hipótesis que no pudo ponerse a prueba en el contexto del diseño experimental empleado en el capítulo de efectos directos del ozono. La puesta a prueba de esta hipótesis, requeriría manipular el nivel de infección para evaluar los efectos sobre los áfidos en presencia y ausencia de endosimbiontes secundarios.

Conclusiones Principales y Perspectivas Futuras

La evaluación aislada de los efectos directos e indirectos sugiere que el comportamiento idiosincrático de las respuestas de los áfidos frente al ozono podría surgir de la interacción entre estos dos efectos. Por un lado, el efecto directo del ozono sobre los áfidos puede reducir su capacidad de explotar a las plantas. Por otro lado, el impacto del ozono sobre las plantas podría reducir los efectos deletéreos del ozono sobre los insectos. El efecto directo del ozono tiene el potencial de reducir el impacto de los brotes epidémicos porque afecta la supervivencia y la dispersión de los áfidos. En particular, la dispersión es un factor clave en los modelos de propagación de enfermedades en cultivos (Burdon, 1987), por lo tanto, el estudio de la dispersión de los áfidos en el contexto de la contaminación con ozono desde una perspectiva comportamental y poblacional permitirá mejorar nuestra apreciación del impacto de la contaminación con ozono en la transmisión de enfermedades en los cultivos. Además, en esta tesis se identificaron preguntas importantes que incorporan a los endosimbiontes de los áfidos al marco de estudio de los efectos de la contaminación con ozono sobre los áfidos. La interacción de los áfidos con sus endosimbiontes involucra procesos que fueron previamente identificados como blancos de los efectos del ozono, como la nutrición, la interacción con parasitoides y la tolerancia a factores de estrés abiótico (Montllor *et al.*, 2002; Wilkinson *et al.*, 2007; Himanen *et al.*, 2009). En consecuencia, la presencia y funcionalidad de los endosimbiontes pueden proveer información relevante sobre los mecanismos subyacentes a los patrones que hoy en día, resultan confusos.

BIBLIOGRAFÍA

- Alkhedir H. 2009.** Molecular characterisation of *Sitobion avenae* F. clones and their interaction with different host plants. PhD Thesis. Georg-August-University Göttingen, Germany.
- Ashmore MR. 2005.** Assessing the future global impacts of ozone on vegetation. *Plant, Cell and Environment* **28**: 949–964.
- Awmack CS, Harrington R, Lindroth RL. 2004.** Aphid individual performance may not predict population responses to elevated CO₂ or O₃. *Global Change Biology* **10**: 1414–1423.
- Baumann P, Baumann L, Lai C, Rouhbakhsh D, Moran NA, Clark MA. 1995.** Genetics, physiology and evolutionary relationships of the genus *Buchnera*: Intracellular symbionts of aphids. *Annual Review of Microbiology* **49**: 55–94.
- Bender J, Weigel HJ, Wegner U, Jäger HJ. 1994.** Response of cellular antioxidants to ozone in wheat flag leaves at different stages of plant development. *Environmental pollution* **84**: 15–21.
- Bidart-Bouzat MG, Imeh-Nathaniel A. 2008.** Global change effects on plant chemical defenses against insect herbivores. *Journal of integrative plant biology* **50**: 1339–1354.
- Biswas DK, Xu H, Li YG, Sun JZ, Wang XZ, Han XG, Jiang GM. 2007.** Genotypic differences in leaf biochemical, physiological and growth responses to ozone in 20 winter wheat cultivars released over the past 60 years. *Global Change Biology* **14**: 46–59.
- Blasco E, Torres C. 1977.** *El pulgón amarillo de los cereales Metopolophium dirhodum* Walk. en la subregión triguera I. INTA, E.E.A. Rafaela, Santa Fe, Argentina. Información para Extensión N° 5.
- Booker F, Muntifering R, McGrath M, Burkey K, Decoteau D, Fiscus E, Manning W, Krupa S, Chappelka A, Grantz D. 2009.** The ozone component of global change: potential effects on agricultural and horticultural plant yield, product quality and interactions with invasive species. *Journal of Integrative Plant Biology* **51**: 337–351.
- Burdon JJ. 1987.** *Diseases and Plant Population Biology*. Cambridge, United Kingdom and New York, NY, USA: Cambridge University Press.

- Castañeda LE, Sandrock C, Vorburger C. 2010.** Variation and covariation of life history traits in aphids are related to infection with the facultative bacterial endosymbiont *Hamiltonella defensa*. *Biological Journal of the Linnean Society* **100**: 237–247.
- Clark MA, Baumann L, Munson MA, Baumann P, Campbell BC, Duffus JE, Osborne LS, Moran NA. 1992.** The eubacterial endosymbionts of whiteflies (Homoptera: Aleyrodoidea) constitute a lineage distinct from the endosymbionts of aphids and mealybugs. *Current Microbiology* **25**: 119–123.
- Cross CE, Valacchi G, Schock B, Wilson M, Weber S, Eiserich J, van der Vliet A. 2002.** Environmental oxidant pollutant effects on biologic systems: a focus on micronutrient antioxidant-oxidant interactions. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* **166**: S44–50.
- Darby AC, Birkle LM, Turner SL, Douglas AE. 2001.** An aphid-borne bacterium allied to the secondary symbionts of whitefly. *FEMS Microbiology Ecology* **36**: 43–50.
- Dedryver CA, Le Ralec A, Fabre F. 2010.** The conflicting relationships between aphids and men: a review of aphid damage and control strategies. *Comptes Rendus Biologies* **333**: 539–553.
- Degnan PH, Moran NA. 2008.** Evolutionary genetics of a defensive facultative symbiont of insects: exchange of toxin-encoding bacteriophage. *Molecular Ecology* **17**: 916–929.
- Degnan PH, Yu Y, Sisneros N, Wing RA, Moran NA. 2009.** *Hamiltonella defensa*, genome evolution of protective bacterial endosymbiont from pathogenic ancestors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **106**: 9063–9068.
- Dill LLM, Fraser AAHG, Roitberg BBD. 1990.** The economics of escape behaviour in the pea aphid, *Acyrtosiphon pisum*. *Oecologia* **83**: 473–478.
- Douglas AE. 1998a.** Insect-Microbial Symbioses: Aphids and Their Symbiotic Bacteria *Buchnera*. *Annual Review of Entomology* **43**: 17–37.
- Douglas AE. 1998b.** Host benefit and the evolution of specialization in symbiosis. *Heredity* **81**: 599–603.
- Douglas AE, Francois CLMJ, Minto LB. 2006.** Facultative “secondary” bacterial symbionts and the nutrition of the pea aphid, *Acyrtosiphon pisum*. *Physiological Entomology* **31**: 262–269.

- Dowling DK, Simmons LW. 2009.** Reactive oxygen species as universal constraints in life-history evolution. *Proceedings. Biological sciences / The Royal Society* **276**: 1737–1745.
- Doyle JLJ. 1987.** A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin* **19**: 11–15.
- Van Emden HF, Harrington R. 2007.** *Aphids as Crop Pests* (HF van Emden and R Harrington, Eds.). Trowbridge, UK.: CABI.
- Fangmeier A, Brunschön S, Jäger H. 1994.** Time course of oxidant stress biomarkers in flag leaves of wheat exposed to ozone and drought stress. *New Phytologist* **126**: 63–69.
- Foyer CH, Noctor G. 2005.** Oxidant and antioxidant signalling in plants: a re-evaluation of the concept of oxidative stress in a physiological context. *Plant, Cell and Environment* **28**: 1056–1071.
- Foyer CH, Noctor G. 2011.** Ascorbate and glutathione: the heart of the redox hub. *Plant Physiology* **155**: 2–18.
- Fuhrer J. 2003.** Agroecosystem responses to combinations of elevated CO₂, ozone, and global climate change. *Agriculture, Ecosystems & Environment* **97**: 1–20.
- Gill SS, Tuteja N. 2010.** Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiology and Biochemistry* **48**: 909–930.
- Giordanengo P, Brunissen L, Rusterucci C, Vincent C, Van Bel A, Dinant S, Girousse C, Faucher M, Bonnemain J-L. 2010.** Compatible plant-aphid interactions: How aphids manipulate plant responses. *Comptes Rendus Biologies* **333**: 516–523.
- Goggin FL. 2007.** Plant-aphid interactions: molecular and ecological perspectives. *Current Opinion in Plant Biology* **10**: 399–408.
- Goggin FL, Avila C a, Lorence A. 2010.** Vitamin C content in plants is modified by insects and influences susceptibility to herbivory. *BioEssays* **32**: 777–790.
- Guerrieri E, Digilio MC. 2008.** Aphid-plant interactions: a review. *Journal of Plant Interactions* **3**: 223–232.
- Haine ER. 2008.** Symbiont-mediated protection. *Proceedings of the Royal Society Biological Sciences* **275**: 353–361.

- Haynes S, Darby AC, Daniell TJ, Webster G, Van Veen FJF, Godfray HCJ, Prosser JI, Douglas AE, Veen FJF Van. 2003.** Diversity of Bacteria Associated with Natural Aphid Populations Diversity of Bacteria Associated with Natural Aphid Populations. *Applied and Environmental Microbiology* **69**: 7216–7223.
- Himanen SJ, Nerg A, Holopainen JK. 2009.** Degree of herbivore feeding damage as an important contributor to multitrophic plant-parasitoid signaling under climate change. **4**: 1–3.
- Holmstrup M, Sørensen JG, Heckmann L-H, Slotsbo S, Hansen P, Hansen LS. 2011.** Effects of ozone on gene expression and lipid peroxidation in adults and larvae of the red flour beetle (*Tribolium castaneum*). *Journal of Stored Products Research* **47**: 378–384.
- Holopainen JK. 2002.** Aphid response to elevated ozone and CO₂. *Entomologia Experimentalis et Applicata* **104**: 137–142.
- Holopainen JK, Kossi S. 1998.** Variable growth and reproduction response of the spruce shoot aphid, *Cinara pilicornis*, to increasing ozone concentrations. *Entomologia Experimentalis et Applicata* **87**: 109–113.
- Honek A, Jarosik V, Lapchin L, Rabasse J-M. 1998.** The effect of parasitism by *Aphelinus abdominalis* and drought on the walking movement of aphids. *Entomologia Experimentalis et Applicata* **87**: 191–200.
- Inada H, Kondo T, Akhtar N, Hoshino D, Yamaguchi M, Izuta T. 2012.** Relationship between cultivar difference in the sensitivity of net photosynthesis to ozone and reactive oxygen species scavenging system in Japanese winter wheat (*Triticum aestivum*). *Physiologia Plantarum* **146**: 217–227.
- Infostat. 2008.** InfoStat version 2008. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba. Argentina.
- IPCC. 2007.** *Climate Change 2007: The Physical Science Basis. Contribution of Working Group I to the Fourth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change* (S Solomon, D Qin, M Manning, Z Chen, M Marquis, KB Averyt, M Tignor, and HL Miller, Eds.). Cambridge, United Kingdom and New York, NY, USA: Cambridge University Press.
- Iriti M, Faoro F. 2009.** Chemical diversity and defence metabolism: how plants cope with pathogens and ozone pollution. *International Journal of Molecular Sciences* **10**: 3371–3399.

- Jackson GE. 1995.** The effect of ozone, nitrogen dioxide or nitric oxide fumigation of cereals on the rose grain aphid *Metopolophium dirhodum*. *Agriculture, Ecosystems & Environment* **54**: 187–194.
- Jaggi M, Ammann C, Neftel a, Fuhrer J. 2006.** Environmental control of profiles of ozone concentration in a grassland canopy. *Atmospheric Environment* **40**: 5496–5507.
- Johnson KS, Felton GW. 2001.** Plant phenolics as dietary antioxidants for herbivorous insects: a test with genetically modified tobacco. *Journal of Chemical Ecology* **27**: 2579–2597.
- Kaloshian I, Walling LL. 2005.** Hemipterans as plant pathogens. *Annual Review of Phytopathology* **43**: 491–521.
- Kangasjärvi J, Jaspers P, Kollist H. 2005.** Signalling and cell death in ozone-exposed plants. *Plant, Cell and Environment* **28**: 1021–1036.
- Kerchev PPI, Fenton B, Foyer CH, Hancock RD. 2012.** Plant responses to insect herbivory: interactions between photosynthesis, reactive oxygen species and hormonal signalling pathways. *Plant, Cell and Environment* **35**: 441–453.
- Kiers TE, Palmer TM, Ives AR, Bruno JF, Bronstein JL. 2010.** Mutualisms in a changing world: an evolutionary perspective. *Ecology Letters* **13**: 1459–1474.
- Kim JH, Jander G. 2007.** *Myzus persicae* (green peach aphid) feeding on *Arabidopsis* induces the formation of a deterrent indole glucosinolate. *The Plant Journal* **49**: 1008–1019.
- Kollist H, Moldau H, Mortensen L, Rasmussen SK, Jørgensen LB. 2000.** Ozone Flux to Plasmalemma in Barley and Wheat is controlled by Stomata rather than by direct Reaction of Ozone with Cell Wall Ascorbate. *Journal of Plant Physiology* **156**: 645–651.
- Koricheva J, Larsson S, Haukioja E. 1998.** Insect performance on experimentally stressed woody plants: a meta-analysis. *Annual Review of Entomology* **43**: 195–216.
- Leclercq-Le Quillec F, Tanguy S, Dedryver CA. 1995.** Aerial flow of barley yellow dwarf viruses and of their vectors in western France. *Annals of Applied Biology* **126**: 75–90.
- Leonardo TE. 2004.** Removal of a specialization-associated symbiont does not affect aphid fitness. *Ecology Letters* **7**: 461–468.

- Li CH, Wang T-Z, Li Y, Zheng Y-H, Jiang G-M. 2013.** Flixweed is more competitive than winter wheat under ozone pollution: evidences from membrane lipid peroxidation, antioxidant enzymes and biomass. *PloS One* **8**: e60109.
- Lissi E, Salim-Hanna M, Pascual C, Del Castillo MD. 1995.** Evaluation of Total Antioxidant Potential (TRAP) and Total Antioxidant Reactivity from Luminol-enhanced Chemiluminescence Measurements. *Free Radical Biology and Medicine* **18**: 153–158.
- Lombaert E, Boll R, Lapchin L. 2006.** Dispersal strategies of phytophagous insects at a local scale: adaptive potential of aphids in an agricultural environment. *BMC Evolutionary Biology* **6**: 75.
- Lopes-da-Silva M, Vieira LGE. 2007.** Analysis of the genetic diversity in *Metopolophium dirhodum* (Walker) (Hemiptera, Aphididae) by RAPD markers. *Revista Brasileira de Entomologia* **51**: 54–57.
- Lukasik I. 2007.** Changes in activity of superoxide dismutase and catalase within cereal aphids in response to plant o-dihydroxyphenols. *Journal of Applied Entomology* **131**: 209–214.
- Lukasik I. 2009.** Effect of host plant alternation on some adaptive enzymes of the bird cherry–oat aphid, *Rhopalosiphum padi* (L.). *Journal of Pest Science*: 203–209.
- Lukasik I, Goławska S. 2013.** Effect of host plant on levels of reactive oxygen species and antioxidants in the cereal aphids *Sitobion avenae* and *Rhopalosiphum padi*. *Biochemical Systematics and Ecology* **51**: 232–239.
- Lukasik I, Goławska S, Leszcaynski B. 2009.** Biochemical Markers of Oxidative Stress within Tissues of Cereal Aphids. *Acta Biologica Hungarica* **60**: 263–272.
- Lukasik I, Goławska S, Wójcicka A. 2012.** Effect of Host Plants on Biochemical Markers of Oxidative Stress within Tissues of Pea Aphid. *Journal of Plant Protection Research* **52**: 59–63.
- Ma G, Ma C-S. 2012a.** Effect of acclimation on heat-escape temperatures of two aphid species: Implications for estimating behavioral response of insects to climate warming. *Journal of Insect Physiology* **58**: 303–309.
- Ma G, Ma C-S. 2012b.** Climate warming may increase aphids' dropping probabilities in response to high temperatures. *Journal of Insect Physiology* **58**: 1456–1462.
- Mandrioli M, Manicardi G. 2013.** Evolving aphids: one genome-one organism insects or holobionts? *Invertebrate Survival Journal* **10**: 1–6.

- Menéndez AI, Romero AM, Folcia AM, Martínez-Ghersa MA. 2009.** Getting the interactions right: Will higher O₃ levels interfere with induced defenses to aphid feeding? *Basic and Applied Ecology* **10**: 255–264.
- Menéndez AI, Romero AM, Folcia AM, Martínez-Ghersa MA. 2010.** Aphid and episodic O₃ injury in arugula plants (*Eruca sativa* Mill) grown in open-top field chambers. *Agriculture, Ecosystems and Environment* **135**: 10–14.
- Meyer U, Köllner B, Willenbrink J, Krause GH. 2000.** Effects of different ozone exposure regimes on photosynthesis, assimilates and thousand grain weight in spring wheat. *Agriculture, Ecosystems & Environment* **78**: 49–55.
- Mondor EB, Awmack CS, Lindroth RL. 2010.** Individual growth rates do not predict aphid population densities under altered atmospheric conditions. *Agricultural and Forest Entomology* **12**: 293–299.
- Montllor CB, Maxmen A, Purcell AH. 2002.** Facultative bacterial endosymbionts benefit pea aphids *Acyrtosiphon pisum* under heat stress. *Ecological Entomology* **27**: 189–195.
- Moran NA. 2007.** Symbiosis as an adaptive process and source of phenotypic complexity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **104 Suppl**: 8627–8633.
- Moran NA, Baumann P. 2000.** Bacterial endosymbionts in animals. *Current Opinion in Microbiology* **3**: 270–275.
- Moran NA, Degnan PH, Santos SR, Dunbar HE, Ochman H. 2005.** 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* **102**: 16919–16926.
- Ng J, Perry K. 2004.** Transmission of plant viruses by aphid vectors. *Molecular Plant Pathology* **5**: 505–511.
- 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 bacterial symbionts in aphids confer resistance to parasitic wasps. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **100**: 1803–1807.

Peltonen PA, Vapaavuori E, Heinonen J, Julkunen-Tiitto R, Holopainen JK. 2010. Do elevated atmospheric CO₂ and O₃ affect food quality and performance of folivorous insects on silver birch? *Global Change Biology* **16**: 918–935.

Prosser WA, Simpson SJ, Douglas AE. 1992. How an aphid (*Acyrtosiphon pisum*) symbiosis responds to variation in dietary nitrogen. *Journal of Insect Physiology* **38**: 301–307.

Rai R, Agrawal M, Agrawal SB. 2007. Assessment of yield losses in tropical wheat using open top chambers. *Atmospheric Environment* **41**: 9543–9554.

Rouhier N, Jacquot J-P. 2008. Getting sick may help plants overcome abiotic stress. *New Phytologist* **180**: 738–741.

Russell JA, Latorre A, Sabater-Muñoz B, Moya A, Moran NA. 2003. Side-stepping secondary symbionts: widespread horizontal transfer across and beyond the Aphidoidea. *Molecular Ecology* **12**: 1061–1075.

Russell JA, Moran NA. 2006. Costs and benefits of symbiont infection in aphids: variation among symbionts and across temperatures. *Proceedings of the Royal Society B Biological Sciences* **273**: 603–610.

Sadeghi A, Van Damme EJM, Smagghe G. 2009. Evaluation of the susceptibility of the pea aphid, *Acyrtosiphon pisum*, to a selection of novel biorational insecticides using an artificial diet. *Journal of Insect Science* **9**: 1–8.

Sakurai M, Koga R, Tsuchida T, Meng X, Fukatsu T. 2005. 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* **71**: 4069–4075.

Sandström JP, Russell JA, White JP, Moran NA. 2001. Independent origins and horizontal transfer of bacterial symbionts of aphids. *Molecular Ecology* **10**: 217–228.

Schultz JC. 2002. Shared signals and the potential for phylogenetic espionage between plants and animals. *Integrative and Comparative Biology* **42**: 454–62.

Sharma Y, Davis K. 1997. The effects of ozone on antioxidant responses in plants. *Free Radical Biology and Medicine* **23**: 480–488.

Shigenobu S, Watanabe H, Hattori M, Sakaki Y, Ishikawa H. 2000. Genome sequence of the endocellular bacterial symbiont of aphids *Buchnera* sp. APS. *Nature* **407**: 81–86.

Smith CM, Boyko E V. 2007. The molecular bases of plant resistance and defense responses to aphid feeding: current status. *Entomologia Experimentalis et Applicata* **122**: 1–16.

Sousa AH, Faroni LRA, Silva GN, Guedes RNC. 2012. Ozone Toxicity and Walking Response of Populations of *Sitophilus zeamais* (Coleoptera: Curculionidae). *Journal of Economic Entomology* **105**: 2187–2195.

Tamas I, Klasson L, Canbäck B, Näslund AK, Eriksson A-S, Wernegreen JJ, Sandström JP, Moran NA, Andersson SGE. 2002. 50 Million Years of Genomic Stasis in Endosymbiotic Bacteria. *Science* **296**: 2376–2379.

Telesnicki MC, Ghera CM, Martínez-Ghera MA, Arneodo JD. 2012. Molecular identification of the secondary endosymbiont *Hamiltonella defensa* in the rose-grain aphid *Metopolophium dirhodum*. *Revista Argentina de Microbiología* **44**: 255–258.

Thaler JS, Agrawal AA, Halitschke R. 2010. Salicylate-mediated interactions between pathogens and herbivores. *Ecology* **91**: 1075–1082.

Thiele JJ, Podda M, Packer L. 1997. Tropospheric ozone: An emerging environmental stress to skin. *Biological Chemistry* **378**: 1299–1305.

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*. *Molecular Ecology* **11**: 2123–2135.

Tylianakis JM, Didham RK, Bascompte J, Wardle D a. 2008. Global change and species interactions in terrestrial ecosystems. *Ecology Letters* **11**: 1351–1363.

Vingarzan R. 2004. A review of surface ozone background levels and trends. *Atmospheric Environment* **38**: 3431–3442.

Vorburger C, Gousskov A. 2011. Only helpful when required: a longevity cost of harbouring defensive symbionts. *Journal of Evolutionary Biology* **24**: 1611–1617.

Wagner JG, Hotchkiss J a, Harkema JR. 2001. Effects of ozone and endotoxin coexposure on rat airway epithelium: potentiation of toxicant-induced alterations. *Environmental health perspectives* **109 Suppl**: 591–598.

Walling LL. 2008. Avoiding effective defenses: strategies employed by phloem-feeding insects. *Plant physiology* **146**: 859–66.

- Warrington S. 1989.** Ozone enhances the growth rate of cereal aphids. *Agriculture, Ecosystems & Environment* **26**: 65–68.
- Weldon SR, Strand MR, Oliver KM. 2013.** Phage loss and the breakdown of a defensive symbiosis in aphids. *Proceedings of the Royal Society Biological Sciences* **280**: 20122103.
- Wernegreen JJ. 2012.** Mutualism meltdown in insects: bacteria constrain thermal adaptation. *Current Opinion in Microbiology* **15**: 255–262.
- Wilkinson TL, Koga R, Fukatsu T. 2007.** 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* **73**: 1362–1366.
- Wilkinson S, Mills G, Illidge R, Davies WJ. 2012.** How is ozone pollution reducing our food supply? *Journal of Experimental Botany* **63**: 527–536.
- Wille BD, Hartman GL. 2009.** Two Species of Symbiotic Bacteria Present in the Soybean Aphid (Hemiptera: Aphididae). *Environmental Entomology* **38**: 110–115.
- Xu H, Biswas DK, Li W-D, Chen S-B, Zhang L, Jiang G-M, Li YG. 2007.** Photosynthesis and yield responses of ozone-polluted winter wheat to drought. *Photosynthetica* **45**: 582–588.
- Yagi K. 1976.** A Simple Fluorometric Assay for Lipoperoxide in Blood Plasma. *Biochemical Medicine* **15**: 212–216.
- Zarate SI, Kempema L a, Walling LL. 2007.** Silverleaf whitefly induces salicylic acid defenses and suppresses effectual jasmonic acid defenses. *Plant Physiology* **143**: 866–875.
- Zuccarini P. 2009.** Tropospheric ozone as a fungal elicitor. *Journal of Biosciences* **34**: 125–138.