



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES  
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales  
Departamento de Ecología, Genética y Evolución

# **Aspectos cualitativos y cuantitativos de la infección con *Wolbachia* en la tribu Naupactini (Coleoptera, Curculionidae) y su relación con la reproducción**

Tesis presentada para optar por el título de Doctora de la Universidad de  
Buenos Aires en el área de Ciencias Biológicas

Lic. Lucia Fernandez Goya

**Directora de Tesis:** Dra. Marcela S. Rodriguero

**Directora Adjunta de Tesis:** Dra. Viviana A. Confalonieri

**Consejero de Estudios:** Dr. Esteban R. Hasson

**Lugar de trabajo:** Grupo de Investigación en Filogenias y Filogeografía (GIFF), Departamento de Ecología, Genética y Evolución, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires.

Buenos Aires, 2023

## **Aspectos cualitativos y cuantitativos de la infección con *Wolbachia* en la tribu Naupactini (Coleoptera, Curculionidae) y su relación con la reproducción**

### Resumen

La tribu Naupactini comprende una gran diversidad de gorgojos neotropicales con alta incidencia de reproducción partenogenética en los que es frecuente la infección con *Wolbachia pipientis*. Esta bacteria aumenta su prevalencia global a través de la manipulación de la reproducción de sus hospedadores y de una elevada tasa de transferencia horizontal, lo que la convirtió en la mayor pandemia desde el origen de la vida. Existe una asociación entre la densidad de *Wolbachia*, el modo reproductivo y la bacteriota residente de los miembros de esta tribu, tal que las especies partenogenéticas presentan alta densidad de *Wolbachia* y coinfección con *Rickettsia* sp., mientras que las especies de reproducción sexual están infectadas con baja densidad o libres de la infección con *Wolbachia* y coinfectadas con *Spiroplasma* sp.

En el presente trabajo se estudió la importancia de la densidad de *Wolbachia* en la reproducción de los linajes partenogenéticos del naupactino *Pantomorus postfasciatus*. Además, se estudió la localización y densidad tisulares de dicho microorganismo y su colocalización con otros miembros dominantes de la bacteriota no solo en *P. postfasciatus*, sino también en gorgojos que se reproducen sexualmente, a saber: *Naupactus dissimulator* y *Naupactus xanthographus*. Finalmente, se identificaron posibles genes candidatos de *Wolbachia* que podrían estar involucrados en la transición hacia la partenogénesis y también posibles agentes de transferencia horizontal de este endosimbionte.

A partir de una serie de experimentos de cura con antibiótico y cuantificaciones relativas mediante PCR en tiempo real, se estableció que altas densidades de *Wolbachia* y/o *Rickettsia* sp. resultan indispensables para la reproducción de los linajes partenogenéticos de *P. postfasciatus*. Asimismo, se observó que la distribución de *Wolbachia* es ubicua en los tejidos de sus hospedadores, tanto en especies infectadas con alta densidad (reproducción partenogenética) como en especies infectadas con baja densidad (reproducción sexual) y co-localiza con altas densidades de las bacterias *Rickettsia* sp. o *Spiroplasma* sp. en toda su distribución, respectivamente.

Utilizando técnicas de secuenciación de próxima generación se obtuvieron las secuencias genómicas de dos cepas de *Wolbachia* asociadas a gorgojos partenogenéticos y fueron comparadas con cepas inductoras de la partenogénesis, identificándose 36 genes propios de cepas asociadas a hospedadores diplo-diploides con reproducción partenogenética. Finalmente, el hallazgo de larvas en la cavidad abdominal de diversas especies de Naupactini condujo a la identificación de varios parasitoides a través del análisis del código de barras del ADN (DNA *barcoding*). Dos casos pertenecieron a la familia Tachinidae (Diptera) y otro a la familia Braconidae (Hymenoptera); en este último se verificó la infección con la misma cepa de *Wolbachia* que su hospedador, por lo que se hipotetiza que algunos parasitoides podrían actuar como vehículos de la transmisión horizontal.

Palabras clave: *Wolbachia* – gorgojos – partenogénesis – carga bacteriana – endosimbiontes – transferencia horizontal

## **Qualitative and quantitative aspects of *Wolbachia* infection in the Naupactini tribe (Coleoptera, Curculionidae) and its relationship with reproduction**

### Abstract

The Naupactini tribe harbours a great diversity of Neotropical weevils with a high incidence of parthenogenetic reproduction in which infection with *Wolbachia pipientis* is frequent. This bacterium that increases its prevalence by manipulating the reproduction of its hosts, and its high rate of horizontal transfer has made it the biggest pandemic since the origin of life. In this group of insects, there is an association between *Wolbachia* density, reproductive mode, and resident bacteriota, such that parthenogenetic species exhibit high *Wolbachia* density and coinfection with *Rickettsia* sp., while sexually reproducing species are infected with low density or free of infection with *Wolbachia* and coinfecting with *Spiroplasma* sp.

The main focus of this work was to study the importance of *Wolbachia* density in the reproduction of the parthenogenetic lineages of the naupactine weevil *Pantomorus postfasciatus*. In addition, the tissue localization and density of this microorganism and its colocalization with other dominant members of the bacteriota were studied not only in *P. postfasciatus* but also in sexually reproducing weevils, namely: *Naupactus dissimulator* and *Naupactus xanthographus*. Finally, possible candidate genes involved in the transition to *Wolbachia*-mediated parthenogenesis and possible agents of horizontal transfer of this endosymbiont were identified.

Through a series of curing experiments with antibiotic and relative quantifications by real-time PCR, it was established that high densities of *Wolbachia* and/or *Rickettsia* sp. are essential for the reproduction of parthenogenetic lineages of *P. postfasciatus*. Likewise, it was observed that *Wolbachia* is ubiquitously distributed in the tissues of its hosts, both in species infected with high density (parthenogenetic reproduction) and in species infected with low density (sexual reproduction) and co-localizes with high densities of *Rickettsia* sp. or *Spiroplasma* sp. in all tissues analyzed, respectively.

Using next-generation sequencing techniques, the genomic sequences of two *Wolbachia* strains associated with parthenogenetic weevils were obtained and compared to other parthenogenesis-related strains. This allowed the identification of 36 genes exclusively shared between strains associated with parthenogenetic diplo-diploid hosts. Finally, the discovery of larvae in the abdominal cavity of various Naupactini species led to the identification of several parasitoids through DNA barcoding analysis. Two cases belonged to the Tachinidae family (Diptera) and another to the Braconidae family (Hymenoptera); in the latter, infection with the same *Wolbachia* strain as its host was verified, leading to the hypothesis that some parasitoids may act as vehicles for horizontal transmission.

**Keywords:** *Wolbachia* – weevils – parthenogenesis – bacterial load – endosymbionts – horizontal transfer

*A Marce*

## Agradecimientos

La realización de esta tesis fue para mí una experiencia transformadora. Estos cinco años fueron toda una aventura, una montaña rusa, un viaje alucinante. Tuve la suerte de no recorrer este camino en soledad, de haber encontrado apoyo y contención donde quiera que fui. Son muchas las personas que contribuyeron con la realización de este trabajo y a todas ellas me gustaría agradecer.

Quiero comenzar por el agradecimiento más difícil de escribir, porque las palabras no me alcanzan e invariablemente me vence la emoción. Mi agradecimiento supremo a Marcela Rodruigero, directora, mentora y ejemplo. Por haber fomentado una relación donde el respeto y el cuidado primaron desde el primer día. Su reconocimiento de mis méritos inspiró la confianza y seguridad en mí misma. Sus críticas frente a mis desaciertos fueron siempre constructivas, con miras al aprendizaje y desde la empatía, creando un espacio de trabajo sin miedo. Le agradezco infinitamente la compañía. En los triunfos pero especialmente en la adversidad, nunca estuve sola. La dedicación. La dedicación. La dedicación. No puedo repetirlo lo suficiente. La cantidad de tiempo y esfuerzo que me dedicó es uno de los regalos más hermosos que recibí. Porque es un arte hacer ciencia. Más aún formar gente. Y Marce es artista. Gracias por inspirarme. Por enseñarme las sutilezas de navegar en el ámbito académico; por mostrarme los hilos invisibles y un panorama honesto de la realidad. Por afilar el lápiz y librar batallas constantes con la calculadora para exprimir los fondos disponibles. Por todos los momentos juntas, los muestreos, los experimentos, el viaje a Santa Fé, los debates, las charlas, los cafés con leche, las correcciones, las sugerencias, los mensajes, las risas, los abrazos, la contención. Por haber guiado mi crecimiento y la realización de esta tesis a buen puerto.

A Viviana Confalonieri le agradezco la confianza. La empatía, el cariño y la libertad. Uno de los recuerdos más lindos que me llevo es trabajar codo a codo con ella en la mesada, porque a Vivi le encanta transmitir sus saberes y aún se arremanga para participar activamente de la formación de sus becarixs. Le agradezco enormemente su compromiso inquebrantable con mi formación y con este trabajo final.

A Luciano le agradezco el apoyo y la ternura. Los mimos y las risas. Le agradezco que sea el lugar seguro donde puedo ser. La paciencia y la templanza. Y el amor, por sobre todo le agradezco el amor.

A mi familia toda. A mi mamá y a mi papá por el apoyo incondicional, por la crianza y por el ejemplo. A mis hermanas que son sostén y aire fresco. A mi familia gesellina que siempre está cerca, que siempre está pendiente. A Diana y Ale que me adoptaron sin reparos y me llenan de amor. A Le y a Mau por el cariño y los abrazos. A Yaya, Chiqui y Ruben, por devolverme el privilegio de tener abuelxs. A Moni y a Pedro, mi segunda familia. A lxs que ya se fueron, la Chocha, la Oti, el Cholo, Silvia y Moma, porque viven en mi memoria y su recuerdo siempre me da fuerzas para seguir adelante.

A mis varios grupos de amigxs, pero en especial a lxs Tóxicxs porque son cable a tierra. A Flopina por recordarme siempre lo importante, a Juan que rema conmigo y a Belu por su amistad sincera.

A la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales por ser mi segundo hogar hace más de una década y particularmente al Departamento de Ecología, Genética y Evolución por concentrar a las personas con que compartí el día a día y que me brindaron apoyo, en lo profesional y en lo personal, a saber:

Al Grupo de Investigación en Filogenias y Filogeografía, lleno de gente del bien. En especial a Francisca Cunha Almeida, con quien más compartí la cotidianeidad y con ello incontables viajes en auto, almuerzos y abrazos; a Diego Caraballo y nuestra conexión cósmica, por los consejos, las sugerencias y la contención. También agradecer a Noelia Guzmán, Daniela Monti y Emiliano Muschetto por las charlas divertidas, las charlas serias y la noche de los museos.

A Lucia da Cruz Cabral le debo mis primeros pasos con la qPCR, su guía paciente, sus explicaciones detalladas. También le agradezco su asistencia en los muestreos y con los experimentos, el trabajo en equipo, aún a la distancia.

A Alejandra Scannapieco le agradezco, en primer lugar, el apoyo con las qPCRs, su experiencia y guía fueron fundamentales mientras aprendía la técnica y las sutilezas del diseño y análisis de datos. El haber compartido el viaje de campaña a Santa Fé. Las horas de ruta, las horas de sol y las toneladas de polvo mientras buscábamos gorgojos. El interés en esta línea de trabajo y las ganas de colaborar.

A Florencia Fourastié le agradezco profundamente la compañía y la amistad. Las llamadas, las risas, la confianza y la empatía. Gracias a Flor conocí la lupa más magnífica que existe, dos veces. Su ayuda con las láminas que adornan esta tesis fue invaluable y le agradezco el amor que puso en cada una, para que se luzca el trabajo, para que se refleje el esfuerzo.

A Alexandra Gottlieb le quiero agradecer su energía contagiosa que siempre me saca sonrisas. En lo profesional, le agradezco profundamente su mirada atenta que identificó el cantero mágico de Coghlan, que proveyó todas las hembras de los primeros experimentos, los canteros donde habita la población de Floresta. Sin sus aportes no sé de dónde hubiéramos sacado las bichas para esta tesis. También que me prestó la cabina con luz UV y la centrífuga manual cada vez que las necesité.

Quiero expresar mi profundo agradecimiento a Juan Rodruiguero, el colaborador más joven que tiene esta tesis. Por su paciencia los días de muestreo, por el entusiasmo, por sus ojos agudos y su trato dulce. Por la curiosidad y el respeto por la vida de criaturas tan diferentes. A él le debo el haber logrado obtener tamaños muestrales adecuados cuando el panorama no era optimista.

A Pablo Colombo le agradezco su predisposición para ir a colectar, su genuino interés en los progresos de la tesis y la simpatía.

Al personal de apoyo del EGE-IEGEB. A Xoana Granata por la compañía, por prestarme el espacio, por compartir consejos y truquitos de mesada. A Lucía Babino por su asistencia fundamental en estadística. A David Kachanovsky por la voluntad y las explicaciones sobre cómo funcionan las computadoras. A Cecilia Sosa por pelearse con la burocracia del Gobierno de la Ciudad por mí.

A Mabel Salinas y especialmente a Graciela Chiappini, por responder los veinte mil mails con dudas y preguntas, por cuidar los estados de los trámites para que todo salga a tiempo.

Agradezco inmensamente la colaboración brindada por muchas otras personas fuera del DEGE.

El Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA) resultó ser un reservorio de gratas experiencias e intercambios enriquecedores con los excelentes profesionales que alberga. A Marisa Farber y Pablo Vera les agradezco enormemente su asistencia con los análisis genómicos realizados, su paciencia y excelente predisposición. Claudia Conte proporcionó los oligonucleótidos que permitieron detectar a más endosimbiontes de gorgojos y ampliaron el

alcance de este trabajo. Irina Muntaabski compartió conmigo sus protocolos modificados de extracción de ARN y Romina Russo compartió conmigo trabajo de mesada. Ambas me dispensaron el mejor trato y charlas amenas.

A Luis Calcaterra de la Fundación para el Estudio de Especies Invasivas (FuEDEI) que nos permitió utilizar la cámara de cría durante el primer verano de trabajo experimental, y a Roque que me recibía con alegría y me hacía olvidar, por lo menos un ratito, que hacía mucho calor.

A Analía Lanteri le agradezco el cuidado con que leyó el manuscrito del trabajo que publicamos, los comentarios valiosos y el conocimiento experto sin reservas compartido.

A Andrea Patriarca por habilitarme un espacio en su laboratorio para usar una de sus cámaras de cría. A Diana Ramírez y María Luisa Maldonado, que me recibieron con alegría.

A Mónica Kotler, por el cariño inmenso que siempre me profesó, por estar cerca. En lo práctico, a ella y a Roxana Gorojod por permitirme usar el autoclave en un momento clave.

A Alejandra Castañeda, por explicarme el uso de la Savant y hacerse un tiempo para ayudarme con mis muestras.

A Tatiana Di Gennaro por ser un rinconcito inesperado donde compartir los pormenores de la vida. También le agradezco el posibilitarme conseguir la tan necesaria tetraciclina todos los veranos.

A Alexandra Elbakyan le agradezco que haya transformado sus creencias en acciones para hacer que el conocimiento científico sea accesible para todos. No podría haber escrito esta tesis sin Sci-Hub.

Finalmente, la realización de esta tesis no hubiera sido posible sin la beca doctoral otorgada por la Universidad de Buenos Aires o los fondos otorgados por esta institución y por la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica a Marcela Rodriguero, Viviana Confalonieri y Analía Lanteri.

# Contenidos

1. Introducción general .....	1
1.1 Partenogénesis: La concepción inmaculada .....	1
1.2 <i>Wolbachia pipientis</i> Sancte Spiritus.....	7
1.3 La tribu Naupactini: el hogar de las madres vírgenes.....	12
1.4 Especies de Naupactini involucradas en este trabajo .....	18
1.5 Objetivos e Hipótesis.....	21
2. Estudio de la relación entre la densidad de <i>Wolbachia pipientis</i> y la reproducción en linajes partenogenéticos de <i>Pantomorus postfasciatus</i> . .....	24
2.1. Introducción.....	24
2.1.1 Antecedentes de partenogénesis infecciosa .....	24
2.1.2 <i>Wolbachia</i> en la tribu Naupactini .....	27
2.1.3 Las bacterias del género <i>Rickettsia</i> .....	28
2.1.4 Objetivos .....	30
2.2 Materiales y Métodos .....	31
2.2.1 Experimentos de cura con antibiótico.....	31
2.2.1.1. Material Biológico.....	31
2.2.1.2 Desarrollo del experimento .....	34
2.2.2 Cuantificación relativa de la densidad bacteriana .....	36
2.2.2.1 Extracción de ADN .....	36
2.2.2.2 Principios de la PCR en tiempo real.....	37
2.2.2.3 Procedimiento .....	40
2.2.2.4 Cuantificación relativa .....	43
2.2.3 Análisis estadísticos y confección de figuras.....	44
2.2.4 Caracterización de la población de referencia para el estudio de la dinámica de la densidad bacteriana a través de experimentos de cura con antibiótico .....	44
2.2.4.1 Efecto de la longevidad sobre la densidad de <i>Wolbachia</i> .....	45
2.2.4.2 Susceptibilidad de <i>Rickettsia</i> sp. al tratamiento con tetraciclina.....	45
2.2.4.2.1 Puesta a punto.....	45
2.2.4.2.2 Análisis de la susceptibilidad de <i>Rickettsia</i> sp. al tratamiento con tetraciclina.....	48
2.2.4.3 Efecto de la tetraciclina sobre <i>Wolbachia</i> y <i>Rickettsia</i> sp. en distintos tejidos de <i>P. postfasciatus</i> .....	49



2.2.4.4 Comparación de las densidades relativas de <i>Wolbachia</i> y <i>Rickettsia</i> sp. en diferentes poblaciones naturales.....	51
2.2.5 Experimentos críticos desarrollados.....	52
2.2.5.1 Experimento 1.....	53
2.2.5.1.1 Análisis estadístico .....	55
2.2.5.2 Experimento 2.....	57
2.2.5.3 Experimento 3.....	57
2.2.5.3.1 Desarrollo del experimento .....	59
2.2.5.4 Experimento 4.....	60
2.2.6 Controles experimentales .....	62
2.2.6.1 Evaluación de los efectos de la tetraciclina sobre la biología de <i>P. postfasciatus</i> (efectos secundarios).....	63
2.2.6.2 Experimento de ingesta .....	65
2.2.7 Contraprueba: ¿Recuperan las hembras partenogenéticas la capacidad de reproducirse sexualmente?.....	66
2.3. Resultados.....	68
2.3.1 Caracterización de la población de referencia para el estudio de la dinámica de la densidad bacteriana a través de experimentos de cura con antibiótico .....	69
2.3.1.1 Efecto de la longevidad sobre la densidad de <i>Wolbachia</i> .....	69
2.3.1.2 Susceptibilidad de <i>Rickettsia</i> sp. al tratamiento con tetraciclina.....	70
2.3.1.3 Efecto de la tetraciclina sobre <i>Wolbachia</i> y <i>Rickettsia</i> sp. en distintos tejidos de <i>P. postfasciatus</i> .....	70
2.3.1.4 Comparación de las densidades relativas de <i>Wolbachia</i> y <i>Rickettsia</i> sp. en diferentes poblaciones naturales.....	72
2.3.2 Experimentos críticos desarrollados.....	73
2.3.2.1 Experimento 1.....	73
2.3.2.2 Experimento 2.....	77
2.3.2.3 Experimento 3.....	77
2.3.2.4 Experimento 4.....	78
2.3.3 Controles experimentales .....	82
2.3.3.1 Evaluación de los efectos de la tetraciclina sobre la biología de <i>P. postfasciatus</i> (efectos secundarios).....	82
2.3.3.2 Experimento de ingesta .....	83
2.3.4 Contraprueba: ¿Recuperan las hembras partenogenéticas la capacidad de reproducirse sexualmente?.....	84

2.4	Discusión .....	86
2.4.1	Caracterización de la población de referencia para el estudio de la dinámica de la densidad bacteriana a través de experimentos de cura con antibiótico .....	86
2.4.2	Experimentos críticos desarrollados.....	89
2.4.2.1	Dificultades y consideraciones necesarias para un diseño experimental adecuado .....	93
2.4.3	Evaluación de los efectos de la tetraciclina sobre la biología de <i>P. postfasciatus</i> (efectos secundarios) y de los efectos sobre la palatabilidad del alimento .....	95
2.4.4	Contraprueba: ¿Recuperan las hembras partenogenéticas la capacidad de reproducirse sexualmente?.....	95
<b>3.</b>	<b>Distribución y colocalización de simbioses en dos especies de Naupactini .....</b>	<b>100</b>
3.1	Introducción.....	100
3.1.1	El género <i>Spiroplasma</i> .....	102
3.1.2	Coexistencia de simbioses en la tribu Naupactini.....	103
3.2	Materiales y Métodos .....	105
3.2.1	Obtención de muestras y extracción de ADN .....	105
3.2.2	Cuantificación de <i>Wolbachia</i> .....	105
3.2.2.1	PCR de punto final de <i>Wolbachia</i> .....	106
3.2.2.2	qPCR de <i>Wolbachia</i> .....	107
3.2.3	Amplificación de <i>Spiroplasma</i> spp. ....	107
3.2.3.1	Puesta a punto de la qPCR de <i>Spiroplasma</i> spp.....	108
3.2.4	qPCR de los simbioses en distintos tejidos.....	110
3.2.5	Análisis estadístico.....	111
3.3	Resultados.....	112
3.4	Discusión .....	115
<b>4.</b>	<b>Análisis genómico de wNau1 y wNau5, dos cepas asociadas con la partenogénesis en la tribu Naupactini .....</b>	<b>120</b>
4.1	Introducción.....	120
4.2	Materiales y métodos.....	123
4.2.1	Colecta y disección del material .....	123
4.2.2	Extracción de ADN, cuantificación de la carga bacteriana tejido-específica y obtención de las secuencias.....	124
4.2.3	Análisis bioinformáticos .....	127
4.2.3.1	Control de calidad.....	127
4.2.3.2	Ensamblado.....	127

4.2.3.3 Análisis comparativos .....	129
4.2.3.4 Anotación e identificación de grupos ortólogos .....	130
4.3 Resultados .....	130
4.3.1 Control de calidad de las secuencias obtenidas .....	130
4.3.2 Ensamblado.....	131
4.3.3 Análisis comparativos .....	133
4.3.4 Anotación e identificación de grupos ortólogos .....	134
4.4 Discusión .....	135
<b>5. Interacciones hospedador-parasitoide reportadas para <i>Naupactus cervinus</i> y <i>Naupactus dissimulator</i> y su posible rol en la transferencia horizontal de <i>Wolbachia</i></b>	<b>143</b>
5.1 Introducción.....	143
5.2 Materiales y Métodos .....	148
5.2.1 Colecta y disección del material, extracción del ADN y obtención de las secuencias .....	148
5.2.2 Reconstrucción filogenética.....	149
5.3 Resultados.....	153
5.3.1 Parasitoide de <i>Naupactus dissimulator</i> .....	153
5.3.2 Parasitoides de <i>Naupactus cervinus</i> .....	158
5.4 Discusión .....	164
5.4.1 Consideraciones finales.....	170
<b>Conclusiones generales .....</b>	<b>171</b>
<b>Perspectivas futuras .....</b>	<b>174</b>
<b>Anexos .....</b>	<b>177</b>
Anexo I: Soluciones utilizadas en tareas de rutina de laboratorio.....	177
Anexo II: Verificación de los supuestos de los análisis estadísticos llevados a cabo..	179
Anexo III: Secuencias nucleotídicas producidas en el presente trabajo de tesis .....	193
Anexo IV: Ortogrupos compartidos por las distintas cepas de <i>Wolbachia</i> utilizadas para los análisis genómico comparativos. ....	194
<b>Referencias .....</b>	<b>196</b>

---

# 1. INTRODUCCIÓN GENERAL

---

La reproducción es el proceso que garantiza la perpetuidad de la vida tal como la conocemos. Es el motor que impulsa las relaciones entre los organismos. A lo largo de la historia de la vida, han aparecido numerosos mecanismos que permiten que los organismos se perpetúen bajo las circunstancias ecológicas más variadas y no es casual que en los insectos, uno de los grupos más diversos y exitosos, se presente un gran abanico de estrategias reproductivas que comprenden desde la reproducción sexual hasta múltiples formas de partenogénesis. Esta multiplicidad les permite producir una cantidad extraordinaria de descendientes que explican su éxito y abundancia a pesar de sus cortos ciclos de vida (Kumar, 2022).

## 1.1 Partenogénesis: La concepción inmaculada

La partenogénesis se refiere a la reproducción a partir de oocitos no fecundados y su descubrimiento y estudio se remonta a la época de Aristóteles. El gran filósofo efectuó las primeras observaciones de este fenómeno en abejas, aunque sus reflexiones no fueron revisitadas y formalizadas hasta 1845, cuando Jan Dzierzon, sacerdote y apicultor polaco, describió cómo las reinas y obreras eran producto de la reproducción sexual, mientras que los zánganos se desarrollaban a partir de huevos no fecundados (Dzierzon, 1845). Si bien entre 1650-1750 otros autores realizaron observaciones similares en la polilla *Orgyia gonostigma* (Scopoli 1763) (Goedart, 1667) y en áfidos (Bonnet, 1745), se puede considerar que el trabajo de Dzierzon marcó el inicio formal del estudio de la partenogénesis, poniendo en jaque a la reproducción sexual como la única estrategia reproductiva en animales (Phillips, 1903; Mendelsohn et al., 2001).

Desde ese momento hasta la actualidad, la comunidad científica ha debatido concienzudamente las implicancias de este fenómeno y ha necesitado reestructurar las definiciones que hasta entonces utilizaba. ¿De qué hablamos cuando hablamos de partenogénesis? En primer lugar, hablamos de unisexualidad. Es importante no confundir partenogénesis con reproducción asexual ya que ésta última no involucra la formación de gametas, mientras que en la partenogénesis la descendencia surge como consecuencia de un proceso de gametogénesis (Boyden, 1950). Hablar de unisexualidad es más apropiado, considerando que los individuos partenogenéticos cuentan con una identidad sexual definida y son capaces de producir gametas (Rodríguez, 2022).

La partenogénesis puede caracterizarse en base a distintos criterios, aunque a grandes rasgos podemos hacer una primera distinción basada en el sexo de la progenie: **arrenotoquia**, si los oocitos se desarrollan como machos haploides (propia de los sistemas de determinación del sexo por haplodiploidía<sup>1</sup>) y **telitoquia**, cuando la progenie está constituida por hembras diploides. La partenogénesis telitóquica es generalmente considerada como partenogénesis *sensu stricto* (Vershina & Kuznetsova, 2016) y a ella nos referiremos con ese término de aquí en adelante. A su vez, la telitoquia puede ser meiótica o automéctica, cuando ocurre la meiosis y la ploidía se restaura a partir de la fusión de dos productos meióticos, o bien ameiótica o apoméctica, en la cual las gametas no sufren una reducción meiótica y la progenie se produce de manera clonal. Una descripción exhaustiva de los diferentes tipos de partenogénesis y mecanismos involucrados puede encontrarse en Rodríguez (2022).

---

<sup>1</sup> En este sistema, el sexo está determinado por el número de conjuntos cromosómicos que tiene un individuo. Los machos se desarrollan a partir de oocitos no fecundados y son haploides (su número cromosómico es  $n$ ). Las hembras son producto de la unión de un oocito y un espermatozoide y son diploides ( $2n$ ).

La sexualidad y la unisexualidad son polos opuestos de un continuo que abarca las distintas formas en que los organismos se reproducen. Las ventajas de cada modo reproductivo constituyen, a grandes rasgos, las desventajas de su contraparte. Si el doble costo de la sexualidad lo constituyen los machos (porque representan el 50% de la progenie y no son capaces de producir descendencia sin el concurso del sexo opuesto) (Maynard Smith, 1978), la partenogénesis cuenta con una doble ventaja en comparación. Sin embargo, a pesar de sus costos, la reproducción sexual está ampliamente distribuida en la naturaleza. Así, dos de las principales teorías que permiten explicar la paradoja de la sexualidad, es decir, por qué un sistema tan costoso es tan ubicuo, también permiten entrever las principales desventajas de la unisexualidad, y son el trinquete de Muller (“*Muller’s ratchet*”) y la hipótesis de la Reina Roja (“*The Red Queen Hypothesis*”).

El trabajo de Muller sobre mutagénesis lo llevó a comparar el mecanismo de acumulación de mutaciones en linajes donde no ocurre la recombinación genética con un trinquete, es decir, un mecanismo unidireccional e irreversible (Muller, 1964). Este fenómeno lleva a la reducción drástica del tamaño poblacional debido al colapso genético (“*mutational meltdown*”) y se da de manera acelerada en poblaciones originalmente pequeñas (Gabriel et al., 1993).

A su vez, la hipótesis de la Reina Roja, desarrollada por Van Valen (1973), ofrece una explicación para la probabilidad de extinción constante dentro de un grupo taxonómico, aludiendo que cada incremento en el éxito reproductivo (“*fitness*”) de una unidad evolutiva se contrarresta con pérdidas en el éxito reproductivo de otras, manteniendo el balance (Van Valen, 1977). Este razonamiento luego fue tomado por Bell (1982) para explicar la tensa dinámica de coevolución entre hospedadores y parásitos, y de esta manera explicar la ventaja que tenían los linajes sexuales por sobre aquellos donde no había recombinación (Martin, 2015; Rodríguez, 2022). La recombinación es

justamente lo que permite a los linajes sexuales producir progenie más diversa y genotipos raros que puedan desarrollar resistencia contra los parásitos, mientras que los linajes unisexuales no pueden generar estos genotipos novedosos y son proclives a la extinción (Martin, 2015).

A pesar de estas desventajas, la partenogénesis ha demostrado ser más ventajosa que la reproducción sexual bajo condiciones particulares y a corto plazo. Lo curioso (o no) es que todas las condiciones correlacionan entre sí. La unisexualidad es más frecuente en linajes considerados plaga (Stenberg & Lundmark, 2004; Hoffmann et al., 2008); a su vez, tanto la unisexualidad como la condición de especie plaga también están asociadas con amplios rangos geográficos, ambientes estables y poliploidía. Todas estas condiciones subsanan de algún modo y por un corto tiempo (en términos evolutivos) las desventajas discutidas que presenta la unisexualidad a largo plazo.

En ambientes poco favorables (e.g., altas latitudes, islas, desiertos, ambientes marginales, baja densidad biótica) la partenogénesis permite una rápida colonización gracias a que la perpetuación de la especie no depende de que las hembras encuentren un macho y entonces pueden aprovechar la totalidad de los recursos disponibles, además de que potencialmente una única hembra podría fundar una población estable (Roughgarden, 1972; Vrijenhoek, 1998; Kearney, 2005; Martin, 2015). Asimismo, colonizar áreas novedosas más allá del rango ancestral de los linajes sexuales implica limitar las interacciones bióticas con enemigos naturales, por lo que en estos ambientes los linajes partenogenéticos podrían escapar del efecto de la Reina Roja (Glesener & Tilman, 1978; Martin, 2015).

Por otra parte, los ambientes estables y la poliploidía, rasgo muy común en especies partenogenéticas, contrarrestan las desventajas de la falta de recombinación. En un

ambiente estable la recombinación que viene de la mano de la sexualidad podría “romper” el desequilibrio de ligamiento entre las variantes alélicas que conforman un genotipo exitoso, mientras que la unisexualidad se encargaría de perpetuar dichas combinaciones (Glesener & Tilman, 1978; Vrijenhoek, 1979). La acumulación de mutaciones deletéreas seguiría siendo problemática, pero la poliploidía permite enmascarar estas mutaciones, de modo que los linajes unisexuales perduren más tiempo (Stenberg & Lundmark, 2004; Lundmark & Saura, 2006). Además, estudios de asociación entre el modo reproductivo y la acumulación de mutaciones han producido resultados mixtos (Tvedte et al., 2019), por lo que aún queda un largo camino por recorrer, experimentalmente, para evaluar el alcance de las teorías propuestas.

Si bien la reproducción por partenogénesis no es muy frecuente, es un fenómeno sumamente extendido en insectos (Normak, 2014; Vershinina & Kuznetsova, 2016; Gokhman & Kuznetsova, 2018) y que ha surgido de manera independiente en múltiples ocasiones (Normak, 2003; Van Der Kooi et al., 2017). Su estudio desde el punto de vista filogenético permite observar que es una característica asociada a nodos terminales (“*twiggy distribution*”) (Schwander & Crespi, 2009; Ng & Smith, 2014). Esta distribución es precisamente uno de los principales argumentos para justificar que la unisexualidad en animales es un fenómeno de corta duración que representa un “callejón sin salida” para la evolución (Maynard Smith 1978; Lynch et al., 1993; Simon et al., 2003). La concepción de que los linajes unisexuales no tienen futuro a largo plazo está dada por las desventajas mencionadas previamente; sin embargo, el patrón filogenético asociado con la unisexualidad puede ser explicado por otros motivos que no necesariamente impliquen altas tasas de extinción (Schwander & Crespi, 2009). Una opción es que la tasa de transición de la sexualidad a la unisexualidad sea baja, lo que a su vez podría explicarse por las importantes barreras a nivel citológico y fisiológico que requieren ser sorteadas



para garantizar el mantenimiento de la ploidía y el desarrollo de oocitos sin fertilización (Engelstädter, 2008; Schwander & Crespi, 2009; Galis & van Alphen 2020; Rodrigoero, 2022).

La partenogénesis puede ser de origen espontáneo, híbrido, contagioso o infeccioso (Normark, 2003; Simon et al., 2003; Martin, 2015; pero ver Rodrigoero, 2022). En el primer caso, surge a partir de mutaciones que devienen en el desarrollo espontáneo de oocitos no fertilizados. La hibridación interespecífica es la ruta hacia la partenogénesis más documentada en animales, aunque los mecanismos que conducen a la unisexualidad producto de la hibridación no son claros. En vertebrados se ha propuesto que la hibridación conduce a la desregulación de la meiosis y esterilidad del híbrido, creando oportunidades para el surgimiento y fijación de mecanismos citológicos que garanticen la producción de gametas y restauren o mantengan la ploidía (Vrijenhoek, 1998). El origen contagioso de la partenogénesis supone el origen de linajes unisexuales secundarios producto del aislamiento reproductivo incompleto entre linajes partenogenéticos y sexuales.

Particularmente, en esta tesis resulta de fundamental importancia el origen infeccioso de la partenogénesis, que hace referencia a la adquisición de este modo reproductivo a partir de la infección con un endosimbionte de transmisión maternal. Todos los casos reportados de partenogénesis inducida por endosimbiontes son ocasionados por bacterias de los géneros *Wolbachia*, *Rickettsia* o *Cardinium* (Koivisto & Braig 2003; Ma & Schwander 2017; Van Der Kooi et al., 2017; Rodrigoero, 2022). Actualmente, los casos confirmados de partenogénesis inducida por endosimbiontes se verifican en organismos con determinación de sexo haplo-diploide, como insectos de los órdenes Hymenoptera y Thysanoptera y ácaros del género *Bryobia* (Van Der Kooi et al., 2017); sin embargo, hay evidencia para sospechar que este fenómeno también podría ocurrir en organismos diplo-

diploides como el colémbolo *Folsomia candida* (Willem 1902) (Hafer & Pike, 2010), la mariquita *Nephus voeltzkowi* (Weise 1910) (Magro et al., 2020), el gorgojo del agua del arroz *Lissorhoptrus oryzophilus* (Kuschel 1951) (Chen et al., 2012) y gorgojos de la tribu Naupactini (Rodríguez, 2009; Rodríguez et al., 2010a, 2021).

Las bacterias del género *Wolbachia* parecen ser las responsables más frecuentes de la partenogénesis inducida por endosimbiontes (Ma & Schwander, 2017). ¿Cómo logran estas bacterias desencadenar la maternidad en hembras vírgenes? La mayoría de los casos reportados establece que *Wolbachia* provoca la duplicación genómica dentro de los oocitos de especies haplo-diploides (“*gamete duplication*”) (Stouthamer, 2009; Ma & Schwander, 2017), convirtiendo a la partenogénesis arrenotóxica en telitóxica. Los mecanismos subyacentes que garantizan estas alteraciones continúan siendo el objeto de estudio de numerosas investigaciones (Newton & Slatko, 2019; Wu et al., 2020).

## 1.2 *Wolbachia pipientis* Sancte Spiritus

*Wolbachia pipientis* (Hertig 1936) son bacterias endosimbióticas Gram-negativas que se transmiten por vía maternal. Pertenecen a la familia Anaplasmataceae del orden Rickettsiales y, como son la única especie del género, suelen ser referidas únicamente como *Wolbachia*. Llamadas “*Rickettsia* de *Culex pipiens*” desde su descubrimiento (Hertig & Wolbach, 1924) hasta su nombramiento oficial (Hertig, 1936), estas bacterias fueron primeramente observadas en las gónadas del mosquito *Culex pipiens* (Linnaeus 1758) (Hertig & Wolbach, 1924). No fue hasta la década del ‘70 que se asoció a esta bacteria con la incompatibilidad reproductiva observada entre machos infectados y hembras no infectadas de esta especie (Yen & Barr, 1971, 1973), y luego pasarían unos años más hasta que se empezara a reportar la presencia de *Wolbachia* en una amplia gama de organismos, incluyendo artrópodos y nematodos (Kellen et al., 1981; Hsiao & Hsiao, 1985; Richardson et al., 1987; Binnington & Hoffmann, 1989). Dada la imposibilidad de

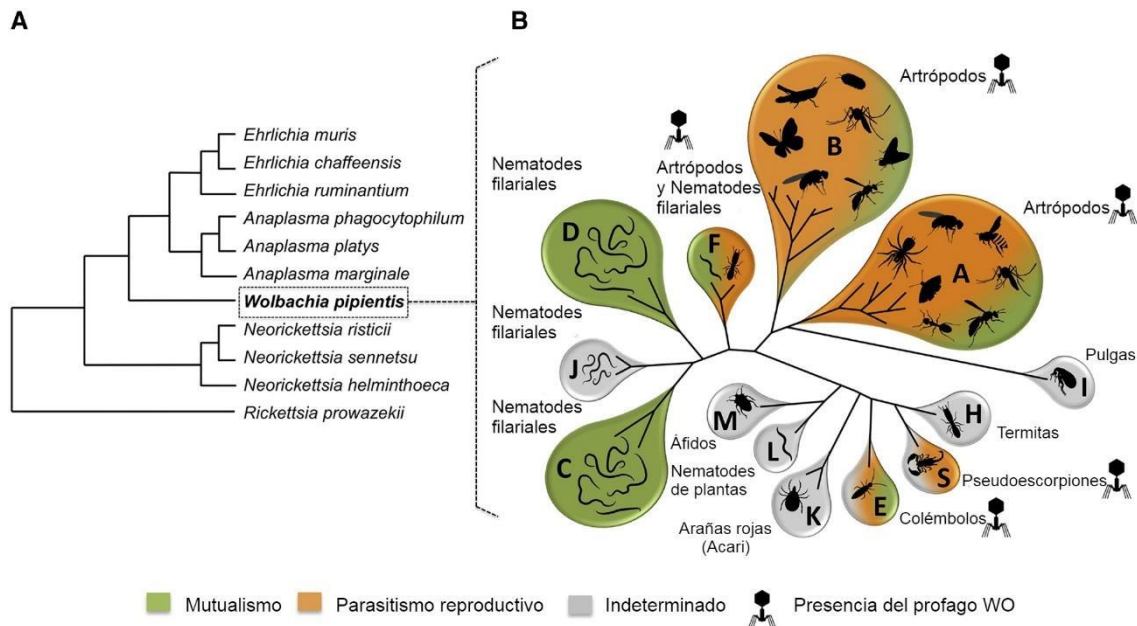
cultivar esta bacteria, el advenimiento de técnicas moleculares como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR por sus siglas en inglés), que permite la detección del ADN de la bacteria en una muestra, ha producido que el trabajo realizado en torno a *Wolbachia* se incremente exponencialmente.

Las bacterias del orden Rickettsiales constituyen un grupo diverso de bacterias intracelulares que sostienen relaciones parasitarias, mutualistas y comensales con sus hospedadores. Los géneros relacionados *Anaplasma*, *Ehrlichia* y *Rickettsia* (Figura 1.1 A), típicamente tienen ciclos de vida que incluyen un vector invertebrado y un hospedador mamífero, aunque también se encuentran especies estrictamente asociadas a invertebrados (Werren et al., 2008). A diferencia de los miembros de estos otros géneros, hasta el momento no se ha registrado la infección con *Wolbachia* en vertebrados.

Actualmente, la diversidad genética de *Wolbachia* puede clasificarse en al menos 17 supergrupos<sup>2</sup> posibles, cada uno integrado por numerosas cepas, originalmente delimitados en base a análisis filogenéticos a partir de los genes *16S ARNr* (Figura 1.1 B), que codifica para la subunidad menor del ribosoma de procariotas, *ftsZ* (proteína del ciclo celular) y *wsp* (proteína de superficie de *Wolbachia*) (Kaur et al., 2021). Luego, Baldo et al., (2006) idearon el sistema de tipificación MLST por sus siglas en inglés (“*Multi-Locus Sequence Typing*”), basado en el análisis de cinco genes conservados (*ftsZ*, *gatB*, *coxA*, *hcpA*, y *fbpA*) que permite una discriminación más robusta que la basada en un único marcador y estandarizada para la comunidad científica.

---

<sup>2</sup> Los principales linajes evolutivos de *Wolbachia* se denominan "supergrupos" y difieren notablemente en la distribución y biología de sus hospedadores (Gerth et al., 2014). Fueron originalmente descritos por Werren et al., (1995b) y bautizados como tales por Zhou et al., (1998) a partir de estudios filogenéticos utilizando los genes *16S ARNr* y *ftsZ*, y *wsp*, respectivamente.

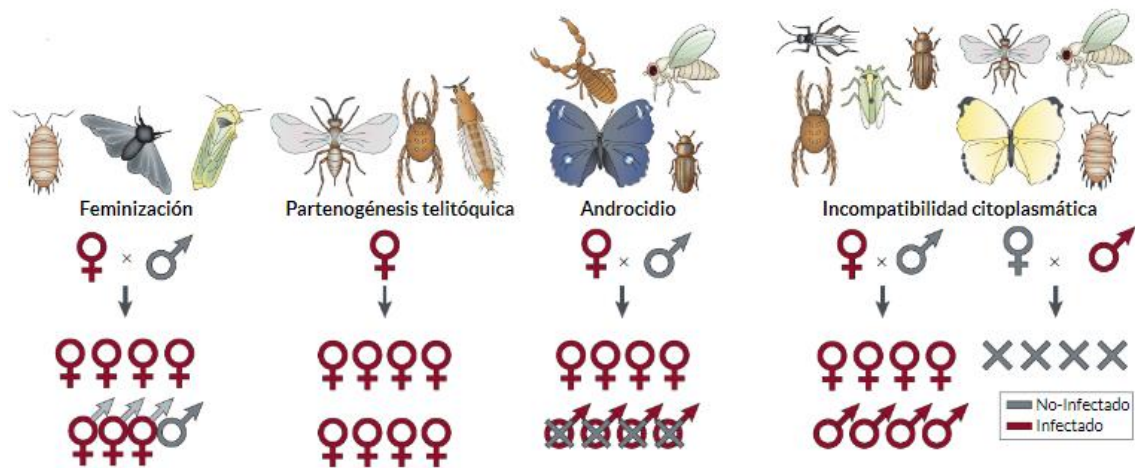


**Figura 1.1** Filogenia y evolución de *Wolbachia*. Representación esquemática de (A) relaciones filogenéticas de *Wolbachia* y miembros de la familia Anaplasmataceae, con *Rickettsia* como grupo externo, y (B) un árbol filogenético consenso basado en la secuencia *16S ARNr* sin raíz de los principales supergrupos de *Wolbachia*. Las posiciones filogenéticas de los supergrupos son actualmente tentativas y están basadas en trabajos publicados previamente en función de análisis de genes únicos y multigénicos. Los colores corresponden a diferentes patrones de asociaciones hospedador-*Wolbachia* en los supergrupos. El supergrupo E tiene una etiqueta multicolor, ya que la evidencia de fenotipos asociados con *Wolbachia* en sus hospedadores es sugestiva pero no concluyente. Un símbolo de fago representa supergrupos de *Wolbachia* con evidencia genómica de presencia del profago WO (ver Kent & Bordenstein, 2010). Tomado y modificado de Kaur et al., 2021.

La prevalencia global de *Wolbachia* está estimada en alrededor de un 20% de acuerdo a trabajos experimentales (Werren et al., 1995a; Werren & Windsor, 2000; Duron et al., 2008); sin embargo, estos estudios subestimaron la prevalencia de la infección por la utilización de uno o unos pocos individuos por especie para la caracterización, asumiendo que cuando la bacteria está presente, las frecuencias de infección dentro de cada especie son altas, aunque esto puede no ser así (Hilgenboecker et al., 2008). Se han realizado varios meta-análisis modelando la frecuencia de infección intraespecífica, lo que permitió obtener un resultado más preciso del porcentaje de infección global (Hilgenboecker et al., 2008; Zug & Hammerstein, 2012; Weinert et al., 2015). En base a dichos estudios, se ha concluido no solo que la prevalencia de infección oscila entre 40-66%, sino que las distribuciones resultantes sugieren un patrón de “casi todos o casi ninguno” en referencia a los individuos infectados, que implica que las frecuencias de infección dentro de cada especie suelen estar representadas o por valores muy altos o por valores muy bajos.

Si bien la alta prevalencia de esta bacteria es motivo suficiente para profundizar en su estudio, otra característica interesante de *Wolbachia* son las diversas manipulaciones reproductivas que ejerce sobre sus hospedadores (Figura 1.2), que incluyen: i) feminización de machos genéticos; ii) partenogénesis telitóquica (origen infeccioso de la partenogénesis); iii) androcidio (“*male killing*”), que implica la mortalidad de la descendencia masculina de las hembras infectadas, lo cual confiere una ventaja a la descendencia femenina, particularmente en especies que practican el canibalismo; iv) incompatibilidad citoplasmática, que es el fenotipo más reportado y consiste en la mortalidad de los embriones provenientes de cruzamientos entre machos infectados y hembras no infectadas, lo cual confiere una ventaja reproductiva a las hembras infectadas. Qué fenotipo se expresa (si acaso alguno) dependerá de factores propios del hospedador, de la bacteria, de la relación entre ambos y también de la interacción con otros simbioses (Charlat et al., 2003; Kaur et al., 2021).

Las alteraciones reproductivas que genera *Wolbachia* son consecuencia de la gran presión de selección que implica la herencia maternal de estos endosimbiontes. En este contexto, los machos representan “callejones sin salida” evolutivos para el pasaje de estos microorganismos a la siguiente generación, lo que ha llevado a la fijación de mecanismos que producen un incremento en el éxito reproductivo de las hembras infectadas a expensas de los machos (Dobson, 2003; Engelstädter & Hurst, 2009). En conjunto, estas estrategias se conocen como “parasitismo reproductivo” (Werren et al., 2008; Hurst & Frost, 2015) y permiten incrementar la frecuencia de la infección dentro de una determinada población.



**Figura 1.2** Fenotipos inducidos por *Wolbachia*. La feminización da como resultado machos genéticos que se desarrollan como hembras (en los órdenes Hemiptera, Isopoda y Lepidoptera). La inducción de la partenogénesis implica la reproducción de hembras vírgenes (en los órdenes Acari, Hymenoptera y Thysanoptera). El androcidio elimina a los machos infectados y suele evolucionar en aquellos casos en los que se da el canibalismo entre los miembros de la progenie; las hembras infectadas sobreviven y obtienen una ventaja de la muerte de sus hermanos (en los órdenes Coleoptera, Diptera, Lepidoptera y Pseudoscorpionida). La incompatibilidad citoplasmática impide el apareamiento exitoso entre machos infectados y hembras que carecen de *Wolbachia* (en los órdenes Acari, Coleoptera, Diptera, Hemiptera, Hymenoptera, Isopoda, Lepidoptera y Orthoptera). Tomado y modificado de Werren et al., 2008.

El increíble éxito de *Wolbachia* en parte tiene que ver con la eficiencia de su transmisión vertical, que se ve favorecida por los distintos fenotipos que incita en sus hospedadores y que permiten incrementar considerablemente su continuidad en las próximas generaciones. Sin embargo, su enorme prevalencia se debe a su capacidad de “saltar” entre hospedadores, lo que la convierte en la conquistadora más versátil.

La falta de congruencia entre las reconstrucciones filogenéticas de las cepas de *Wolbachia* y sus hospedadores da cuenta de múltiples eventos de transmisión horizontal (O'Neill et al., 1992; Werren et al., 1995b; Schilthuizen & Stouthamer, 1997; Gerth et al., 2013). Más aún, los resultados de múltiples análisis filogenómicos sugieren que han ocurrido numerosos eventos de cambio de hospedador entre artrópodos e intercambios antiguos entre artrópodos y nematodos (Gerth et al., 2014; Gomes et al., 2022). Incluso se estima que *Wolbachia* se encuentra en equilibrio epidemiológico debido a que la frecuencia con que nuevos taxones adquieren la infección es similar a la frecuencia con que las infecciones existentes se pierden (Bailly-Bechet et al., 2017).

El éxito del establecimiento de una nueva infección depende de que ésta sortee cuatro grandes obstáculos, cada uno con desafíos particulares que pueden superarse o no, dependiendo de factores tanto del hospedador como de la bacteria (Sanaei et al., 2021). En primer lugar debe ocurrir la transferencia física de la bacteria a una hembra de una nueva especie; luego *Wolbachia* debe ser capaz de proliferar dentro de este nuevo entorno individual y alcanzar la línea germinal; como tercer proceso se debe dar la transmisión maternal exitosa; por último, *Wolbachia* debe lograr diseminarse dentro de la nueva población hospedadora.

Se han reportado casos de adquisición de *Wolbachia* a partir de canibalismo y predación en isópodos (Le Clec'h et al., 2013), mediados por plantas (Li et al., 2017) y parasitoides (Huigens et al., 2004; Ahmed et al., 2015). Estos estudios ponen en evidencia que *Wolbachia* aprovecha al máximo las distintas instancias de interacción que se dan entre los organismos, por lo que su transferencia entre especies que comparten el mismo nicho ecológico es esperable y es uno de los factores a tener en cuenta cuando se observan cepas de *Wolbachia* cercanamente emparentadas presentes en hospedadores que pueden no estarlo.

### 1.3 La tribu Naupactini: el hogar de las madres vírgenes

Los gorgojos de la familia Curculionidae (Coleoptera, Curculionidea) (“gorgojos verdaderos” o “*true weevils*”) constituyen el grupo más numeroso y diverso dentro de los insectos, con alrededor de 4.600 géneros y 51.000 especies descritas (Oberprieler et al., 2007). Habitan los ambientes más disímiles, desde el Ártico hasta las islas subantárticas, en playas, montañas y desiertos, pero es en los trópicos húmedos donde alcanzan su mayor diversidad y riqueza (Zimmerman, 1994; Oberprieler et al., 2007). Sus fuentes de alimento son tan variadas como los lugares que colonizan, probablemente ninguna planta

pasa desapercibida para ellos y esta diversidad también se extiende a qué partes de las plantas son las que aprovechan (Zimmerman, 1994; Oberprieler et al., 2007). El impacto ecológico que ejercen es igual de heterogéneo: existen especies polinizadoras (Eriksson, 1994; Terry, 2001; Norman et al., 2018; Salzman et al., 2021), especies mirmecófilas<sup>3</sup> (Fall, 1912; Hustache & Bruch, 1936; Pérez-Lachaud & Lachaud, 2014), especies predatoras (Zwolfer & Bennett, 1969; Barker, 2006) y varias especies de importancia económica por los daños que ocasionan a múltiples cultivos (e.g., Chen et al., 2005; Fuentes et al., 2017). Coincidentemente, tres subfamilias con especies de importancia económica también se destacan por una alta incidencia de partenogénesis: Scolytinae (escarabajos de la madera), Cyclominae y Entiminae (gorgojos de rostro corto) (Lanteri & Normark, 1995; Gokhman & Kuznetsova, 2018).

Las primeras observaciones de partenogénesis en gorgojos evidenciaron que en este grupo: i) la partenogénesis es de tipo apomíctica (ameiótica); ii) para una misma especie pueden existir linajes partenogenéticos y linajes sexuales con distribuciones geográficas diferentes (más amplias en el caso de linajes partenogenéticos); iii) si bien existen especies partenogenéticas diploides, la partenogénesis suele asociarse con la poliploidía, existiendo especies tri-, tetra-, penta-, hexa- y decaploides; iv) la partenogénesis y la poliploidía podrían haber surgido de manera simultánea; sin embargo, no son fenómenos independientes entre sí; y v) la partenogénesis en este grupo tendría un origen híbrido (Suomalainen, 1940; Suomalainen, 1950; Smith, 1971; Suomalainen & Saura, 1973; Saura et al., 1993).

---

<sup>3</sup> Organismos que pueden encontrarse en asociación estrecha con hormigas. Pueden estar integrados a la colonia (i.e., si interaccionan con las hormigas y han sido aceptados en su sociedad) o no. En general el término hace referencia a asociaciones mutualistas, pero también puede utilizarse para interacciones comensalistas o incluso parasitarias (Kistner, 1982).



Para la década de 1990 se habían publicado varios estudios de curculiónidos partenogénicos, principalmente citando especies de Europa, Japón y América del Norte (e.g., Suomalainen, 1940; Takenouchi, 1965, 1976; Lokki et al., 1976), con pocas o ninguna mención de especies de América del Sur (e.g., Sanderson, 1973). Esto cambió cuando Lanteri & Normark, (1995) publicaron el primer trabajo exhaustivo sobre la extensión de la partenogénesis en gorgojos de la tribu Naupactini (subfamilia Entiminae) a partir del análisis taxonómico y las proporciones de sexos encontradas en poblaciones naturales. Así, se reportaron 31 especies potencialmente partenogénicas debido a la ausencia estricta de machos o bien por la observación de una desproporcionada relación entre hembras y machos. Experimentos de cría y estudios citológicos serían necesarios para demostrar efectivamente la reproducción partenogénica en la mayoría de las especies (e.g., Normark, 1996), aunque la sostenida ausencia de machos en poblaciones naturales es un buen augurio.

Naupactini es una tribu de gorgojos de rostro corto perteneciente a la subfamilia Entiminae con cerca de 500 especies descritas, la mayoría de ellas distribuidas en la región Neotropical, principalmente en América del Sur (Lanteri et al., 2002b). La asiduidad de la partenogénesis telitóquica dentro de esta tribu ha favorecido su dispersión en ambientes perturbados (i.e., ecosistemas agrarios), con la consecuente colonización de nuevas áreas distantes de su rango geográfico original (Alonso-Zarazaga, 1999; Lanteri et al., 2002b; Lanteri et al., 2013). Numerosas especies de Naupactini son consideradas plagas en los países donde han sido accidentalmente introducidas por los daños que ocasionan a cultivos de importancia económica (Chadwick, 1965; Madge et al., 1992; Hardwick, 1999; Gyeltshen & Hodges, 2006; Lanteri et al., 2013). En conjunto, la profundización del estudio de esta tribu resulta sumamente interesante no solo desde el

punto de vista evolutivo, sino también con miras hacia generar estrategias de control para las especies invasoras perjudiciales que, coincidentemente, suelen ser partenogénicas.

En esta línea, la comparación de filogenias basadas en caracteres morfológicos y haplotipos mitocondriales en el complejo de especies *Aramigus tessellatus* (Say 1824) evidenció que ambos conjuntos de marcadores son altamente incongruentes entre sí, lo que indicaría historias evolutivas diferentes y favorecería la hipótesis del origen híbrido de la partenogénesis en este complejo (Normark & Lanteri, 1998). Sin embargo, el descubrimiento de *Wolbachia* en *A. tessellatus* (Werren et al., 1995b) abrió una nueva puerta para explorar el origen de la partenogénesis en esta tribu y la historia evolutiva compartida entre hospedadores y simbioses (Rodríguez, 2009).

En las últimas décadas, el entendimiento que se tiene sobre la relación entre *Wolbachia* y la tribu Naupactini se ha complejizado sobremanera. Inicialmente, Rodríguez et al., (2010a) estudiaron la posibilidad del origen infeccioso de la partenogénesis, con *Wolbachia* como la causante de la transición a la unisexualidad, mediante el análisis del estado de infección y tipificación de cepas en 29 especies de Naupactini con distintos modos reproductivos (8 especies de reproducción sexual y 21 especies partenogénicas). Encontraron una asociación significativa entre el modo reproductivo y la presencia o ausencia de la infección con *Wolbachia*, de modo que las especies partenogénicas estaban infectadas y las especies de reproducción sexual no. Este patrón macroevolutivo se replica a nivel microevolutivo en *Pantomorus postfasciatus* (Hustache 1947) (Elías-Costa, et al., 2019).

*Pantomorus postfasciatus* cuenta con un sistema reproductivo mixto, es decir, existen linajes que se reproducen por partenogénesis, mientras que aún existen poblaciones donde pueden encontrarse machos de esta especie. Los estudios genético-poblacionales llevados

a cabo por Elías-Costa et al., (2019) revelaron que los linajes partenogénéticos se encontraban infectados con *Wolbachia*, mientras que no detectaron la infección en poblaciones bisexuales. Asimismo, identificaron un proceso especiogénico incipiente entre linajes bisexuales y partenogénéticos muy posiblemente mediado por *Wolbachia* y la señalaron como posible inductora de la partenogénesis en *P. postfasciatus*. Posteriormente, un experimento de cura con antibióticos efectuado con esta especie permitió establecer un vínculo entre la viabilidad de la progenie de los linajes partenogénéticos y la densidad relativa de *Wolbachia* (Rodríguez et al., 2021). Entonces, si bien en un principio Rodríguez et al., (2010a) señalaron una relación entre la presencia de la infección y la partenogénesis, estudios ulteriores señalaron que la densidad o carga de la bacteria es un factor de fundamental importancia en especies unisexuales. Así, la relación entre *Wolbachia* y la partenogénesis no solo tiene un componente cualitativo, sino también cuantitativo. Rodríguez et al., (2021) sugieren la existencia de un umbral de densidad bacteriana necesario para la reproducción en linajes partenogénéticos de *P. postfasciatus*, aunque no pudieron discriminar si esta bacteria sería necesaria para la división del huevo no fecundado, la ovogénesis o ambos procesos. Más aún, en un estudio posterior se describen infecciones con bajas densidades de *Wolbachia* (i.e., no detectables por métodos convencionales como la PCR de punto final, pero sí a partir de métodos más sensibles como la PCR en tiempo real), en especies de reproducción sexual estricta como *Naupactus dissimulator* (Boheman 1840) y *Naupactus xanthographus* (Germar 1824) (da Cruz Cabral et al., 2020). Estos hallazgos no solo refuerzan la idea de partenogénesis infecciosa en estos insectos, sino que inmediatamente conducen a la pregunta “¿por qué la densidad de *Wolbachia* se mantiene en un nivel tan bajo en ciertas especies de Naupactini que no experimentaron la transición a la partenogénesis?” La respuesta puede

estar encerrada en las interacciones con otros miembros de la bacteriota (da Cruz Cabral et al., 2022).

Por otro lado, existe una gran diversidad de cepas de *Wolbachia* que afectan a especies de la tribu Naupactini. Se identificaron 11 cepas diferentes asociadas a 23 especies con linajes partenogenéticos, todas pertenecientes al supergrupo B (Rodríguez et al., 2010a; Cabrio et al., 2022). Del análisis de estas cepas se desprenden varias cuestiones interesantes. En primer lugar, se aprecia la existencia de cepas ampliamente distribuidas en contraste con cepas que solo afectan a una o dos especies hospedadoras. En particular, la cepa *wNau1* se identificó en el 30% de las especies estudiadas (Rodríguez et al., 2010a) y también se la encontró en microhimenópteros parasitoides (Braconidae, Hymenoptera) (Mengoni Goñalons et al., 2014; Rodríguez et al., 2014). Esta abundancia de hospedadores habla de numerosos eventos de transferencia horizontal, de modo que puede considerarse una cepa “superpropagadora” (Sanaei et al., 2021).

Además, se observa una enorme tasa de transferencia horizontal, tal como lo reflejó el análisis filogenético realizado por Cabrio et al., (2022). Las autoras observaron que el conjunto de cepas descrito para las especies del complejo *Pantomorus-Naupactus* (Naupactini) conforma un grupo polifilético con variados niveles de divergencia, aunque se observan cepas cercanamente emparentadas que forman un grupo monofilético. Entonces, la evolución de la infección con *Wolbachia* en este grupo de insectos podría haberse dado probablemente por una serie de eventos de transferencia horizontal, posibilitados por un lado por el parentesco filogenético entre hospedadores y por otro por ambientes ecológicos compartidos.

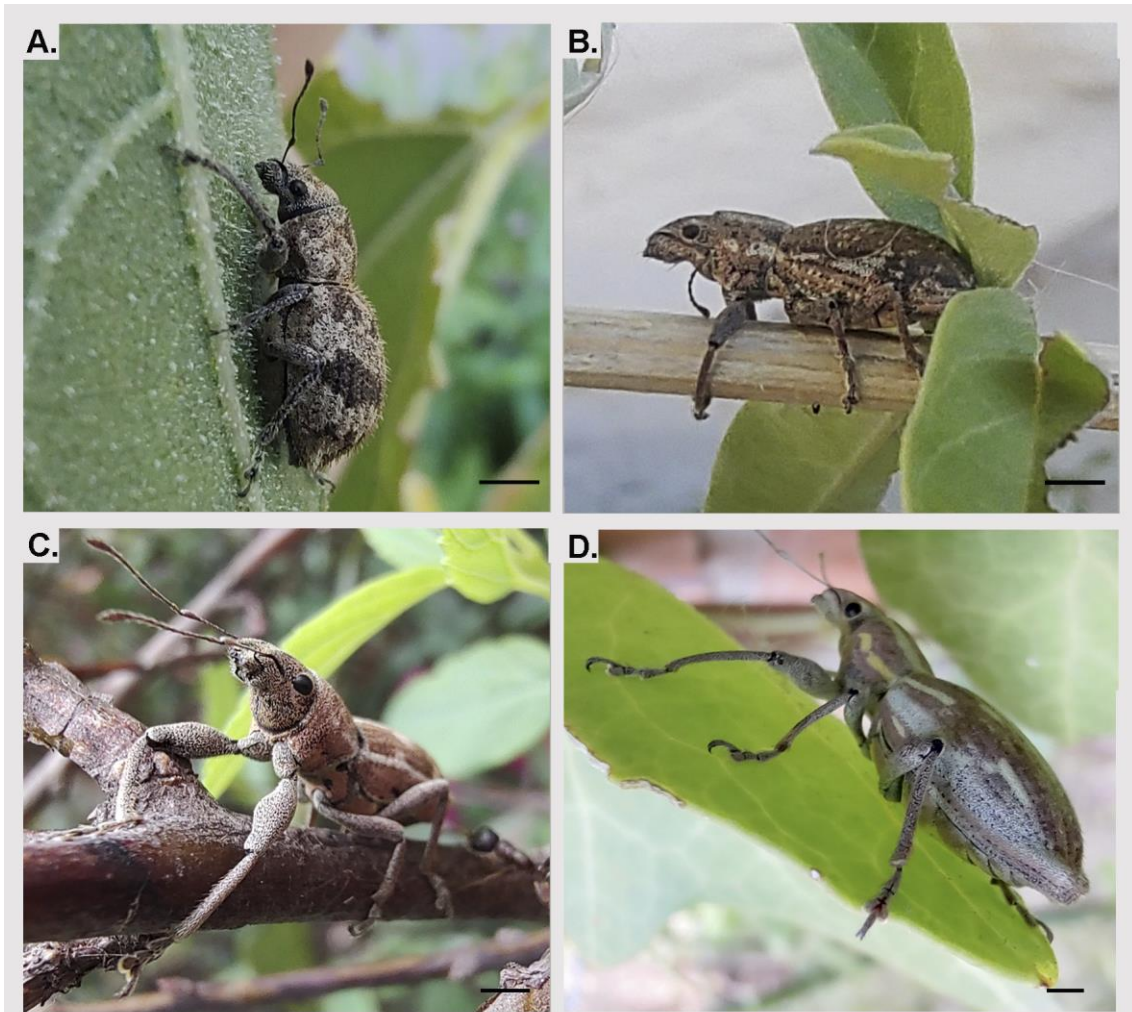
Finalmente, merece una mención especial la cepa wNau5 que, si bien se ha detectado solo en dos especies de Naupactini, puede considerarse sumamente exitosa en cuanto a que es la cepa característica de *Naupactus cervinus* (Boheman 1840), una de las especies de la tribu que más ha incrementado su distribución geográfica a partir de la introducción accidental en otros países, donde generalmente es considerada una plaga de cultivos de importancia económica (Chadwick, 1965; Elgueta, 1993; Lanteri et al., 2002a,b) y en la cual la infección se halla fijada. Además, se ha encontrado evidencia indirecta para hipotetizar la transmisión horizontal de esta cepa entre *N. cervinus* y un microhimenóptero parasitoide (Fernandez Goya et al., 2022), como también entre *N. cervinus* y *P. postfasciatus* (Elías-Costa et al., 2019).

## 1.4 Especies de Naupactini involucradas en este trabajo

Las especies de Naupactini son polífagas, aunque es frecuente observar preferencias por ciertas familias de plantas. Las hembras de esta tribu cuentan con un ovipositor largo y flexible que utilizan para depositar numerosos huevos aglutinados con una sustancia cementante en hendiduras formadas por dos superficies, como pueden ser los puntos de contacto entre el suelo y la hojarasca, grietas en troncos o ramas, debajo del cáliz de las flores o frutos, entre dos hojas o en un doblado de una hoja (Lanteri et al., 2002b). Las larvas son subterráneas, viven libremente en el suelo alimentándose de las raíces y atraviesan numerosos estadios que culminan con la pupación dentro de una celda de tierra (Lanteri et al., 2002b). Tienen una única generación anual y los adultos emergen del suelo a lo largo de la temporada de verano de modo que en una misma estación podemos encontrar individuos de distintas edades.

En el presente trabajo de tesis se estudiaron cuatro especies de Naupactini que pueden resultar perjudiciales para distintos cultivos: *Pantomorus postfasciatus* (Figura 1.3A),

*Naupactus cervinus* (Figura 1.3B), *Naupactus dissimulador* (Figura 1.3C) y *Naupactus xanthographus* (Figura 1.3D).



**Figura 1.3** Especies de Naupactini utilizadas en este trabajo: *Pantomorus postfasciatus* (A), *Naupactus cervinus* (B), *Naupactus dissimulador* (C) y *Naupactus xanthographus* (D). En todos los casos la barra de escala representa 1 mm.

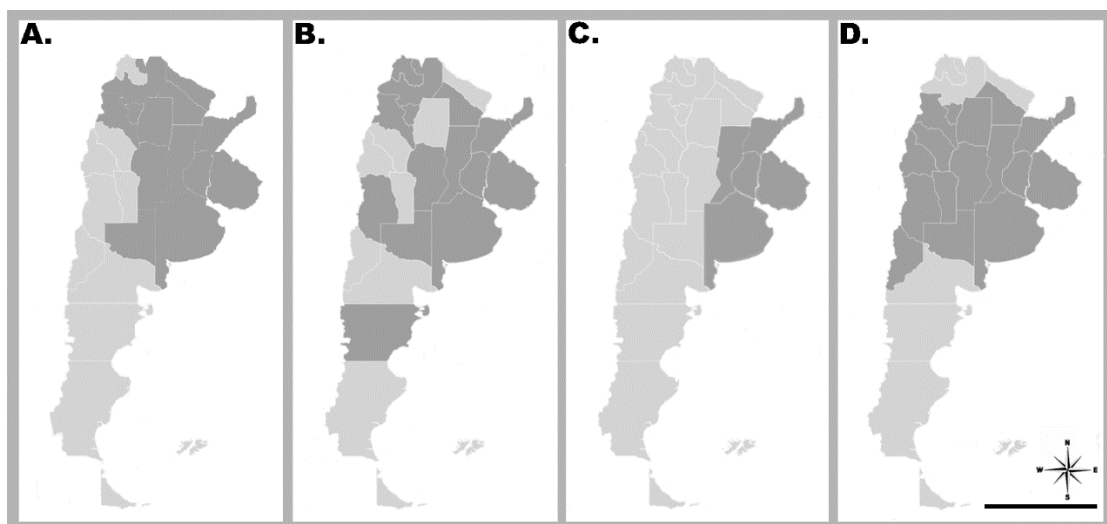
*Pantomorus postfasciatus* se asocia con vegetación arbórea y pastizales en las provincias Chaqueña y Pampeana y además se encuentra ocasionalmente en alfalfares de la provincia de Córdoba (Figura 1.4A) (Lanteri, 1994; Lanteri et al, 2002b). Se ha citado como perjudicial para cítricos en Corrientes, donde en 1990 los adultos causaron daños en el follaje y en las flores, y las larvas en las zonas del cuello y las raíces (Lanteri et al., 2002b). Su presencia ha sido reportada en Paraguay, Uruguay y Brasil, donde también se la ha encontrado dañando cítricos (Lanteri et al., 2002a; Guedes et al., 2005). Cuenta con linajes de reproducción sexual no infectados con *Wolbachia* y con linajes

partenogénéticos infectados con alta densidad de *wNau1* (Elias-Costa et al., 2019; da Cruz Cabral et al., 2020).

*Naupactus cervinus* tiene una distribución ancestral asociada a los bordes de la selva en galería de la selva paranaense (Rodríguez, 2009; Rodríguez et al., 2016), aunque actualmente ha extendido su distribución hacia otras regiones (Figura 1.4B) (Rodríguez et al., 2016, 2019, 2023). Reviste gran importancia económica, especialmente en los países donde fue introducida. En la Argentina es dañina para cítricos, alfalfa, plantas de jardín, diversos frutales y forestales (Lanteri, 1994; Lanteri et al., 2002b; Del Rio et al., 2010); en Estados Unidos y Australia es perjudicial para cítricos (Smith et al., 1997; Lanteri et al., 2002b); en Brasil para cítricos, café y rosáceas (Lanteri et al., 2002a, b; Guedes et al., 2005); en Chile para alfalfa, bananos, cítricos, damasco, durazno, frambuesa, frutilla, maíz, manzano, palta, remolacha, trébol rosado y diversas gramíneas (Elgueta, 1993). Esta especie se reproduce por partenogénesis y no se conocen poblaciones sexuales actuales (Rodríguez et al., 2010b). Todas las poblaciones estudiadas se encuentran infectadas con *wNau5* (Rodríguez et al., 2010b).

*Naupactus dissimulator* se asocia con la vegetación de la selva en galería del río Paraná, desde Misiones hasta el Río de la Plata en Buenos Aires (Lanteri et al., 2002b). Su distribución geográfica es la más acotada entre las especies estudiadas y no se tienen reportes de introducción en otros países (Figura 1.4C). En Argentina se ha reportado que causa daños en cítricos, yerba mate y duraznero (Bosq, 1943; Lanteri et al., 2002b). De reproducción sexual estricta, no cuenta con linajes partenogénéticos; sin embargo, tanto machos como hembras se encuentran infectados con densidades bajas de *wNau1* en parte de su rango de distribución (da Cruz Cabral et al., 2020).

*Naupactus xanthographus* se asocia principalmente con vegetación arbórea de la provincia Chaqueña, habiendo extendido su área de distribución hacia zonas más áridas (Figura 1.4D). Su biología ha sido bien estudiada en Chile por los importantes daños que ocasiona en diversos cultivos, especialmente la vid (Caballero, 1968; González et al., 1992; Elgueta, 1993). En Argentina ocasiona daños en alfalfa, vid, fruta fina y plantas de jardín, como ligustro y rosal (Lanteri, 1994; Lanteri et al., 2002b; Del Rio et al., 2010), aunque los daños ocasionados no han alcanzado la magnitud de los que ocurren en Chile. También de reproducción sexual estricta, existen linajes donde machos y hembras están infectados con bajas densidades de *wNau1*, aunque también existen poblaciones completamente libres de infección (da Cruz Cabral et al., 2020).



**Figura 1.4** Distribución geográfica en Argentina de distintas especies de Naupactini. **A.** *Pantomorus postfasciatus*. **B.** *Naupactus cervinus*. **C.** *Naupactus dissimulator*. **D.** *Naupactus xanthographus*. La barra de escala representa 1000 km. Los mapas de las distribuciones fueron tomados del Catálogo Naupactini (Coleoptera: Curculionidae) especies de Argentina y Uruguay (Lanteri & del Río, 2023).

## 1.5 Objetivos e Hipótesis

El presente trabajo de tesis pretende profundizar el conocimiento que se tiene sobre las interacciones entre la bacteria endosimbiótica *Wolbachia pipientis* y distintas especies de gorgojos de la tribu Naupactini, con especial foco en la reproducción.

Las hipótesis y objetivos asociados de este trabajo son:



**Hipótesis I:** La reproducción de los linajes partenogenéticos de *Pantomorus postfasciatus* depende de la densidad de *Wolbachia*.

Objetivo asociado: Evaluar la relación entre la densidad de la cepa *wNau1* y la viabilidad de la progenie en poblaciones partenogenéticas del gorgojo *P. postfasciatus* a partir de un experimento de cura con un antibiótico efectivo contra *Wolbachia*, controlando los efectos secundarios del compuesto y el posible efecto sobre otros simbioses.

**Hipótesis II:** *Wolbachia* colocaliza en forma ubicua con otros simbioses dominantes en distintas especies de Naupactini.

Objetivo asociado: Determinar la colocalización y densidad de los simbioses más abundantes en distintas especies de Naupactini infectadas con *Wolbachia*.

**Hipótesis III:** Las cepas de *Wolbachia* que infectan a especies de gorgojos capaces de reproducirse partenogenéticamente presentan ciertas características genómicas comunes entre sí y posiblemente con otras cepas que inducen este mismo fenotipo en otros artrópodos, particularmente aquellos con sistema de determinación del sexo diplo-diploide.

Objetivo asociado: Secuenciar, ensamblar y anotar funcionalmente los genomas de las cepas de Naupactini *wNau1* y *wNau5* y realizar un análisis genómico-comparativo con el fin de evidenciar familias de genes que podrían estar involucradas en la transición a la unisexualidad en este grupo de insectos. Adicionalmente se incluirán en el análisis cepas inductoras de partenogénesis, particularmente en especies de artrópodos con sistema de determinación del sexo diplo-diploide.

**Hipótesis IV:** Los parasitoides podrían actuar como vehículos de la transmisión de *Wolbachia* entre especies de Naupactini.

Objetivo asociado: Explorar el parasitoidismo como posible ruta de transferencia horizontal de la infección con *Wolbachia* en la tribu Naupactini mediante la identificación de especies de parasitoides encontradas en este grupo, a través de un análisis de código de barras del ADN, el diagnóstico de la infección de las mismas y la caracterización de la cepa de *Wolbachia* con la cual estén infectadas.

Con el abordaje de estos objetivos y la integración de los resultados se espera aportar información original sobre el rol de las bacterias endosimbióticas, particularmente *Wolbachia*, haciendo foco en el factor densidad y su relación con los distintos modos reproductivos reportados para la tribu Naupactini. A su vez, la caracterización de dos nuevos genomas de *Wolbachia* representa un avance en el esfuerzo colectivo por reconstruir la historia evolutiva de esta bacteria.

**Páginas 24 a 142 eliminadas a pedido del autor.**

---

## 5. INTERACCIONES HOSPEDADOR-PARASITOIDE REPORTADAS PARA *NAUPACTUS CERVINUS* Y *NAUPACTUS DISSIMULATOR* Y SU POSIBLE ROL EN LA TRANSFERENCIA HORIZONTAL DE *WOLBACHIA*

---

### 5.1 Introducción<sup>22</sup>

El parasitoidismo es una de las relaciones más íntimas y complejas que pueden darse entre organismos y es sorprendentemente frecuente si consideramos que más del 50% de las especies que existen están involucradas en esta dinámica (Smith et al., 2008). Los parasitoides cumplen un rol ecológico fundamental, siendo cruciales en la estructura y dinámica de las redes tróficas (Smith et al., 2008) y en la regulación natural de las poblaciones de insectos (Letourneau et al., 2009; Santos & Quicke, 2011). La identificación de estas especies es fundamental para poder establecer los vínculos dentro y entre comunidades; sin embargo, se cree que solo el 1% de las especies de parasitoides han sido descritas (Smith et al., 2008). En particular, es llamativo el caso de Hymenoptera, que concentra al 75% de las especies de parasitoides, a la vez que se estima que sólo el 33% de las especies de este Orden han sido identificadas (Santos & Quicke, 2011).

Los parasitoides y sus hospedadores se ven involucrados en una “carrera armamentista” que gobierna su evolución conjunta. Los hospedadores cuentan con diferentes mecanismos para evitar ser parasitoidizados, como comportamientos de

---

<sup>22</sup> Parte de los resultados presentados en el presente capítulo han sido publicados en: Fernandez Goya, L., Lanteri, A.A., Confalonieri, V.A. and Rodriguez, M.S., 2022. New host-parasitoid interactions in *Naupactus cervinus* (Coleoptera, Curculionidae) raise the question of *Wolbachia* horizontal transmission. *Symbiosis*, pp.1-12.

evitación (Ohsaki & Sato, 1990; Hwang et al., 2007; Haverkamp & Smid, 2020) o defensivos (Potting et al., 1999; Nofemela, 2017; Haverkamp & Smid, 2020), o diferentes respuestas inmunes (e.g., Strand & Pech, 1995; Eslin & Prevost, 1996; Kim-Jo et al., 2019; Yang et al., 2020b). Los parasitoides, por otro lado, pueden interrumpir o desorganizar la respuesta inmune de los hospedadores (Eslin & Prevost, 1996; Prevost et al., 2005; Labrosse et al., 2005; Mabilia-Moundoungou et al., 2010; Furihata et al., 2013; Lin et al., 2018) o bien evitarla por completo al desarrollarse de manera tal que sus hospedadores no los reconozcan como ajenos (e.g., huevos firmemente adheridos al tejido) (Prevost et al., 2005). La interacción entre el parasitoide y su hospedador se complejiza aún más si consideramos sus microbiotas (Gurung et al., 2019; Dicke et al., 2020).

La comunidad microbiana que habita cualquier organismo tiene una gran influencia en su biología. En este sentido, uno o varios microorganismos pueden influir en el éxito o el fracaso de la parasitoidización (Oliver et al., 2005, 2009; Herniou et al., 2013; Xie et al., 2014; Strand & Burke, 2015). Adicionalmente, la koinobiosis endoparásita (i.e., a pesar de que el parasitoide se desarrolla de manera interna en el hospedador, le permite continuar su propio desarrollo) implica una estrecha interacción hospedador-parasitoide (Gauld, 1988), lo cual posibilita el intercambio microbiano en ambos sentidos. Si bien es más frecuente que la transmisión ocurra de manera tal que los parasitoides contraigan una nueva infección (e.g., Heath et al., 1999; Huigens et al., 2000, 2004), se registraron casos en los cuales la interacción con parasitoides fue responsable de la incorporación de nuevos endosimbiontes por parte del hospedador (e.g., Gehrler & Vorburger, 2012; Ahmed et al., 2015).

Hasta hace no mucho tiempo, la taxonomía basada en la morfología era la única herramienta disponible para identificar organismos. Esto ha cambiado gracias a los

avances en los métodos de identificación molecular, que complementan la información taxonómica particularmente en tres situaciones: i) cuando el material disponible proviene de organismos dañados o sólo se cuenta con fragmentos de los mismos, ii) cuando existen diferencias considerables entre estadios inmaduros y especímenes adultos que hacen que unos y otros sean difíciles de identificar como miembros de la misma especie y iii) cuando la morfología por sí sola no puede discriminar claramente entre especies, como es el caso de las especies crípticas (Frézal & Leblois, 2008). Si bien el uso de herramientas moleculares para la identificación de organismos no es algo nuevo, el proyecto *Barcode of Life*, iniciado en 2003, se enfoca en el desarrollo de una herramienta de diagnóstico molecular simple y basada en el conocimiento taxonómico: el código de barras de la vida (Hebert et al., 2003a; Schindel & Miller, 2005).

El término "código de barras de ADN" ("*DNA barcoding*"; Hebert et al., 2003a) se refiere al uso de una región estandarizada del ADN como distintivo para la identificación rápida y precisa de especies. Para animales se utiliza el gen que codifica para la enzima mitocondrial citocromo c oxidasa (*COI*) (Hebert et al., 2003a,b), en plantas se utiliza el gen que codifica para la enzima cloroplástica ribulosa-1,5-bisfosfato carboxilasa/oxigenasa (*RuBisCO*) (CBOL Plant Working Group, 2009) y para identificar hongos se utiliza la secuencia correspondiente al primer espaciador transcrito interno del ADN ribosomal (*ITS1*) (Schoch et al., 2012). Se puede distinguir entre *DNA barcoding sensu stricto*, que corresponde a la identificación a nivel de especie de un organismo en base a una única región estandarizada, o *DNA barcoding sensu lato*, que no es tan restrictiva y se refiere a la identificación a cualquier nivel taxonómico de un organismo a partir de un fragmento de ADN que no necesariamente sea el estándar para el organismo a identificar (Valentini et al., 2009). Así, el análisis de *DNA barcoding* se ha vuelto una técnica sumamente útil no solo para la taxonomía, sino para múltiples disciplinas (Chase

et al., 2005; Valentini et al., 2009), en particular para la identificación de relaciones simbióticas e interacciones hospedador-parasitoide (Besansky et al., 2003; Smith et al., 2008; Morrow et al., 2014).

La tribu Naupactini incluye varias especies de importancia económica (Del Rio & Lanteri, 2018). En particular, *N. cervinus* es considerada una especie plaga en varios países. Sus larvas se alimentan de las raíces de cultivos ornamentales y frutales, particularmente *Citrus* spp. (Lanteri et al., 2002a; Olivares et al., 2014; Gulcu et al., 2019), y si sus huevos son encontrados sobre frutas pueden causar la interrupción de la exportación de cítricos y kiwi en los mercados del Este Asiático (Logan et al., 2008). También *N. dissimulator* puede resultar dañina para cultivos de cítricos (*Citrus spp.*), yerba mate (*Ilex paraguariensis*) y durazno (*Prunus persica*) en el noreste Argentino (Bosq, 1943; Lanteri et al., 2002b). Entonces, el estudio de las relaciones que se establecen entre estos gorgojos y sus parasitoides podría permitir el desarrollo de estrategias de control biológico.

Se han descrito varios parasitoides para distintas especies de gorgojos de esta tribu, siendo las avispas de la familia Braconidae las más frecuentes (géneros *Centistes* (Haliday 1835) y *Microctonus* (Wesmael 1835)). *Microctonus* sp. se reportó como parasitoide de *Cyrtomon luridus* (Boheman 1940), una especie que en Brasil resulta dañina para plantas medicinales del género *Duboisia* (Solanaceae) (Tironi et al., 2004), mientras que en Nueva Zelanda, el gorgojo introducido accidentalmente *Atrichonotus taeniatulus* (Berg 1881) es parasitoidizado por *Microctonus aethiopoides* (Loan 1975) (Barrat et al., 1998). En Argentina se reportan varias especies de avispas parasitoides para *N. xanthographus*: *Fidiobia asina* (Loiacono 1982) (Platygastridae) ataca los huevos (Loiacono, 1982), mientras que las avispas *Grassator viator* (De Santis 1948) (Eulophidae) y *Centistes* sp. (Braconidae) atacan las larvas (Artigas, 1994; Lanteri et al., 1998). Por otro lado, para *N.*

*cervinus* también se han reportado parasitoides de distintos estadios: *Fidiobia citri* (Nixon 1969) (Platygastridae) ataca los huevos (Morse et al., 1988), *Centistes* sp. es un parasitoide del estadio larval (Artigas, 1994; Lanteri et al., 1998) y *Microctonus* sp. del estadio adulto (Rodríguez et al., 2014).

Finalmente, la multiplicidad de cepas de *Wolbachia* presentes en la tribu Naupactini (Rodríguez et al., 2010a) en conjunto con la evidencia de transferencia horizontal de la infección (Rodríguez et al., 2010a; Rodríguez et al., 2014; Elías-Costa et al., 2019; Cabrio et al., 2022) podrían explicarse si se considera a los parasitoides como vehículos de la transmisión (Werren et al., 1995; Vavre et al., 1999, Courdaux et al., 2001). Aunque probar la transferencia horizontal en poblaciones naturales es una tarea desafiante (Hughes et al., 2004), el estudio de posibles eventos de cambios de hospedador a través de métodos indirectos contribuirá a una mejor comprensión del masivo éxito colonizador de *Wolbachia*.

Este capítulo tiene por objetivo general explorar el parasitoidismo como posible ruta de transferencia horizontal de endosimbiontes en la tribu Naupactini. Como objetivos particulares se pretende i) Identificar algunas especies de parasitoides asociadas con *N. cervinus* y *N. dissimulator* a través de *DNA barcoding*; ii) Establecer el estado de infección de dichos parasitoides con respecto a las bacterias endosimbióticas reportadas para la tribu Naupactini (i.e., *Wolbachia*, *Rickettsia* sp. y *Spiroplasma* spp.); iii) Tipificar las cepas presentes en las especies parasitoides y compararlas con las de sus respectivos hospedadores.



## 5.2 Materiales y Métodos

### 5.2.1 Colecta y disección del material, extracción del ADN y obtención de las secuencias

Se colectaron 30 hembras de *N. dissimulator* en Palermo (CABA) (-34,571583; -58,418972), 6 hembras de *N. cervinus* en Chajarí, Provincia de Entre Ríos (-30.7573, -57.9916) y 12 hembras de *N. cervinus* en Zárate, Provincia de Buenos Aires (-34.0958, -59.0242) utilizando el método de la sábana o bien removiéndolas manualmente de la vegetación. Las hembras fueron disecadas bajo flujo laminar y las larvas de parasitoides encontradas en la cavidad abdominal de las mismas se conservaron en alcohol 100% y se almacenaron a 4°C hasta el momento de la extracción del ADN.

El ADN genómico total de cada larva se extrajo utilizando el kit DNeasy Blood and Tissue (QIAGEN, EEUU), siguiendo las instrucciones del fabricante. Luego, se amplificó un fragmento de la subunidad I del gen que codifica para la enzima mitocondrial citocromo c oxidasa (*COI*) a fin de realizar un análisis de identificación mediante *DNA barcoding*. La amplificación se llevó a cabo con los oligonucleótidos específicos S1718 (5'-GGA GGA TTT GGA AAT TGA TTA GTT CC-3') y A2442 (5'-GCT AAT CAT CTA AAA ATT TTA ATT CCT GTT GG-3'), diseñados por Normark, (1994), en un volumen de reacción de 20 µl con 50-100 ng de ADN como templado; 0,5 µM de cada oligonucleótido (Macrogen, Corea); 0,1 mM de cada dNTP (Promega, EEUU); 3,0 mM de MgCl<sub>2</sub>; 1,0 unidad de Taq polimerasa (Thermo Fisher Scientific, EEUU) y 1X de *buffer* de reacción (Thermo Fisher Scientific, EEUU). Se utilizó un termociclador Verity (Applied Biosystems, USA) siguiendo el régimen térmico descrito por Scataglini et al., (2005), que comienza con una incubación a 94°C durante 6 min, seguido por 35 ciclos de 94°C por 1 min, 48°C por 1 min y 72°C por 90 seg, concluyendo con una última elongación a 72°C durante 5 min. Los productos de PCR fueron visualizados a partir de

electroforesis (90 V por 30 min) en un gel de agarosa al 1% teñido con GelRed® (Biotium, EEUU) y purificados con el método FastAP (Thermo Fisher Scientific, EEUU). Luego, los fragmentos fueron secuenciados en la Unidad de Genómica del Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA), utilizando un secuenciador 3130xl Genetic Analyzer (Applied Biosystems, EEUU). Los cromatogramas resultantes se editaron con BIOEDIT v.7.2.5 (Hall, 1999) y se construyó la secuencia consenso.

Se realizó un diagnóstico de la infección con *Wolbachia*, *Rickettsia* sp. y *Spiroplasma* sp. mediante amplificación por PCR de punto final de genes específicos de cada bacteria. Los oligonucleótidos y condiciones de ciclado se encuentran detallados en las secciones 3.2.2.1 (Capítulo 3), 2.2.3.2.1 (Capítulo 2) y 3.2.3.1 (Capítulo 3) respectivamente. Los productos de PCR fueron visualizados a partir de electroforesis (90 V por 30 min) en un gel de agarosa al 1% teñido con GelRed® (Biotium, EEUU).

La tipificación de las cepas de *Wolbachia* se realizó a partir del método MLST (Baldo et al., 2006). Se amplificaron los genes *ftsZ*, *gatB*, *coxA*, *hcpA*, y *fbpA* utilizando los oligonucleótidos y regímenes térmicos establecidos por Baldo et al., (2006). Luego, las secuencias obtenidas para cada gen fueron contrastadas con la base de datos de genotipos multilocus de *Wolbachia* (<https://pubmlst.org/organisms/wolbachia-spp/>) (Jolley et al., 2018) para obtener la identidad de cada alelo y el perfil alélico o ST (“*Sequence Type*”, por sus siglas en inglés).

## 5.2.2 Reconstrucción filogenética

Los análisis subsiguientes siguieron la lógica de Rodriguero et al., (2014) y Sasakawa et al., (2011). Se realizaron análisis de BLASTn (Altschul et al., 1990; Altschul, 1997) e identificación con las herramientas de la base de datos BOLD (Ratnasingham & Hebert, 2007) a partir de las secuencias obtenidas para la caracterización de cada parasitoide a nivel de familia (*DNA barcoding sensu lato*). Se confeccionó un conjunto de datos para

cada incógnita en el que se incluyeron secuencias de especies y géneros putativamente emparentados y secuencias adecuadas como grupo externo.

Las secuencias de cada conjunto de datos se alinearon utilizando ClustalW (Thompson et al., 1994) con la configuración de parámetros predeterminada. Los alineamientos obtenidos se inspeccionaron visualmente y, de ser necesario, fueron corregidos manualmente usando BioEdit versión 7.2.5 (Hall, 1999).

Las reconstrucciones filogenéticas se realizaron mediante inferencia Bayesiana, método que se basa en elegir la hipótesis filogenética (árbol) con mayor probabilidad posterior, es decir, la probabilidad de que el árbol elegido sea correcto dados los datos provistos y el modelo de evolución molecular establecido *a priori* (Huelsenbeck et al., 2001). El cálculo de la probabilidad posterior implica evaluar todos los posibles árboles y, para cada árbol, investigar todas las posibles combinaciones de longitudes de ramas y parámetros del modelo evolutivo. Dado que este cálculo resulta prohibitivo computacionalmente, se utiliza un algoritmo de Cadenas de Markov de Monte Carlo (MCMC por sus siglas en inglés) que, mediante la simulación estocástica, permite obtener una aproximación de la distribución de la probabilidad posterior.

En esencia, el algoritmo parte de un árbol al azar y realiza ligeras modificaciones en las variables de partida, ya sea la posición o longitud de una rama en concreto, o el valor de un parámetro del modelo evolutivo. Luego de cada modificación se compara el nuevo árbol con el anterior. Si el árbol modificado tiene una probabilidad posterior mayor que el árbol original, el algoritmo acepta el cambio y continúa desde ese punto. Es necesario darle tiempo (generaciones) al algoritmo para que explore el conjunto de árboles posibles y alcance la topología más probable (estado estacionario). Al partir de un árbol al azar es muy factible que la probabilidad posterior inicial sea baja y, como los cambios que se

introducen son relativamente pequeños, se suele descartar un porcentaje inicial de las topologías muestreadas antes de construir el árbol consenso.

Las cadenas de Markov se complementan con el algoritmo “*Metropolis-coupled Montecarlo vía Cadenas de Markov*” (MCMCMC o MC3) que consiste en realizar dos análisis independientes, cada uno utilizando cuatro cadenas de Markov. La cadena con mayor probabilidad posterior se comporta siempre como cadena “fría”, mientras las otras tres se comportan como cadenas “calientes”. Las cadenas “calientes” son exploradoras y pueden aceptar topologías subóptimas, evitando que el algoritmo se quede atrapado en un máximo local de probabilidad posterior (Figura 5.1). Para saber si las cadenas han explorado eficientemente el conjunto de árboles se estudia la convergencia de las cadenas “frías” entre los dos análisis independientes y una de las formas más sencillas de hacerlo es observar sus diferencias medias o SDSF por sus siglas en inglés (“*Standard Deviation of Split Frequencies*”): una diferencia menor a 0,01 entre dichas magnitudes es un buen indicador de que los análisis han convergido.

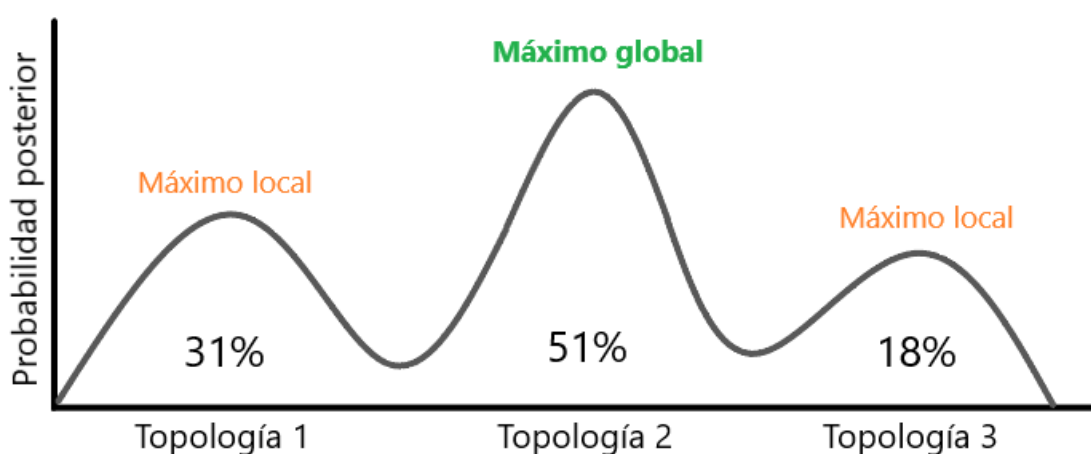


Figura 5.1 Modelo representativo de la distribución de probabilidad posterior entre distintas topologías posibles en inferencia filogenética bayesiana. Los porcentajes indican la probabilidad posterior de cada una de las topologías correspondientes.

Entonces, para comenzar con el análisis de inferencia Bayesiana es necesario elegir el modelo de sustitución nucleotídica que describe cómo evolucionan las secuencias. La elección del modelo se realizó en base al criterio de información de Akaike utilizando el

programa MRMODELTEST v. 2.4 (Nylander, 2004). El modelo óptimo resultó ser GTR+I+G (Modelo General Reversible, GTR por sus siglas en inglés) para las tres reconstrucciones filogenéticas realizadas. Este modelo asume una tasa de sustitución nucleotídica para cada posible sustitución (A↔C, A↔T, A↔G, C↔T, C↔G y T↔G), con una distribución Gamma (la cual establece que hay regiones de la secuencia donde las sustituciones son más probables) y proporción de sitios invariantes. La inferencia bayesiana se realizó con MRBAYES v. 3.2.2 (Huelsenbeck & Ronquist, 2001; Altekar et al., 2004) ejecutando dos análisis independientes iniciados a partir de un árbol aleatorio y explorando el espacio del árbol con una cadena fría y tres cadenas calientes progresivamente. Los análisis se realizaron durante 1.000.000 de generaciones y se verificó que el SDSF fuera menor a 0,01 antes de darlo por terminado. El árbol consenso se construye combinando clados que ocurrieron en al menos un cierto porcentaje de las topologías estudiadas. En este caso se utilizó un umbral del 50% y la longitud de las ramas se calcularon a partir del promedio de todos los árboles que contuvieron al clado. Se descartó el 25% inicial de las topologías muestreadas.

Se realizaron dos análisis filogenéticos a fin de identificar al parasitoide de *N. dissimulator* por *DNA barcoding*. Inicialmente se llevó a cabo un análisis a nivel de superfamilia a partir de 27 secuencias de distintos miembros de las superfamilias Oestroidea y Muscoidea (Diptera) y una secuencia de la superfamilia Hippoboscoidea (Diptera) como grupo externo. Posteriormente, se ejecutó un nuevo análisis, esta vez a nivel de la familia Tachinidae, que involucró 29 secuencias de cinco géneros emparentados y una secuencia del género *Coenosia* sp., (Meigen 1826) (Muscidae, Diptera) como grupo externo.

Por otro lado, se construyeron dos conjuntos de datos para identificar los dos parasitoides encontrados en *N. cervinus* por *DNA barcoding*. Uno de los conjuntos

incluyó 54 secuencias de la familia Tachinidae (Diptera) pertenecientes a cuatro géneros estrechamente relacionados (subfamilia Dexiinae) y seis secuencias de tres especies diferentes (subfamilia Tachininae) utilizadas como grupos externos (Stireman et al., 2019). El otro conjunto de datos se conformó por 65 secuencias de cinco géneros de la familia Braconidae (Hymenoptera), incluida la secuencia de *Microctonus* sp., reportada previamente como parasitoide para *N. cervinus* (Rodríguez et al., 2014), mientras que un representante de Ichneumonidae (Hymenoptera) se utilizó como grupo externo.

Adicionalmente, para cada análisis se estimaron las distancias genéticas por pares entre géneros y entre especies utilizando MEGA-X v.10.2.5 (Kumar et al., 2018) sobre la base del método de distancia p, que es la proporción (p) de sitios nucleotídicos en la que dos secuencias que se comparan son diferentes ( $p = \text{diferencias de nucleótidos} / \text{nucleótidos comparados}$ ).

## 5.3 Resultados

### 5.3.1 Parasitoide de *Naupactus dissimulator*

El 3,33% (1/30) de las hembras disecadas contenía una larva de parasitoide en su abdomen (Figura 5.2). La larva se encontraba viva al momento de la disección.



**Figura 5.2** Larva de parasitoide encontrada en la cavidad abdominal de una hembra de *N. dissimulator*. La barra de escala representa 2 mm.

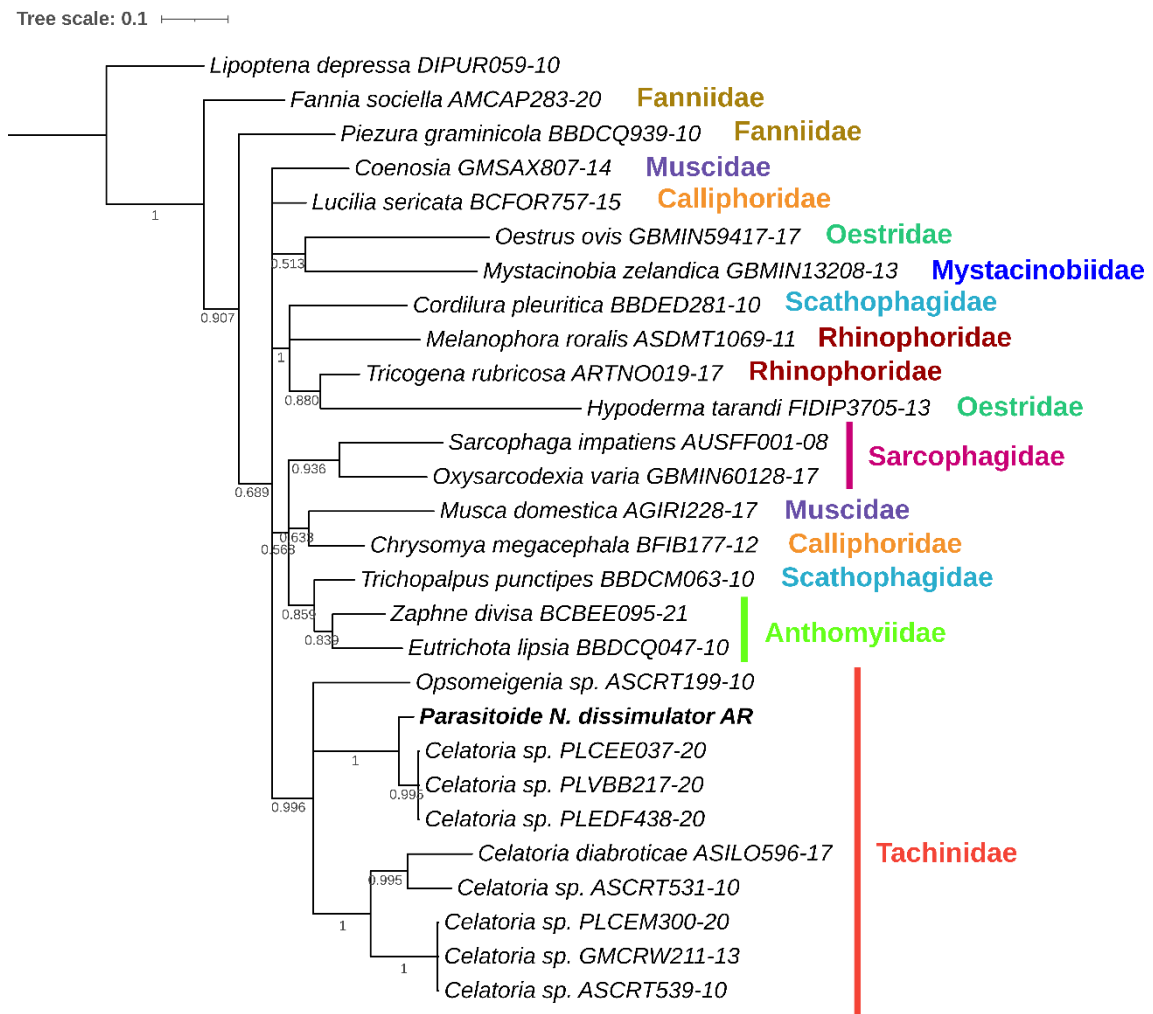
Los análisis de BLASTn y BOLD indicaron que el parasitoide de *N. dissimulator* era un díptero (secuencia *COI* de 725 pb; número de acceso GenBank OQ448505). Sin embargo, se observaron discrepancias en cuanto a la familia con mayor afinidad al parasitoide analizado. Mientras que el análisis de BLASTn, que consiste en una comparación con las secuencias depositadas en la base de datos GenBank, indicó una similitud de 88-90% con el género *Coenosia* (Muscidae, Diptera) (e.g., número de acceso de GenBank KY834248.1, valor  $E=7e-180$ ), el análisis basado en la base de datos BOLD señaló un similitud del 90-96% con el género *Celatoria* (Coquillett 1890) (Tachinidae, Diptera). La incertidumbre en cuanto a la familia a la que se asignaría el parasitoide en cuestión sugirió la necesidad de realizar un análisis a nivel de superfamilia.

El análisis a nivel de superfamilia reveló que la secuencia del parasitoide de *N. dissimulator* se agrupó con secuencias de los géneros *Celatoria* (Tachinidae) y *Opsomeigenia* (Townsend 1919) (Tachinidae) con alto soporte nodal (Figura 5.3). Por este motivo, se hizo un segundo análisis a nivel de familia que incluyó secuencias de Tachinidae. Este análisis subsiguiente reveló que el parasitoide se agrupó con alta probabilidad posterior con algunas secuencias del género *Celatoria* colectadas en Costa Rica (Figura 5.4), mientras que otras secuencias colectadas en la misma zona forman un grupo monofilético con la secuencia correspondiente a *Celatoria diabroticae* (Shimer 1871) (proveniente de Estados Unidos), y estas a su vez constituyen el grupo hermano de otros géneros (Figura 5.4).

Por otro lado, las distancias genéticas entre el parasitoide y las secuencias de *Celatoria* sp. que constituyen su grupo hermano es inferior al 4%, mientras que las distancias entre el parasitoide y el resto del conjunto de datos considerado (incluyendo

las otras secuencias asignadas a *Celatoria* sp. y a *Celatoria diabroticae*) alcanzan valores entre 13-16% (Tabla 5.1).

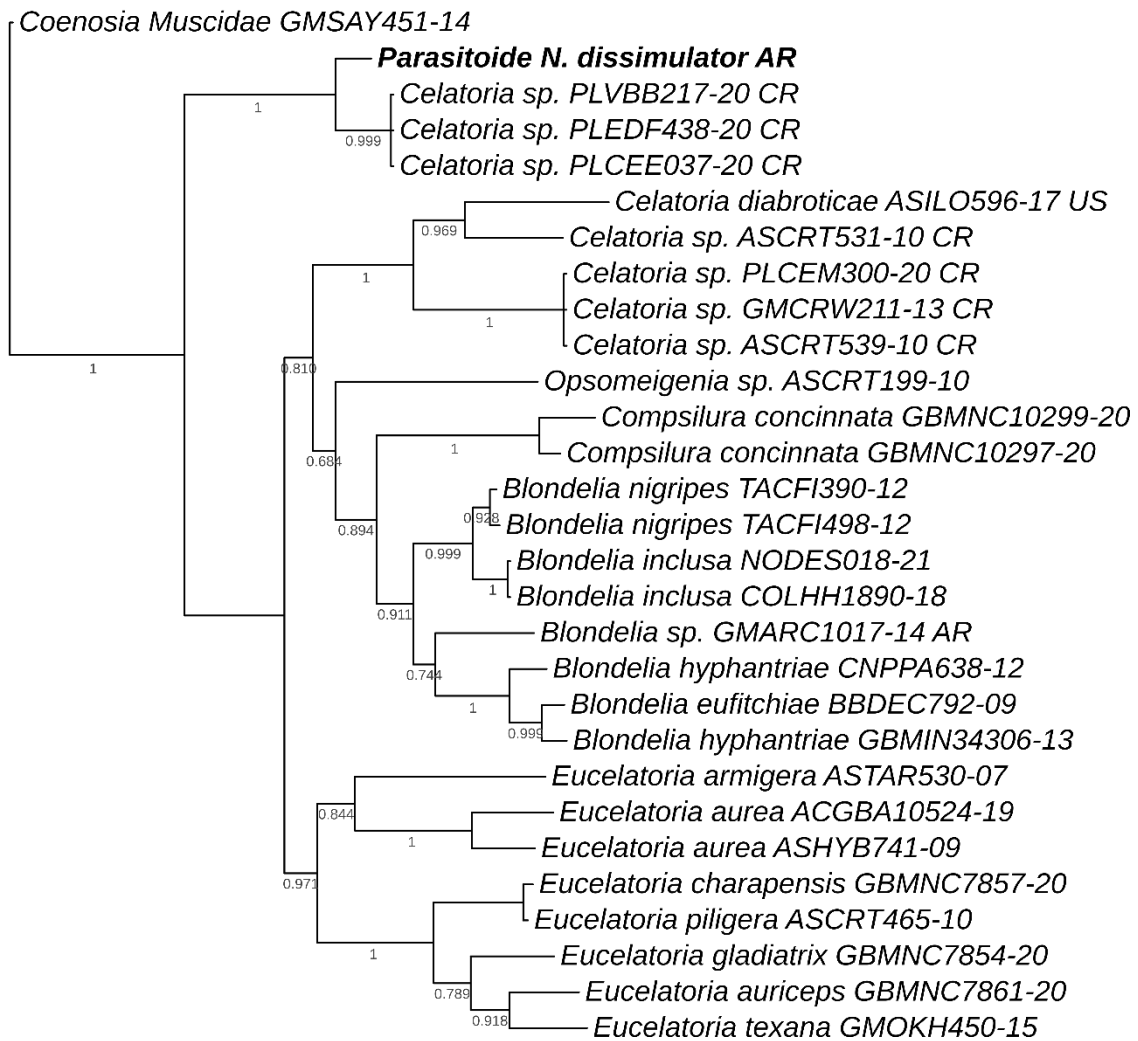
Finalmente, el estado de infección resultó negativo para todas las bacterias evaluadas.



**Figura 5.3** Posición filogenética de la larva del parasitoide hallada en *N. dissimulator* (en negrita) a partir de un análisis de familias considerando las superfamilias Muscoidea y Oestroidea (Diptera) basado en secuencias del gen mitocondrial COI. Los números debajo de las ramas indican el soporte nodal (probabilidad posterior) y la barra de escala indica el número de sustituciones por sitio. Se muestra el número de acceso de la base de datos BOLD en cada secuencia.



Tree scale: 0.1



**Figura 5.4** Posición filogenética de la larva del parasitoid hallada en *N. dissimulator* (en negrita) a partir de un análisis parcial de la familia Tachinidae (Diptera) en base a secuencias del gen mitocondrial COI. Los números debajo de las ramas indican el soporte nodal (probabilidad posterior) y la barra de escala indica el número de sustituciones por sitio. Se muestra el número de acceso de la base de datos BOLD en cada secuencia. Para las secuencias del género *Celatoria* se aclara el país de origen: AR: Argentina, CR: Costa Rica, US: Estados Unidos.

**Tabla 5.1** Distancias genéticas (método de distancias p) entre las especies de la familia Tachinidae (Diptera) utilizadas para la reconstrucción filogenética en base a secuencias del gen mitocondrial COI para la larva del parasitoide hallada en *N. dissimulator*. Los números de acceso corresponden a representantes de los grupos que se detallan en la Figura 5.3. AR: Argentina, CR: Costa Rica.

Taxa	Distancia genética																
Parasitoide de <i>N. dissimulator</i>																	
<i>Celatoria</i> PLVBB217-20 - CR	0,036																
<i>Celatoria diabroticae</i>	0,160	0,156															
<i>Celatoria</i> PLCEM300-20 - CR	0,128	0,113	0,115														
<i>Blondelia hyphantriae</i>	0,131	0,117	0,141	0,115													
<i>Blondelia eufitchiae</i>	0,126	0,112	0,134	0,116	0,024												
<i>Blondelia</i> sp. - AR	0,124	0,106	0,147	0,103	0,061	0,059											
<i>Blondelia inclusa</i>	0,134	0,118	0,135	0,106	0,069	0,059	0,056										
<i>Blondelia nigripes</i>	0,132	0,117	0,131	0,100	0,064	0,060	0,055	0,019									
<i>Compsilura concinnata</i>	0,133	0,122	0,141	0,110	0,092	0,090	0,093	0,087	0,079								
<i>Eucelatoria aurea</i>	0,130	0,123	0,134	0,114	0,112	0,110	0,105	0,116	0,111	0,107							
<i>Eucelatoria gladiatrix</i>	0,143	0,121	0,131	0,120	0,121	0,117	0,119	0,122	0,118	0,112	0,107						
<i>Eucelatoria armigera</i>	0,135	0,133	0,136	0,121	0,116	0,123	0,115	0,121	0,112	0,113	0,091	0,115					
<i>Eucelatoria piligera</i>	0,158	0,126	0,159	0,114	0,130	0,133	0,121	0,123	0,115	0,115	0,117	0,066	0,106				
<i>Eucelatoria charapensis</i>	0,132	0,118	0,128	0,106	0,116	0,120	0,112	0,117	0,110	0,106	0,107	0,059	0,092	0,004			
<i>Eucelatoria texana</i>	0,139	0,131	0,135	0,132	0,119	0,120	0,114	0,119	0,112	0,127	0,115	0,062	0,101	0,070	0,065		
<i>Eucelatoria auriceps</i>	0,132	0,113	0,125	0,120	0,118	0,114	0,114	0,108	0,100	0,116	0,109	0,056	0,097	0,070	0,069	0,049	
<i>Opsoeigenia</i> sp.	0,128	0,118	0,135	0,117	0,105	0,100	0,097	0,084	0,080	0,107	0,120	0,112	0,117	0,123	0,117	0,108	0,108

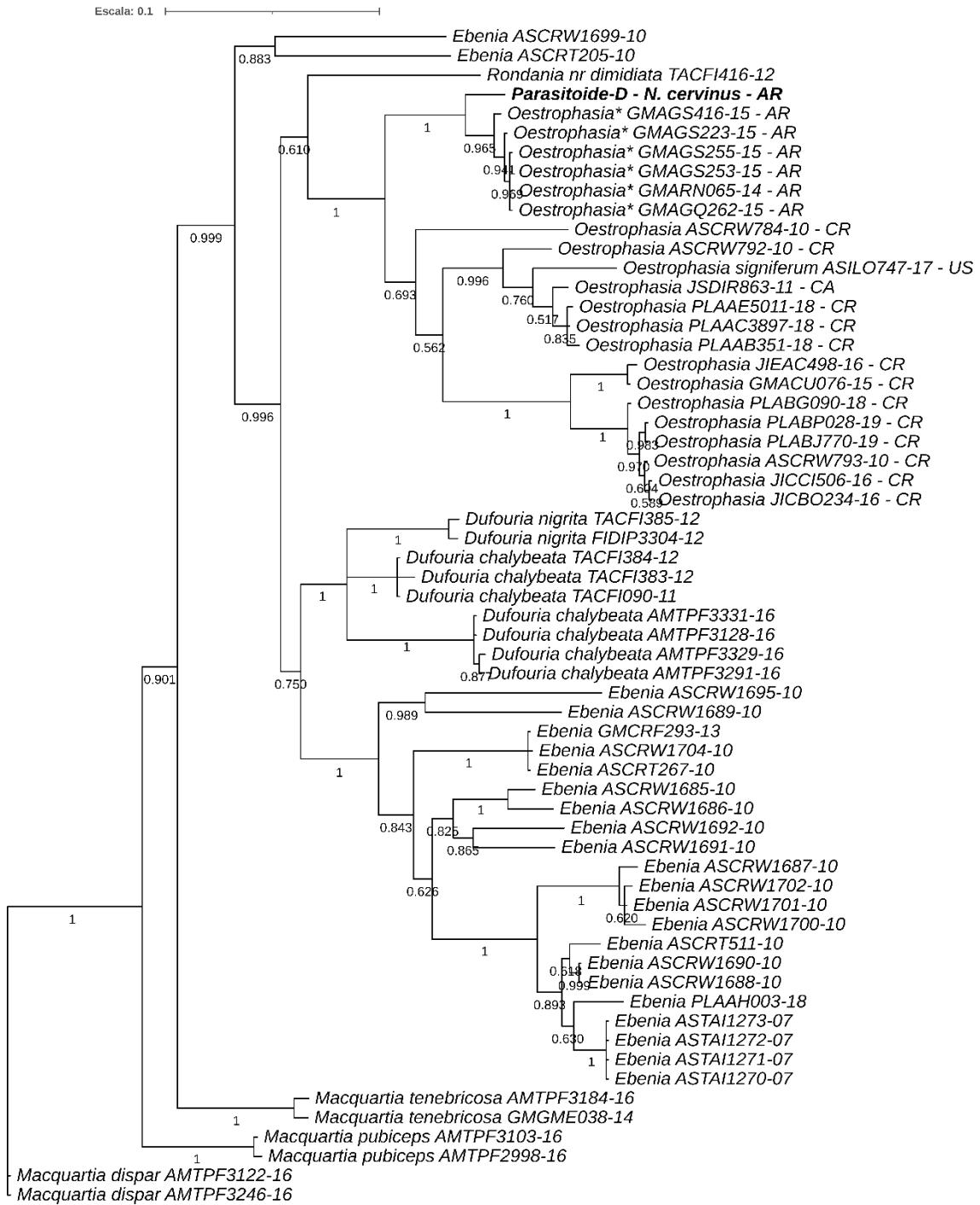
### 5.3.2 Parasitoides de *Naupactus cervinus*

Después de la disección, el 8,33% (1/12) de las hembras de Zárate y el 17% (1/6) de las hembras de Chajarí presentaron larvas en el abdomen.

En base a los resultados obtenidos de los análisis de BLASTn y utilizando la base de datos BOLD, el parasitoide muestreado en Zárate es un díptero (parasitoide-D) que pertenece a la familia Tachinidae (secuencia *COI* de 685 pb; número de acceso GenBank OQ446040), que comparte 88-92% de identidad nucleotídica con el género *Oestrophasia* (Brauer & Bergenstamm 1889) (e.g., número de acceso de GenBank KR673160.1, valor  $E=8e-171$ ).

El análisis a nivel de género muestra que el parasitoide-D está más estrechamente relacionado con muestras de la familia Tachinidae recolectadas en la provincia de Misiones, Argentina (Figura 5.5), que ante la carencia de una identificación a nivel genérico fueron determinadas como *Oestrophasia* sp. por el Dr. Pablo Mulieri, experto en dípteros del Museo Argentino de Ciencias Naturales (Comunicación Personal). Además, todas las muestras argentinas se agruparon con especímenes del género *Oestrophasia* provenientes del hemisferio norte (Figura 5.5). La distancia genética entre el parasitoide-D y las muestras de Misiones es de aproximadamente 3% (Tabla 5.2), mientras que las distancias genéticas entre el parasitoide-D y otras secuencias de *Oestrophasia* spp. de América del Norte y Central oscilan entre el 7 y el 13%. Las distancias genéticas entre el parasitoide-D y los demás géneros considerados en este estudio oscilan entre el 11 y el 12%, mientras que entre los diferentes géneros de taquíidos oscilan entre el 10 y el 14 % (Tabla 5.2).

El diagnóstico de la infección con endosimbiontes bacterianos indicó que el parasitoide-D no está infectado.



**Figura 5.5** Posición filogenética de la larva del parasitoide hallada en *N. cervinus* (en negrita) a partir de un análisis parcial de la familia Tachinidae (Diptera) en base a secuencias del gen mitocondrial COI. Los números debajo de las ramas indican el soporte nodal (probabilidad posterior) y la barra de escala indica el número de sustituciones por sitio. Se muestra el número de acceso de la base de datos BOLD en cada secuencia. Para las secuencias del género *Oestrophasia* se aclara el país de origen. AR: Argentina, CA: Canadá, CR: Costa Rica, US: Estados Unidos.

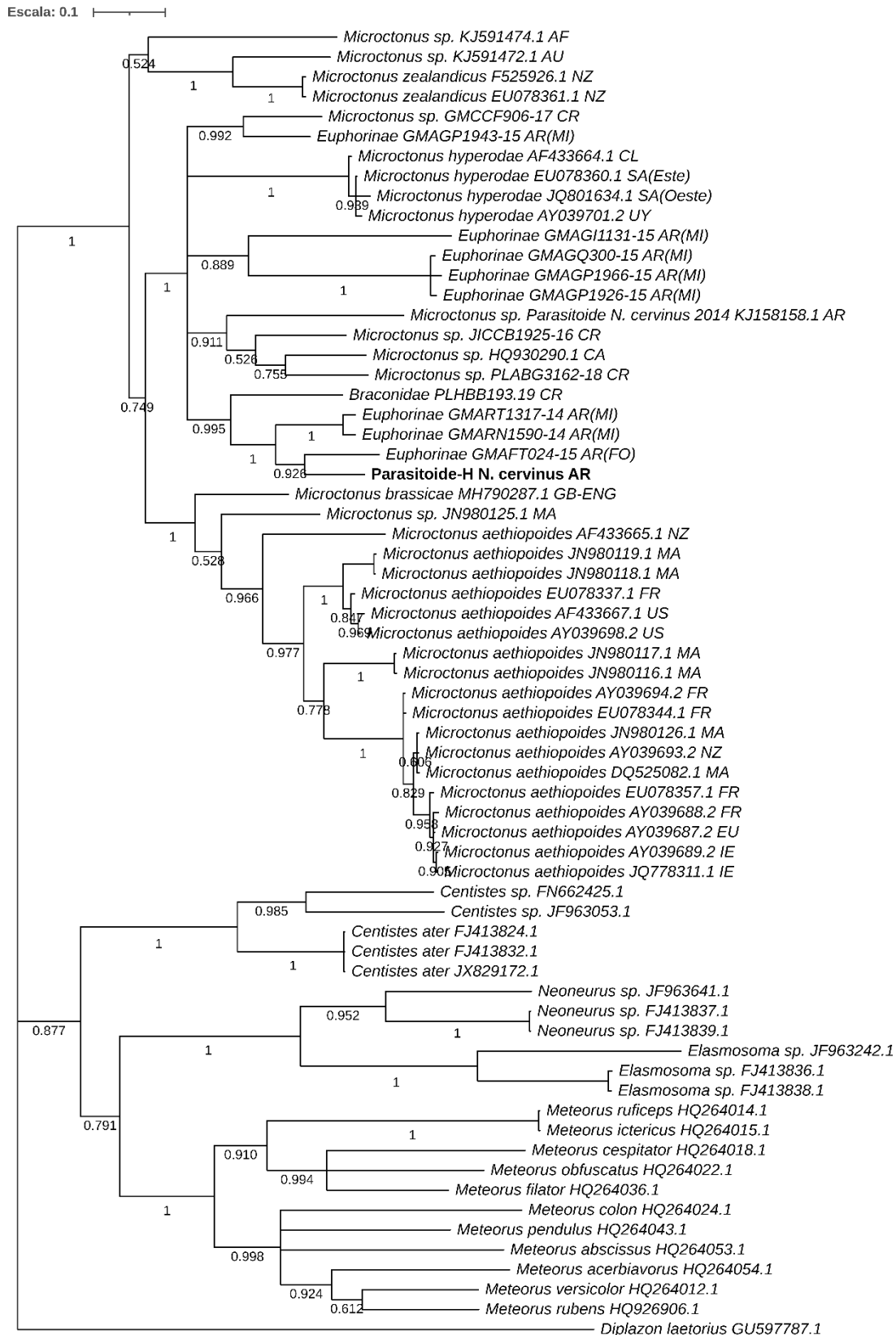
**Tabla 5.2** Distancias genéticas (método de distancias p) entre las especies de la familia Tachinidae (Diptera) utilizadas para la reconstrucción filogenética en base a secuencias del gen mitocondrial COI para la larva del parasitoide hallada en *N. cervinus*. Los números de acceso corresponden a representantes de los grupos que se detallan en la Figura 5.4. \* Distancia promedio entre todas las muestras provenientes de Argentina y el parasitoide-D. CA: Canadá, CR: Costa Rica.

Taxa	Distancia genética											
Parasitoide-D de <i>N. cervinus</i>												
<i>Oestrophia</i> sp. de Misiones*	0,031											
<i>Oestrophia signiferum</i>	0,090	0,089										
<i>Oestrophia</i> sp. - ASCRW784-10 CR	0,101	0,094	0,097									
<i>Oestrophia</i> sp. - ASCRW792-10 CR	0,084	0,081	0,061	0,111								
<i>Oestrophia</i> sp. - PLAAB351-18 CR	0,078	0,076	0,043	0,092	0,039							
<i>Oestrophia</i> sp. - ASCRW793-10 CR	0,127	0,105	0,113	0,108	0,094	0,088						
<i>Oestrophia</i> sp. - GMACU076-15 CR	0,133	0,101	0,116	0,104	0,103	0,093	0,051					
<i>Oestrophia</i> sp. - JSDIR863-11 CA	0,083	0,075	0,041	0,091	0,037	0,015	0,094	0,093				
<i>Rondania dimidiata</i>	0,111	0,107	0,128	0,121	0,143	0,115	0,130	0,116	0,113			
<i>Dufouria chalybeata</i>	0,123	0,108	0,123	0,120	0,147	0,121	0,125	0,123	0,118	0,108		
<i>Dufouria nigrita</i>	0,122	0,106	0,117	0,124	0,136	0,109	0,120	0,129	0,112	0,109	0,080	
<i>Ebenia</i> spp.	0,128	0,129	0,135	0,142	0,146	0,125	0,139	0,140	0,122	0,126	0,119	0,121

El parasitoide colectado en Chajarí es un himenóptero (parasitoide-H), que pertenece a la familia Braconidae (secuencia *COI* de 693 pb; número de acceso de GenBank OQ446564) y comparte 82-88% de identidad nucleotídica con el género *Microctonus* (e.g., número de acceso de GenBank AB563731.1, valor  $E=1e-137$ ).

El análisis del conjunto de datos de Braconidae indica que el parasitoide-H estudiado se encuentra dentro del género *Microctonus* con un alto soporte nodal (Figura 5.6). Las secuencias más estrechamente relacionadas con este espécimen son las de varios ejemplares de Euphorinae colectados en Formosa y Misiones (Argentina), que no habían sido identificadas a nivel de género al momento de su publicación en la base de datos y, según nuestro análisis, también pertenecerían al género *Microctonus* (Figura 5.6). Las distancias genéticas entre el parasitoide-H y las muestras de Argentina, incluido el parasitoide del género *Microctonus* reportado para *N. cervinus* por Rodriguero et al., (2014) oscila entre 8-15%. Las distancias genéticas entre el parasitoide-H y los demás miembros del género *Microctonus* incluidos en el análisis oscilan entre el 10 y el 15%, mientras que las distancias con los otros géneros de Braconidae analizados aquí son mayores, entre el 20 y el 23% (Tabla 5.3).

El diagnóstico de la infección con *Wolbachia* fue positivo para el parasitoide-H. Del total de las secuencias utilizadas por el sistema MLST solo se recuperó la correspondiente al gen *gatB* y correspondió al alelo 127, coincidiendo con el de la cepa *wNau5* de *N. cervinus*.



**Figura 5.6** Posición filogenética de la larva del parasitoide hallada en *N. cervinus* (en negrita) a partir de un análisis parcial de la familia Braconidae (Hymenoptera) en base a secuencias del gen mitocondrial COI. Los números debajo de las ramas indican el soporte nodal (probabilidad posterior) y la barra de escala indica el número de sustituciones por sitio. Se muestra el número de acceso de la base de datos BOLD de cada secuencia. Para las secuencias del género *Microctonus* se aclara el lugar de origen. AF: África, AR: Argentina, (FO): Formosa, (MI): Misiones, AU: Australia, CA: Canadá, CL: Chile, CR: Costa Rica, EU: Europa, FR: Francia, GB-ENG: Inglaterra, IE: Irlanda, MA: Marruecos, NZ: Nueva Zelanda, SA: Sudamérica, US: Estados Unidos, UY: Uruguay.

**Tabla 5.3** Distancias genéticas (método de distancias p) entre las especies de la familia Braconidae (Hymenoptera) utilizadas para la reconstrucción filogenética en base a secuencias del gen mitocondrial COI para la larva del parasitoide hallada en *N. cervinus*. Los números de acceso corresponden a representantes de los grupos que se detallan en la Figura 5.5. AF: África, AR: Argentina, (FO): Formosa, (MI): Misiones, AU: Australia, CA: Canadá, CR: Costa Rica

Taxa	Distancia genética																								
Parasitoide-H de <i>N. cervinus</i>																									
Euphorinae - AR(FO)	0,083																								
Euphorinae GMARN1590-14 - AR(MI)	0,088	0,103																							
Braconidae - CR	0,110	0,130	0,109																						
<i>Microctonus sp.</i> <sup>a</sup>	0,144	0,160	0,146	0,154																					
<i>Microctonus sp.</i> JICCB1925-16 - CR	0,132	0,152	0,139	0,131	0,137																				
<i>Microctonus sp.</i> PLABG3162-18 - CR	0,129	0,142	0,139	0,129	0,125	0,099																			
<i>Microctonus sp.</i> - CA	0,138	0,134	0,133	0,127	0,131	0,107	0,086																		
Euphorinae GMAGI1131-15 - AR(MI)	0,158	0,162	0,161	0,162	0,170	0,168	0,166	0,174																	
Euphorinae GMAGP1926-15 - AR(MI)	0,155	0,166	0,152	0,159	0,160	0,137	0,136	0,144	0,167																
Euphorinae GMAGP1943-15 - AR(MI)	0,128	0,144	0,130	0,118	0,139	0,137	0,112	0,129	0,168	0,152															
<i>Microctonus sp.</i> GMCCF906-17 - CR	0,129	0,145	0,133	0,126	0,129	0,120	0,119	0,125	0,157	0,155	0,085														
<i>Microctonus hyperodae</i> Este <sup>b</sup>	0,130	0,140	0,151	0,122	0,143	0,136	0,120	0,129	0,170	0,160	0,135	0,133													
<i>Microctonus hyperodae</i> Oeste <sup>b</sup>	0,138	0,144	0,150	0,121	0,144	0,136	0,122	0,130	0,168	0,164	0,139	0,134	0,011												
<i>Microctonus sp.</i> - AF	0,162	0,166	0,151	0,144	0,178	0,155	0,138	0,136	0,186	0,169	0,154	0,162	0,163	0,162											
<i>Microctonus sp.</i> - AU	0,131	0,154	0,156	0,135	0,154	0,147	0,133	0,144	0,167	0,168	0,151	0,153	0,133	0,138	0,145										
<i>Microctonus zealandicus</i>	0,125	0,146	0,152	0,137	0,155	0,141	0,137	0,139	0,178	0,173	0,147	0,146	0,135	0,139	0,148	0,099									
<i>Microctonus aethiopoides</i> - <i>Hypera sp.</i> <sup>c</sup>	0,140	0,154	0,150	0,141	0,158	0,137	0,130	0,144	0,170	0,160	0,128	0,139	0,154	0,158	0,158	0,142	0,140								
<i>Microctonus aethiopoides</i> - <i>Sitona sp.</i> <sup>c</sup>	0,156	0,162	0,157	0,157	0,166	0,164	0,148	0,156	0,159	0,163	0,144	0,134	0,160	0,166	0,170	0,149	0,163	0,090							
<i>Microctonus brassicae</i>	0,121	0,149	0,144	0,114	0,139	0,120	0,114	0,125	0,173	0,149	0,123	0,122	0,109	0,112	0,128	0,128	0,132	0,116	0,110						
<i>Centistes spp.</i>	0,213	0,215	0,200	0,213	0,223	0,210	0,209	0,217	0,236	0,225	0,219	0,217	0,229	0,228	0,223	0,208	0,204	0,219	0,231	0,220					
<i>Elasmosoma spp.</i>	0,231	0,238	0,231	0,238	0,247	0,251	0,249	0,237	0,254	0,249	0,237	0,243	0,247	0,246	0,232	0,245	0,242	0,247	0,252	0,234	0,226				
<i>Meteorus spp.</i>	0,203	0,210	0,202	0,195	0,206	0,201	0,195	0,200	0,212	0,209	0,202	0,193	0,198	0,199	0,203	0,200	0,204	0,198	0,205	0,192	0,222	0,244			
<i>Neoneurus spp.</i>	0,214	0,231	0,220	0,219	0,238	0,228	0,212	0,221	0,244	0,241	0,220	0,226	0,220	0,221	0,203	0,204	0,223	0,223	0,236	0,216	0,229	0,213	0,218		

<sup>a</sup> Parasitoide reportado por Rodriguero et al., (2014) para *N. cervinus*.

<sup>b</sup> Biotipos Este y Oeste de *M. hyperodae* de acuerdo a Iline & Phillips, (2004)

<sup>c</sup> Biotipos de *M. aethiopoides* de acuerdo a su gorgojo hospedador de acuerdo a Vink et al., (2003, 2012), Phillips et al., (2012), y Vink, (2012)



## 5.4 Discusión

Este es el primer registro de la familia de dípteros Tachinidae como parasitoides tanto de *N. cervinus* como de *N. dissimulator*. Además, se reporta por primera vez la existencia de una especie del género *Oestrophasia* en Argentina. También se reporta una segunda especie de la familia de himenópteros Braconidae, perteneciente al género *Microctonus*, que utiliza a *N. cervinus* como hospedador.

Aunque se conocen alrededor de 784 géneros de moscas de la familia Tachinidae en la región Neotropical, una abrumadora cantidad aún no ha sido descrita (O'Hara & Henderson, 2020; O'Hara et al., 2020). La correcta identificación de los Tachinidae Neotropicales conlleva varios problemas. Por un lado, el catálogo de taquínidos de Latinoamérica (Guimarães, 1971) no ha sido actualizado ni adaptado a una clasificación moderna de la familia (O'Hara, 2013). Por otro lado, existen diferentes claves de taxones supraespecíficos y pocas colecciones de referencia disponibles (Toma, 2012).

Las moscas de la familia Tachinidae son conocidos parasitoides de gorgojos que generalmente infectan etapas larvarias (Waggy & Beardsley, 1974; Lanteri et al., 1998; Phillips et al., 2000; Wood & Cave, 2006). Las especies del género *Celatoria* ponen huevos que contienen larvas completamente desarrolladas directamente en el hospedador adulto mediante el uso de una estructura perforante separada del ovopositor (Zhang et al., 2004). Este género ha sido ampliamente estudiado en relación al género de crisomélidos *Diabrotica* (Chevrolat 1836) (Coleoptera, Chrysomelidae), que incluyen algunas de las especies en condición de plaga más importantes y devastadoras del continente Americano (Cabrera Walsh, 2005) y en el cual también se encuentra extendida la infección con *Wolbachia* (Clark et al., 2001), aunque no se han encontrado registros de que parasitoidicen curculiónidos. Por otra parte, las especies de *Oestrophasia* infectan a los

gorgojos adultos cuando éstos accidentalmente comen los huevos “microtipo”<sup>23</sup> puestos en las hojas (Santis, 2017) y que luego eclosionan dentro del tracto digestivo del hospedador (Clausen, 1940). Este género ha sido reportado como parasitoide de otros curculiónidos, como especies del complejo *Amphidees* (Schoenherr 1842), comúnmente llamados gorgojos del manzano (Sánchez-Peña et al., 2001; Velázquez et al., 2002) y *Artipus floridanus* (Horn 1876), una plaga de cítricos en Florida y varios países del Caribe (Kovarik & Reitz, 2005). Las moscas taquínidas se utilizan como agentes de control biológico en varios cultivos (Grenier, 1988; Stireman et al., 2006), por lo que el informe de nuevas interacciones hospedador-parasitoide puede contribuir a las estrategias de manejo de plagas.

Los análisis de *DNA barcoding* y posteriores reconstrucciones filogenéticas realizados para el parasitoide de *N. dissimulator* indicaron que la secuencia incógnita se agrupó con secuencias colectadas en Costa Rica. La distancia genética intragrupo (menor al 4%) se encuentra dentro de los límites de variación intraespecífica para secuencias *COI* de taquínidos (ca. 7%; Fleming et al., 2015) y dípteros en general (ca. 9%; Hebert et al., 2003b). Además, Dittrich et al., (2006) reportaron una divergencia genética del 5,3% entre diferentes biotipos del taquínido *Sturmiopsis parasitica* (Curran 1939). Esto sugiere que el parasitoide identificado en este trabajo y las secuencias recuperadas en Costa Rica pertenecen a la misma especie. Sin embargo, este grupo monofilético no se agrupa con el resto de las secuencias de *Celatoria* disponibles y las distancias genéticas son superiores a los valores de variación intraespecífica esperados (13-16%), por lo que es factible que sean especies distintas, constituyendo el género *Celatoria* un grupo polifilético. *Celatoria*

---

<sup>23</sup> Los huevos microtipo de la familia Tachinidae son los huevos más pequeños de los que hay registro en insectos (Cevallos, 1994). En general, miden entre 0,02 y 0,2 mm de largo, siendo 0,44 mm el largo del huevo microtipo más grande registrado para la especie *Chaetogaedia monticola* (Bigot 1887) (Clausen, 1940).

*bosqi* (Blanchard 1937) posee distribución Neotropical y se encuentra en Argentina de manera tal que su rango de distribución se solapa con el de *N. dissimulator* (Cabrera Walsh, 2005), lo que la convierte en una buena candidata para continuar el estudio de las relaciones hospedador-parasitoide en la tribu Naupactini.

Por otro lado, se confirmó la identidad del parasitoide-D de *N. cervinus* como *Oestrophasia* sp. ya que se recuperó un grupo monofilético compuesto por las muestras argentinas y las demás secuencias de *Oestrophasia* spp. consideradas en este estudio. La baja divergencia genética detectada entre el parasitoide-D y el grupo Misiones (3%) sugiere que todas las muestras argentinas podrían pertenecer a una única especie para la cual no hay registros de la secuencia *COI* depositadas en las bases de datos de acceso público. Se necesita profundizar el estudio de los taquínidos argentinos y su relación con la tribu Naupactini para corroborar esta hipótesis y establecer de qué especie se podría tratar. Cabe mencionar que el árbol filogenético que se construyó con registros de *Oestrophasia* spp. de Costa Rica, Estados Unidos, Canadá y Argentina mostró una clara separación basada en el origen geográfico de las muestras (Norteamérica vs. Argentina, con 100% de soporte nodal). Además, las distancias genéticas entre estos especímenes y los de Argentina oscilaron entre 7-13%, lo que sugiere que pertenecen a especies diferentes. Estos resultados enfatizan la necesidad de estudiar la diversidad de taquínidos americanos.

El parasitoide-H de *N. cervinus* sin duda pertenece al género *Microctonus*, como lo indica el análisis realizado a nivel de género. Hebert et al., (2003b) encontraron una divergencia genética media del 11,5% para los himenópteros que pertenecen a diferentes especies. Esto fue confirmado por Rugman-Jones et al., (2009), quienes reportaron que el rango de divergencia genética entre especies del complejo de especies de braconidos *Psytalia concolor* (Szépligeti 1910) fue de 4,8-13,9%. En el presente trabajo se encontró

una distancia genética de 12-15% entre el parasitoide-H y las especies de *Microctonus* estudiadas, a saber: *M. aethiopoides* de la Región Paleártica; *Microctonus zealandicus* (Shaw 1993) de Nueva Zelanda; *Microctonus brassicae* (Haeselbarth 2008) del Reino Unido y *Microctonus hyperodae* (Loan 1974) del Neotrópico. Por lo tanto, es posible concluir que el parasitoide-H de *N. cervinus* pertenece a otra especie.

Las distancias genéticas entre las secuencias del parasitoide-H y de los otros ejemplares de *Microctonus* spp. depositadas en la base de datos BOLD para Argentina, incluyendo el primer registro de *Microctonus* sp. parasitoide de *N. cervinus* (Rodríguez et al., 2014), sugieren la presencia de varias especies de *Microctonus* no descritas aún en este país. Otra posibilidad es que el parasitoide aquí reportado pertenezca a una especie sudamericana descrita únicamente en base a la morfología del adulto. Este puede ser el caso de *Microctonus audax* (Muesebeck 1958) o *Microctonus brasiliensis* (Loan & Lloyd 1974), con rangos geográficos superpuestos al de *N. cervinus* (Muesebeck, 1958; Loan & Lloyd, 1974; Rodríguez et al., 2014).

El hecho de que las secuencias de Argentina, Costa Rica y Canadá parecieran estar relacionadas entre sí y no se agruparan con otras especies de *Microctonus*, junto con las distancias genéticas observadas entre ellas, sugiere la existencia de una gran diversidad de *Microctonus* spp. en el continente Americano. Muchas especies de este género juegan un papel importante en el control biológico de plagas de gorgojos como *M. aethiopoides* contra *Hypera postica* (Gyllenhal 1813) en los Estados Unidos (Kingsley et al., 1993; Radcliffe & Flanders, 1998) y *Sitona discoideus* (Gyllenhal 1834) en Nueva Zelanda (Gerard et al., 2007; Phillips et al., 2007), así como *M. hyperodae* contra *Listronotus bonariensis* (Kuschel 1955) (Goldson et al., 1993). En este contexto, los estudios de diversidad basados en datos moleculares de *Microctonus* podrían contribuir a la mejora de las estrategias de control biológico.

La transmisión horizontal exitosa de *Wolbachia* es frecuente en sistemas hospedador-parasitoide, principalmente del hospedador al parasitoide (Werren et al., 1995; Vavre et al., 1999). Ciertamente, esta dirección de transferencia ha sido sustentada experimentalmente (e.g., Heath et al., 1999; Huigens et al., 2000, 2004). Sin embargo, también hay evidencia que sugiere una transmisión exitosa de hospedadores infectados a otros no infectados mediada por parasitoides (Ahmed et al., 2015; Brown & Lloyd, 2015). Para que esto ocurra, las bacterias transmitidas por el parasitoide necesitan llegar a la línea germinal del hospedador. En el caso de los parasitoides koinobiontes, que permiten la actividad del hospedador mientras los embriones del parasitoide se desarrollan (Askew & Shaw, 1986), las bacterias podrían colonizar la descendencia del hospedador si este último es capaz de reproducirse después de adquirir el parasitoide. Se ha demostrado que *Wolbachia* logra alcanzar la línea germinal luego de ser inyectada en el abdomen de *D. melanogaster* (Frydman et al., 2006). Entonces, si ocurriera una respuesta inmunitaria incompleta en el hospedador (i.e., que provocara la muerte del parasitoide mas no así de sus bacterias), la muerte de una larva parasitoide infectada con *Wolbachia* podría provocar la liberación de esta bacteria al celoma del hospedador (Cordaux et al., 2001; Michel-Salzat et al., 2001), posibilitando el establecimiento de una infección en la línea germinal. La hipótesis de la "aguja sucia"<sup>24</sup> (*sensu* Houck et al., 1991) también puede estar implicada en la transferencia horizontal del parasitoide al hospedador (Gehrer & Vorburger, 2012). Para los sistemas estudiados en este trabajo, solo podemos decir que dado que los parasitoides que encontramos son koinobiontes, la transmisión horizontal podría darse en ambos sentidos, a diferencia de lo que podría ocurrir con los parasitoides

---

<sup>24</sup> Mecanismo mediante el cual un parasitoide no infectado recoge una bacteria cuando parasita a un hospedador infectado y luego transmite la bacteria a un nuevo hospedador no infectado en un segundo evento de parasitismo (Ahmed et al., 2015; Gehrer y Vorburger, 2012). Los órganos involucrados en esta transmisión pueden ser el ovipositor o las piezas bucales de los parasitoides (Ahmed et al., 2015; Gehrer y Vorburger, 2012).

idiobiontes, que rápidamente provocan la muerte de sus hospedadores, en los que la única dirección posible es que la bacteria se transfiera del hospedador al parasitoide.

Inferir un evento de transferencia horizontal de *Wolbachia* y la dirección de la transmisión en poblaciones naturales es un desafío. La evaluación de la dirección requiere, en primer lugar, caracterizar la infección en ambas poblaciones y luego investigar su distribución geográfica a nivel de población y comunidad (Johannesen, 2017; Hou et al., 2020). Elías-Costa et al., (2019) identificaron dos cepas de *Wolbachia* en *P. postfasciatus*, tal que la mayoría de las poblaciones estudiadas estaban infectadas con la cepa wNau1; sin embargo, dos poblaciones albergaban la cepa wNau5, cuyo único hospedador conocido hasta la fecha es *N. cervinus* (Rodríguez et al., 2010a), especie en la cual la infección se halla fijada (Rodríguez et al., 2010b). El hecho de que estas últimas poblaciones coexistan con *N. cervinus*, sumado a la prevalencia de las infecciones en consideración, sugiere que la dirección de la transferencia habría sido desde *N. cervinus* a *P. postfasciatus*, posiblemente a través de parasitoides.

El parasitoide-H resultó infectado con *Wolbachia*, muy probablemente con la misma cepa presente en su hospedador. El alelo 127 del gen *gatB* solo ha sido reportado para la cepa wNau5 (se consultó la base de datos de genotipos multilocus de *Wolbachia* en: <https://pubmlst.org/organisms/wolbachia-spp>), que a su vez es característica de *N. cervinus* (Rodríguez et al., 2010a). Este hecho podría evidenciar un evento de transferencia horizontal que implicara la participación de parasitoides y puede suponer el comienzo de una nueva línea de investigación. Por otra parte, la coincidencia en la identidad de las cepas de ambos insectos puede deberse a otras causas además de la transferencia horizontal (Hughes et al., 2004; Johannesen, 2017), pero para entenderlas es necesario profundizar en la historia evolutiva común entre simbiosis, parasitoides y hospedadores.

### 5.4.1 Consideraciones finales

El control biológico de insectos plaga se plantea como una alternativa importante al uso de pesticidas (De Clercq et al., 2011), y los parasitoides se consideran herramientas potencialmente útiles. El establecimiento de especies en nuevos ambientes se ha vuelto más frecuente, por lo que la caracterización de enemigos naturales es especialmente importante en casos como el de *N. cervinus*, que tiene una gran capacidad colonizadora (Rodríguez et al., 2016, 2019, 2023) y ha demostrado ser económicamente dañina.

El análisis de *DNA barcoding* permitió la identificación de dos parasitoides de *N. cervinus* hasta el momento inéditos, y reportar el primer caso de parasitoidismo en *N. dissimulator* a nivel de género, aún sin haber podido concretar la identificación morfológica de larvas y/o adultos. Por lo tanto, los “códigos de barras” son valiosos cuando hay escasa información sobre un grupo taxonómico dentro de una región geográfica específica (e.g., moscas taquínidas en la región neotropical).

Que el parasitoide-H y su hospedador compartan el alelo que caracteriza a la cepa *wNau5* es sumamente sugestivo y permite hipotetizar que los parasitoides podrían actuar como vehículos para la transferencia horizontal en la tribu Naupactini. Por el contrario, la infección con los endosimbiontes bacterianos estudiados no se detectó en ninguno de los taquínidos estudiados, aunque este diagnóstico negativo no descarta el potencial de este tipo de transmisión. Se necesitan más estudios de las poblaciones de *N. cervinus* y *N. dissimulator* para aclarar las relaciones entre hospedador, parasitoide y simbiote.

Finalmente, es fundamental ampliar la forma en la cual se exploran las relaciones entre hospedadores y parasitoides para incluir a la microbiota. Es importante comprender el papel que juegan los simbioses en la interacción hospedador-parasitoide y cómo esta interacción podría modelar la transferencia horizontal y consiguiente expansión del simbiote.

**Páginas 171 a 195 eliminadas a pedido del autor.**



---

## REFERENCIAS

---

- Ahmed, F.E., Hussein, L., Gouda, M.M., Vos, P.W., Ahmed, N.C., 2018. Melt curve analysis for interpretation of MicroRNAs' gene expression data in foods. *Trends in Research*, 1(1), pp.1-2.
- Ahmed, M.Z., Li, S.J., Xue, X., Yin, X.J., Ren, S.X., Jiggins, F.M., Greeff, J.M., Qiu, B.L., 2015. The intracellular bacterium *Wolbachia* uses parasitoid wasps as phoretic vectors for efficient horizontal transmission. *PLoS pathogens*, 11(2), p.e1004672.
- Akman, L., Yamashita, A., Watanabe, H., Oshima, K., Shiba, T., Hattori, M., Aksoy, S., 2002. Genome sequence of the endocellular obligate symbiont of tsetse flies, *Wigglesworthia glossinidia*. *Nature genetics*, 32(3), pp.402-407.
- Alonso-Zarazaga, M.A., 1999. A world catalogue of families and genera of Curculionoidea (Insecta: Coleoptera) (excepting Scolytidae and Platypodidae). *Entomopraxis*, Barcelona.
- Altekar, G., Dwarkadas, S., Huelsenbeck, J.P., Ronquist, F., 2004. Parallel Metropolis coupled Markov chain Monte Carlo for Bayesian phylogenetic inference. *Bioinformatics* 20, 407–415. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btg427>
- Altschul, S.F., 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research* 25, 3389–3402. <https://doi.org/10.1093/nar/25.17.3389>
- Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W., Lipman, D.J., 1990. Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology* 215, 403–410. [https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(05\)80360-2](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(05)80360-2)
- Anbutsu, H. & Fukatsu, T., 2011. *Spiroplasma* as a model insect endosymbiont. *Environmental microbiology reports*, 3(2), pp.144-153.
- Andrews, S., 2010. FastQC: A Quality Control Tool for High Throughput Sequence Data [Online]. Available online at: <http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>
- Arakaki, N., Miyoshi, T., Noda, H., 2001. *Wolbachia*-mediated parthenogenesis in the predatory thrips *Franklinothrips vespiformis* (Thysanoptera: Insecta). *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 268(1471), pp.1011-1016.
- Arthofer, W., Riegler, M., Avtzis, D.N., Stauffer, C., 2009. Evidence for low-titre infections in insect symbiosis: *Wolbachia* in the bark beetle *Pityogenes chalcographus* (Coleoptera, Scolytinae). *Environmental Microbiology*, 11(8), pp.1923-1933.
- Artigas J (1994) *Entomología económica*, vol 2. Universidad de Concepción, Chile
- Asimwe, P., Kelly, S.E., Hunter, M.S., 2014. Symbiont infection affects whitefly dynamics in the field. *Basic and applied ecology*, 15(6), pp.507-515.
- Askew, R.R. & Shaw, M. R., 1986. Parasitoid communities: their size, structure and development. In: Waage J, Greathead D eds. *Insect parasitoids*. London: Academic Press, 225–264.
- Bailly-Bechet, M., Martins-Simões, P., Szöllösi, G.J., Mialdea, G., Sagot, M.F., Charlat, S., 2017. How long does *Wolbachia* remain on board?. *Molecular Biology and Evolution*, 34(5), pp.1183-1193.
- Baldo, L., Dunning Hotopp, J.C., Jolley, K.A., Bordenstein, S.R., Biber, S.A., Choudhury, R.R., Hayashi, C., Maiden, M.C., Tettelin, H., Werren, J.H., 2006. Multilocus sequence typing

- system for the endosymbiont *Wolbachia pipientis*. Applied and environmental microbiology, 72(11), pp.7098-7110.
- Ballinger, M.J. & Perlman, S.J., 2019. The defensive *Spiroplasma*. Current opinion in insect science, 32, pp.36-41.
- Barker, G.M., 2006. Predation on aphids by the herbivorous weevil *Listronotus bonariensis* (Kuschel) (Coleoptera: Curculionidae, Brachycerinae). The Coleopterists Bulletin, 60(2), pp.164-165.
- Barratt, B.I.P., Evans, A.A., Ferguson, C.M., McNeill, M.R., Proffitt, J.R., Barker, G.M., 1998. Curculionoidea (Insecta: Coleoptera) of New Zealand agricultural grassland and lucerne as potential non-target hosts of the parasitoids *Microctonus aethioides* Loan and *Microctonus hyperodae* Loan (Hymenoptera: Braconidae). New Zealand Journal of Zoology, 25(1), pp.47-63.
- Bates, D., Maechler, M., Bolker, B., Walker, S., 2015. Fitting Linear Mixed-Effects Models Using lme4. Journal of Statistical Software, 67(1), 1-48. doi:10.18637/jss.v067.i01.
- Bell, G., 1982. The Masterpiece of Nature: The Evolution and Genetics of Sexuality (1st ed.). Routledge. <https://doi.org/10.4324/9780429322884>
- Besansky, N.J., Severson, D.W., Ferdig, M.T., 2003. DNA barcoding of parasites and invertebrate disease vectors: what you don't know can hurt you. Trends in parasitology, 19(12), pp.545-546.
- Binnington, K.C. & Hoffmann, A.A., 1989. *Wolbachia*-like organisms and cytoplasmic incompatibility in *Drosophila simulans*. Journal of Invertebrate Pathology, 54(3), pp.344-352.
- Blanc, G., Ogata, H., Robert, C., Audic, S., Claverie, J.M., Raoult, D., 2007. Lateral gene transfer between obligate intracellular bacteria: evidence from the *Rickettsia massiliae* genome. Genome Research, 17(11), pp.1657-1664.
- Bonnet, C., 1745. Traité D'Insectologie; Ou...: Observations Sur Quelques Espèces De Vers D'Eau Douce, Qui coupés par morceaux, deviennent autant d'Animaux complets (Vol. 2). Durand.
- Bordenstein, S.R. & Bordenstein, S.R., 2011. Temperature affects the tripartite interactions between bacteriophage WO, *Wolbachia*, and cytoplasmic incompatibility. PloS one, 6(12), p.e29106.
- Bordenstein, S.R., O'Hara, F.P., Werren, J.H., 2001. *Wolbachia*-induced incompatibility precedes other hybrid incompatibilities in *Nasonia*. Nature, 409(6821), pp.707-710.
- Bordenstein, S.R. & Wernegreen, J.J., 2004. Bacteriophage flux in endosymbionts (*Wolbachia*): infection frequency, lateral transfer, and recombination rates. Molecular biology and evolution, 21(10), pp.1981-1991.
- Bosq, J., 1943. Segunda lista de Coleópteros de la República Argentina dañinos a la agricultura. Direc. Sanidad Vegetal, Minist. Agric. Nación. Buenos Aires.
- Boyden, A., 1950. Is parthenogenesis sexual or asexual reproduction?. Nature, 166(4228), pp.820-820.
- Braig, H.R., Turner, B.D., Perotti, M.A., 2008. Symbiotic *Rickettsia*. In Insect Symbiosis, Volume 3 (pp. 239-268). CRC Press.
- Breeuwer, J.A. & Werren, J.H., 1993. Cytoplasmic incompatibility and bacterial density in *Nasonia vitripennis*. Genetics, 135(2), pp.565-574.

- Brown, A.M., Wasala, S.K., Howe, D.K., Peetz, A.B., Zasada, I.A., Denver, D.R., 2016. Genomic evidence for plant-parasitic nematodes as the earliest *Wolbachia* hosts. *Scientific Reports*, 6(1), p.34955.
- Brown, A.N. & Lloyd, V.K., 2015. Evidence for horizontal transfer of *Wolbachia* by a *Drosophila* mite. *Experimental and Applied Acarology*, 66(3), pp.301-311.
- Brown, T.A., 2002. Genome anatomies. In *Genomes*. 2nd edition. Oxford: Wiley-Liss. PMID: 20821850.
- Brucker, R.M. & Bordenstein, S.R., 2012. Speciation by symbiosis. *Trends in ecology and evolution*, 27(8), pp.443-451.
- Brumin, M., Kontsedalov, S., Ghanim, M., 2011. *Rickettsia* influences thermotolerance in the whitefly *Bemisia tabaci* B biotype. *Insect Science*, 18(1), pp.57-66.
- Brumin, M., Levy, M., Ghanim, M., 2012. Transovarial transmission of *Rickettsia* spp. and organ-specific infection of the whitefly *Bemisia tabaci*. *Applied and environmental microbiology*, 78(16), pp.5565-5574.
- Brynnel, E.U., Kurland, C.G., Moran, N.A., Andersson, S.G., 1998. Evolutionary rates for tuf genes in endosymbionts of aphids. *Molecular biology and evolution*, 15(5), pp.574-582.
- Bustin, S.A., Benes, V., Garson, J.A., Hellemans, J., Huggett, J., Kubista, M., Mueller, R., Nolan, T., Pfaffl, M.W., Shipley, G.L., Vandesompele, J., 2009. The MIQE Guidelines: *Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments*. *Clinical Chemistry*, 55(4), pp.611-622.
- Caballero, V.C., 1968. Control y biología del burrito del durazno: *Naupactus xanthographus* (Coleoptera: Curculionidae). *Simiente (Chile)* 38(5-6): 23-25.
- Cabrera Walsh, G., 2005. Diabroticina (Coleoptera : Chrysomelidae: Galerucinae) de la Argentina y el Cono Sur: una visión biogeográfica y evolutiva de su biología y la de sus enemigos naturales, en relación con la factibilidad del control biológico de las especies plagas. (Tesis Doctoral. Universidad de Buenos Aires. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales.). Recuperado de [http://hdl.handle.net/20.500.12110/tesis\\_n3865\\_CabreraWalsh](http://hdl.handle.net/20.500.12110/tesis_n3865_CabreraWalsh)
- Cabrio, V., del Rio, M. G., Fernandez Goya, L., Confalonieri, V. A., Lanteri, A. A., Rodriguero, M. S., 2022. Infección con *Wolbachia* en gorgojos de la tribu Naupactini (Coleoptera: Curculionidae): la filogenia importa XI Congreso Argentino de Entomología y XII Congreso Latinoamericano de Entomología Lugar: La Plata.
- Cao, Y., Yu, M., Dong, G., Chen, B., Zhang, B., 2020. Digital PCR as an emerging tool for monitoring of microbial biodegradation. *Molecules*, 25(3), p.706.
- Caspi-Fluger, A., Inbar, M., Mozes-Daube, N., Mouton, L., Hunter, M.S., Zchori-Fein, E., 2011. *Rickettsia* 'in' and 'out': two different localization patterns of a bacterial symbiont in the same insect species. *PLoS One*, 6(6), p.e21096.
- CBOL Plant Working Group, 2009. A DNA barcode for land plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, pp.12794-12797.
- Cevallos, V.E., 1994. University of Florida Book of Insect Records Chapter 7 Smallest Eggs.
- Chadwick, C.E., 1965. A review of Fuller's Rose Weevil (*Pantomorus cervinus* (Boh.)) (Col., Curculionidae). *Journal of the Entomological Society of Australia (NSW)*, 2, pp.10-20.
- Charlat, S., Hurst, G.D., Merçot, H., 2003. Evolutionary consequences of *Wolbachia* infections. *TRENDS in Genetics*, 19(4), pp.217-223.

- Chase, M.W., Salamin, N., Wilkinson, M., Dunwell, J.M., Kesanakurthi, R.P., Haidar, N., Savolainen, V., 2005. Land plants and DNA barcodes: short-term and long-term goals. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 360(1462), pp.1889-1895.
- Chaumeil, P.A., Mussig, A.J., Hugenholtz, P., Parks, D.H., 2020. GTDB-Tk: a toolkit to classify genomes with the Genome Taxonomy Database.
- Chaumeil, P.A., Mussig, A.J., Hugenholtz, P., Parks, D.H., 2022. GTDB-Tk v2: memory friendly classification with the genome taxonomy database. *Bioinformatics*, 38(23), pp.5315-5316.
- Chen, D.Q., Montllor, C.B., Purcell, A.H., 2000. Fitness effects of two facultative endosymbiotic bacteria on the pea aphid, *Acyrtosiphon pisum*, and the blue alfalfa aphid, *A. kondoi*. *Entomologia experimentalis et applicata*, 95(3), pp.315-323.
- Chen, H., Chen, Z., Zhou, Y., 2005. Rice water weevil (Coleoptera: Curculionidae) in mainland China: invasion, spread and control. *Crop protection*, 24(8), pp.695-702.
- Chen, S.J., Lu, F., Cheng, J.A., Jiang, M.X., Way, M.O., 2012. Identification and biological role of the endosymbionts *Wolbachia* in rice water weevil (Coleoptera: Curculionidae). *Environmental entomology*, 41(3), pp.469-477.
- Cherry, T., Szalanski, A.L., Todd, T.C., Powers, T.O., 1997. The internal transcribed spacer region of *Belonolaimus* (Nemata: Belonolaimidae). *Journal of Nematology*, 29(1), p.23.
- Clark, T.B., 1977. *Spiroplasma* sp., a new pathogen in honey bees (*Apis mellifera ligustica*). *Journal of Invertebrate Pathology*.
- Clark, T.L., Meinke, L.J., Skoda, S.R., Foster, J.E., 2001. Occurrence of *Wolbachia* in selected diabroticite (Coleoptera: Chrysomelidae) beetles. *Annals of the Entomological Society of America*, 94(6), pp.877-885.
- Clausen, C.P., 1940. *Entomophagous insects*. McGraw-Hill book Company, Incorporated.
- Cockburn, S.N., Haselkorn, T.S., Hamilton, P.T., Landzberg, E., Jaenike, J., Perlman, S.J., 2013. Dynamics of the continent-wide spread of a *Drosophila* defensive symbiont. *Ecology letters*, 16(5), pp.609-616.
- Cordaux, R., Michel-Salzat, A., Bouchon, D., 2001. *Wolbachia* infection in crustaceans: novel hosts and potential routes for horizontal transmission. *Journal of Evolutionary Biology*, 14(2), pp.237-243.
- da Cruz Cabral, L., Fernandez Goya, L., Piccinali, R.V., Lanteri, A.A., Confalonieri, V.A., Rodriguero, M.S., 2020. Parthenogenesis in weevils of the tribe Naupactini (Coleoptera, Curculionidae): a *Wolbachia*-density dependent trait?. *bioRxiv*.
- da Cruz Cabral, L., Lanteri, A.A., Confalonieri, V.A., Rodriguero, M.S., 2022. Análisis de comunidades microbianas de gorgojos de la tribu Naupactini (Coleoptera): ¿existe relación entre la microbiota y el modo de reproducción? XI Congreso Argentino de Entomología y XII Congreso Latinoamericano de Entomología Lugar: La Plata.
- Dally, M., Lalar, M., Belausov, E., Gottlieb, Y., Coll, M., Zchori-Fein, E., 2020. Cellular localization of two *Rickettsia* symbionts in the digestive system and within the ovaries of the mirid bug, *Macrolophous pygmaeus*. *Insects*, 11(8), p.530.
- De Clercq, P., Mason, P.G., Babendreier, D., 2011. Benefits and risks of exotic biological control agents. *BioControl*, 56(4), pp.681-698.
- De Coster, W., D'hert, S., Schultz, D.T., Cruts, M., Van Broeckhoven, C., 2018. NanoPack: visualizing and processing long-read sequencing data. *Bioinformatics*, 34(15), pp.2666-2669.

- Dedeine, F., Vavre, F., Fleury, F., Benjamin, L., Michael, E.H., Boulétreau, M. 2001. Removing symbiotic *Wolbachia* bacteria specifically inhibits oogenesis in a parasitic wasp. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 98: 6247–6252.
- Degnan, P.H., Lazarus, A.B., Wernegreen, J.J., 2005. Genome sequence of *Blochmannia pennsylvanicus* indicates parallel evolutionary trends among bacterial mutualists of insects. Genome research, 15(8), pp.1023-1033.
- Del Rio, M.G., Klasmer, P., Lanteri, A.A., 2010. Gorgojos (Coleoptera: Curculionidae) perjudiciales para "frutos rojos" en la Argentina. Revista de la Sociedad Entomológica Argentina, 69(1-2), pp.101-110.
- Del Rio, M.G. & Lanteri, A.A., 2018. New synonymies, new combinations and lectotype designations for weevils in the tribe Naupactini (Coleoptera: Curculionidae: Entiminae). Zootaxa, 4500(3), pp.329-340.
- Dicke, M., Cusumano, A., Poelman, E.H., 2020. Microbial Symbionts of Parasitoids. Annu. Rev. Entomol. 65, 171–190. <https://doi.org/10.1146/annurev-ento-011019-024939>
- Dittrich, G., Mitchell, A., Conlong, D., 2006, January. Genetic diversity of *Sturmiopsis parasitica* Curran (Diptera: Tachinidae). In Annales de la Société Entomologique de France (Vol. 42, No. 3-4, pp. 325-329). Taylor and Francis Group.
- Dobson, S.L., 2003. 13 *Wolbachia pipientis*: Impotent by Association. Insect symbiosis, p.199.
- Douglas, A.E., 1998. Nutritional interactions in insect-microbial symbioses: aphids and their symbiotic bacteria *Buchnera*. Annual review of entomology, 43(1), pp.17-37.
- Douglas, A.E., Bouvaine, S., Russell, R., 2011. How the insect immune system interacts with an obligate symbiotic bacterium. Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences, 278(1704), pp.333-338.
- Dumler, J.S. & Walker, D.H., 2005. Rocky Mountain spotted fever—changing ecology and persisting virulence. N Engl J Med, 353(6), pp.551-3.
- Duron, O., Bouchon, D., Boutin, S., Bellamy, L., Zhou, L., Engelstädter, J., Hurst, G.D., 2008. The diversity of reproductive parasites among arthropods: *Wolbachia* do not walk alone. BMC biology, 6(1), pp.1-12.
- Dzierzon, J., 1845. Chodowanie pszczół-Sztuka zrobienica złota, nawet z zielska. Tygodnik Polski Poświęcony Włóścianom (pl), (20).
- Elgueta, M., 1993. Las especies de Curculionoidea (Insecta: Coleoptera) de interés agrícola en Chile. Museo Nacional de Historia Natural.
- Elias-Costa, A.J., Confalonieri, V.A., Lanteri, A.A., Rodriguero, M.S., 2019. Game of clones: Is *Wolbachia* inducing speciation in a weevil with a mixed reproductive mode? Molecular phylogenetics and evolution, 133, pp.42-53.
- Emms, D.M. & Kelly, S., 2015. OrthoFinder: solving fundamental biases in whole genome comparisons dramatically improves orthogroup inference accuracy. Genome biology, 16(1), pp.1-14.
- Emms, D.M. & Kelly, S., 2019. OrthoFinder: phylogenetic orthology inference for comparative genomics. Genome biology, 20, pp.1-14.
- Engelstädter, J., 2008. Constraints on the evolution of asexual reproduction. BioEssays, 30(11-12), pp.1138-1150.
- Engelstädter, J. & Hurst, G.D., 2009. The ecology and evolution of microbes that manipulate host reproduction. Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics, 40, pp.127-149.

- Eriksson, R., 1994. The remarkable weevil pollination of the neotropical Carludovicoideae (Cyclanthaceae). *Plant Systematics and Evolution*, 189, pp.75-81.
- Eslin, P. & Prevost, G., 1996. Variation in *Drosophila* concentration of haemocytes associated with different ability to encapsulate *Asobara tabida* larval parasitoid. *Journal of Insect Physiology* 42, 549–555. [https://doi.org/10.1016/0022-1910\(95\)00134-4](https://doi.org/10.1016/0022-1910(95)00134-4)
- Faddeeva-Vakhrusheva, A., Kraaijeveld, K., Derks, M.F., Anvar, S.Y., Agamennone, V., Suring, W., Kampfraath, A.A., Ellers, J., Le Ngoc, G., van Gestel, C.A., Mariën, J., 2017. Coping with living in the soil: the genome of the parthenogenetic springtail *Folsomia candida*. *BMC genomics*, 18, pp.1-14.
- Fall, H.C., 1912. Four new myrmecophilous Coleoptera. *Psyche: A Journal of Entomology*, 19(1), pp.9-12.
- Feldhaar, H. & Gross, R., 2009. Insects as hosts for mutualistic bacteria. *International Journal of Medical Microbiology*, 299(1), pp.1-8.
- Fernandez Goya, L., Lanteri, A.A., Confalonieri, V.A., Rodriguero, M.S., 2022. New host-parasitoid interactions in *Naupactus cervinus* (Coleoptera, Curculionidae) raise the question of *Wolbachia* horizontal transmission. *Symbiosis*, pp.1-12.
- Fleming, A., Wood, D., Smith, M.A., Hallwachs, W., Janzen, D., 2015. Three new species of *Ametadoria* Townsend (Diptera: Tachinidae) from Área de Conservación Guanacaste, Costa Rica. *BDJ* 3, e5039. <https://doi.org/10.3897/BDJ.3.e5039>
- Floyd, R., Abebe, E., Papert, A., Blaxter, M., 2002. Molecular barcodes for soil nematode identification. *Molecular ecology*, 11(4), pp.839-850.
- Foster, J., Ganatra, M., Kamal, I., Ware, J., Makarova, K., Ivanova, N., Bhattacharyya, A., Kapatral, V., Kumar, S., Posfai, J., Vincze, T., 2005. The *Wolbachia* genome of *Brugia malayi*: endosymbiont evolution within a human pathogenic nematode. *PLoS biology*, 3(4), p.e121.
- Fountain, M.T. & Hopkin, S.P., 2005. *Folsomia candida* (Collembola): a “standard” soil arthropod. *Annu. Rev. Entomol.*, 50, pp.201-222.
- Fox, J. & Weisberg, S., 2019. *An R Companion to Applied Regression*, Third edition. Sage, Thousand Oaks CA. <https://socialsciences.mcmaster.ca/jfox/Books/Companion/>.
- Frank, S.A., 1996. Models of parasite virulence. *The Quarterly review of biology*, 71(1), pp.37-78.
- Frézal, L. & Leblois, R., 2008. Four years of DNA barcoding: current advances and prospects. *Infection, Genetics and Evolution*, 8(5), pp.727-736.
- Frydman, H.M., Li, J.M., Robson, D.N., Wieschaus, E., 2006. Somatic stem cell niche tropism in *Wolbachia*. *Nature*, 441(7092), pp.509-512.
- Fuentes, L.M.H., Vildozola, A.C., Urías-López, M.A., 2017. Weevil borers in tropical fruit crops: Importance, Biology and Management. *Insect Physiology and Ecology*, pp.38-53.
- Fünfhaus, A., Ebeling, J., Genersch, E., 2018. Bacterial pathogens of bees. *Current opinion in insect science*, 26, pp.89-96.
- Furihata, S.X., Matsumoto, H., Kimura, M.T., Hayakawa, Y., 2013. Venom components of *Asobara japonica* impair cellular immune responses of host *Drosophila melanogaster*. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 83(2), pp.86-100.
- Gabriel, W., Lynch, M., Bürger, R., 1993. Muller's ratchet and mutational meltdowns. *Evolution*, 47(6), pp.1744-1757.

- Galis, F. & van Alphen, J.J., 2020. Parthenogenesis and developmental constraints. *Evolution and Development*, 22(1-2), pp.205-217.
- Gasparich, G.E., 2010. *Spiroplasma*s and phytoplasmas: microbes associated with plant hosts. *Biologicals*, 38(2), pp.193-203.
- Gauld, I.D., 1988. Evolutionary patterns of host utilization by ichneumonoid parasitoids (Hymenoptera: Ichneumonidae and Braconidae)\*. *Biological Journal of the Linnean Society* 35, 351–377. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8312.1988.tb00476.x>
- Gehrer, L., Vorburger, C., 2012. Parasitoids as vectors of facultative bacterial endosymbionts in aphids. *Biol. Lett.* 8, 613–615. <https://doi.org/10.1098/rsbl.2012.0144>
- Gerard, P.J., Eden, T.M., Hardwick, S., Mercer, C.F., Slay, M.W.A., Wilson, D.J., 2007. Initial establishment of the Irish strain of *Microctonus aethiopoidea*s in New Zealand. *New Zealand Plant Protection*, 60, pp.203-208.
- Gerardo, N.M., Altincicek, B., Anselme, C., Atamian, H., Barribeau, S.M., De Vos, M., Duncan, E.J., Evans, J.D., Gabaldón, T., Ghanim, M., Heddi, A., 2010. Immunity and other defenses in pea aphids, *Acyrtosiphon pisum*. *Genome biology*, 11, pp.1-17.
- Gerth, M., Gansauge, M.T., Weigert, A., Bleidorn, C., 2014. Phylogenomic analyses uncover origin and spread of the *Wolbachia* pandemic. *Nature communications*, 5(1), pp.1-7.
- Gerth, M., Röthe, J., Bleidorn, C., 2013. Tracing horizontal *Wolbachia* movements among bees (Anthophila): a combined approach using multilocus sequence typing data and host phylogeny. *Molecular ecology*, 22(24), pp.6149-6162.
- Giorgini, M., Bernardo, U., Monti, M.M., Nappo, A.G., Gebiola, M., 2010. *Rickettsia* symbionts cause parthenogenetic reproduction in the parasitoid wasp *Pnigalio soemius* (Hymenoptera: Eulophidae). *Applied and Environmental Microbiology*, 76(8), pp.2589-2599.
- Glesener, R.R. & Tilman, D., 1978. Sexuality and the components of environmental uncertainty: clues from geographic parthenogenesis in terrestrial animals. *The American Naturalist*, 112(986), pp.659-673.
- Glowska, E., Filutowska, Z.K., Dabert, M., Gerth, M., 2020. Microbial composition of enigmatic bird parasites: *Wolbachia* and *Spiroplasma* are the most important bacterial associates of quill mites (Acariformes: Syringophilidae). *Microbiologyopen*, 9(5), p.e964.
- Gobert, G., Cotillard, A., Fourmestraux, C., Pruvost, L., Miguet, J., Boyer, M., 2018. Droplet digital PCR improves absolute quantification of viable lactic acid bacteria in faecal samples. *Journal of microbiological methods*, 148, pp.64-73.
- Goedart, J., 1667. *Metamorphosis et historia naturalis Insectorum Pars*. 11, p. 106. *Experimentum xxx*.
- Gokhman, V.E. & Kuznetsova, V.G., 2018. Parthenogenesis in Hexapoda: holometabolous insects. *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research*, 56(1), pp.23-34.
- Goldson, S.L., McNeill, M.R., Proffitt, J.R., Barker, G.M., Addison, P.J., Barratt, B.I.P., Ferguson, C.M., 1993. Systematic mass rearing and release of *Microctonus hyperodae* (Hym.: Braconidae, Euphorinae), a parasitoid of the Argentine stem weevil *Listronotus bonariensis* (Col.: Curculionidae) and records of its establishment in New Zealand. *Entomophaga*, 38(4), pp.527-536.
- Gomes, T.M., Wallau, G.L., Loreto, E.L., 2022. Multiple long-range host shifts of major *Wolbachia* supergroups infecting arthropods. *Scientific Reports*, 12(1), pp.1-8.
- González, R.H., Curkovic, T., Barria, G., 1992. Insectos y acaros asociados al cultivo de la frambuesa en Chile. *Revista Frutic*, 13(2), pp.41-51.

- Goris, J., Konstantinidis, K.T., Klappenbach, J.A., Coenye, T., Vandamme, P., Tiedje, J.M., 2007. DNA–DNA hybridization values and their relationship to whole-genome sequence similarities. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 57(1), pp.81-91.
- Goto, S., Anbutsu, H., Fukatsu, T., 2006. Asymmetrical interactions between *Wolbachia* and *Spiroplasma* endosymbionts coexisting in the same insect host. *Applied and environmental microbiology*, 72(7), pp.4805-4810.
- Gottlieb, Y. & Zchori-Fein, E., 2001. Irreversible thelytokous reproduction in *Muscidifurax uniraptor*. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 100(3), pp.271-278.
- Gottlieb, Y., Zchori-Fein, E., Werren, J.H., Karr, T.L., 2002. Diploidy restoration in *Wolbachia*-infected *Muscidifurax uniraptor* (Hymenoptera: pteromalidae). *Journal of Invertebrate Pathology*, 81(3), pp.166-174.
- Graber, L.C. & Fallon, A.M., 2019. Tetracycline reduces feeding and reproduction of the parthenogenetic springtail, *Folsomia candida*. *Symbiosis*, 77(3), pp.257-264.
- Gottlieb, Y., Perlman, S.J., Chiel, E., Zchori-Fein, E., 2011. 10 *Rickettsia* Get Around. Manipulative tenants: bacteria associated with arthropods, p.191.
- Grenier, S., 1988. Applied biological control with Tachinid flies (Diptera, Tachinidae): A review. *Anz. Schadlingskde., Pflanzenschutz, Umweltschutz* 61, 49–56. <https://doi.org/10.1007/BF01906254>.
- Guedes, J.V., Lanteri, A.A., Parra, J.R., 2005. Chave de identificação, ocorrência e distribuição dos curculionídeos-das-raízes dos citros em São Paulo e Minas Gerais. *Neotropical Entomology*, 34, pp.577-584.
- Guimarães, J.H., 1971. Family Tachinidae (Larvaevoridae). A Catalogue of the Diptera of the Americas South of the United States 104: 333 pp.
- Gulcu, B., Hodson, A., Omaleki, V., Ross, A.B., Lewis, E.E., 2019. A biological control approach to reducing *Naupactus godmanii* (Curculionidae) populations in citrus using entomopathogenic nematodes. *Crop Protection* 115, 99–103. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2018.09.017>
- Gurung, K., Wertheim, B., Falcao Salles, J., 2019. The microbiome of pest insects: it is not just bacteria. *Entomol Exp Appl* 167, 156–170. <https://doi.org/10.1111/eea.12768>
- Gyeltshen, J. & Hodges, A., 2006. Fuller Rose Beetle, *Pantomorus cervinus* (Boheman) (Insecta: Coleoptera: Curculionidae): EENY-375/IN678, 5/2006. EDIS, 2006(20).
- Hafer, N. & Pike, N., 2010. Shape change in viable eggs of the collembolan *Folsomia candida* provides insight into the role of *Wolbachia* endosymbionts. *Zoological Research* 31, 623–626.
- Hagimori, T., Abe, Y., Date, S., Miura, K., 2006. The first finding of a *Rickettsia* bacterium associated with parthenogenesis induction among insects. *Current microbiology*, 52, pp.97-101.
- Hall, T.A., 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT, in: *Nucleic Acids Symposium Series*. [London]: Information Retrieval Ltd., c1979-c2000., pp. 95–98.
- Hardwick, S., 1999. Phenology and damage potential of whitefringed weevil (*Naupactus leucoloma* Boheman) in the northern North Island of New Zealand (Doctoral dissertation, Lincoln University).



- Hartig, F., 2022. DHARMA: Residual Diagnostics for Hierarchical (Multi-Level / Mixed) Regression Models. R package version 0.4.6. <https://CRAN.R-project.org/package=DHARMA>
- Haverkamp, A. & Smid, H.M., 2020. A neuronal arms race: the role of learning in parasitoid–host interactions. *Current Opinion in Insect Science*, 42, pp.47-54.
- Heath, B.D., Butcher, R.D.J., Whitfield, W.G.F., Hubbard, S.F., 1999. Horizontal transfer of *Wolbachia* between phylogenetically distant insect species by a naturally occurring mechanism. *Current Biology* 9, 313–316. [https://doi.org/10.1016/S0960-9822\(99\)80139-0](https://doi.org/10.1016/S0960-9822(99)80139-0)
- Hebert, P.D.N., Cywinska, A., Ball, S.L., de Waard, J.R., 2003a. Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 270(1512), pp.313-321.
- Hebert, P.D.N., Ratnasingham, S., de Waard, J.R., 2003b. Barcoding animal life: cytochrome c oxidase subunit 1 divergences among closely related species. *Proc. R. Soc. Lond. B* 270. <https://doi.org/10.1098/rsbl.2003.0025>
- Hellemans, J., Mortier, G., De Paepe, A., Speleman, F., Vandesompele, J., 2007. qBase relative quantification framework and software for management and automated analysis of real-time quantitative PCR data. *Genome biology*, 8(2), pp.1-14.
- Hendry, T.A., Hunter, M.S., Baltrus, D.A., 2014. The facultative symbiont *Rickettsia* protects an invasive whitefly against entomopathogenic *Pseudomonas syringae* strains. *Applied and Environmental Microbiology*, 80(23), pp.7161-7168.
- Herniou, E.A., Huguet, E., Thézé, J., Bézier, A., Periquet, G., Drezen, J.-M., 2013. When parasitic wasps hijacked viruses: genomic and functional evolution of polydnviruses. *Phil. Trans. R. Soc. B* 368, 20130051. <https://doi.org/10.1098/rstb.2013.0051>
- Hertig, M., 1936. The rickettsia, *Wolbachia pipientis* (gen. et sp. n.) and associated inclusions of the mosquito, *Culex pipiens*. *Parasitology*, 28(4), pp.453-486.
- Hertig, M. & Wolbach, S.B., 1924. Studies on rickettsia-like micro-organisms in insects. *The Journal of medical research*, 44(3), p.329.
- Hilgenboecker, K., Hammerstein, P., Schlattmann, P., Telschow, A., Werren, J.H., 2008. How many species are infected with *Wolbachia*?—a statistical analysis of current data. *FEMS microbiology letters*, 281(2), pp.215-220.
- Himler, A.G., Adachi-Hagimori, T., Bergen, J.E., Kozuch, A., Kelly, S.E., Tabashnik, B.E., Chiel, E., Duckworth, V.E., Dennehy, T.J., Zchori-Fein, E., Hunter, M.S., 2011. Rapid spread of a bacterial symbiont in an invasive whitefly is driven by fitness benefits and female bias. *science*, 332(6026), pp.254-256.
- Hoffmann, A.A., Tracy Reynolds, K., Nash, M.A., Weeks, A.R., 2008. A high incidence of parthenogenesis in agricultural pests. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 275(1650), pp.2473-2481.
- Hou, H., Zhao, G., Su, C., Zhu, D., 2020. *Wolbachia* prevalence patterns: horizontal transmission, recombination, and multiple infections in chestnut gall wasp-parasitoid communities. *Entomol. Exp. Appl.* 168, 752–765. <https://doi.org/10.1111/eea.12962>
- Houck, M.A., Clark, J.B., Peterson, K.R., Kidwell, M.G., 1991. Possible horizontal transfer of *Drosophila* genes by the mite *Proctolaelaps regalis*. *Science*, 253(5024), pp.1125-1128.
- Hsiao, C. & Hsiao, T.H., 1985. *Rickettsia* as the cause of cytoplasmic incompatibility in the alfalfa weevil, *Hypera postica*. *Journal of invertebrate pathology*, 45(2), pp.244-246.

- Huelsenbeck, J.P., Ronquist, F., 2001. MRBAYES: Bayesian inference of phylogenetic trees. *Bioinformatics* 17, 754–755. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/17.8.754>
- Huelsenbeck, J.P., Ronquist, F., Nielsen, R., Bollback, J.P., 2001. Bayesian inference of phylogeny and its impact on evolutionary biology. *science*, 294(5550), pp.2310-2314.
- Hughes, D.P., Pamilo, P., Kathirithamby, J., 2004. Horizontal transmission of *Wolbachia* by strepsipteran endoparasites? A response to Noda et al., 2001. *Molecular Ecology*, 13(2), pp.507-509. <https://doi.org/10.1046/j.1365-294X.2003.02083.x>
- Hughes, G.L., Dodson, B.L., Johnson, R.M., Murdock, C.C., Tsujimoto, H., Suzuki, Y., Patt, A.A., Cui, L., Nossa, C.W., Barry, R.M., Sakamoto, J.M., 2014. Native microbiome impedes vertical transmission of *Wolbachia* in *Anopheles* mosquitoes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111(34), pp.12498-12503.
- Huigens, M.E., De Almeida, R.P., Boons, P.A.H., Luck, R.F., Stouthamer, R., 2004. Natural interspecific and intraspecific horizontal transfer of parthenogenesis–inducing *Wolbachia* in *Trichogramma* wasps. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 271(1538), pp.509-515.
- Huigens, M.E., Luck, R.F., Klaassen, R.H.G., Maas, M.F.P.M., Timmermans, M.J.T.N., Stouthamer, R., 2000. Infectious parthenogenesis. *Nature* 405, 178–179. <https://doi.org/10.1038/35012066>
- Huigens, M.E. & Stouthamer, R., 2003. 15 Parthenogenesis Associated with *Wolbachia*. *Insect symbiosis*, p.247.
- Humphery-Smith, I., Grulet, O., Le Goff, F., Chastel, C., 1991. *Spiroplasma* (Mollicutes: Spiroplasmataceae) pathogenic for *Aedes aegypti* and *Anopheles stephensi* (Diptera: Culicidae). *Journal of medical entomology*, 28(2), pp.219-222.
- Hurst, G.D. & Frost, C.L., 2015. Reproductive parasitism: maternally inherited symbionts in a biparental world. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 7(5), p.a017699.
- Hurst, G.D., Jiggins, F.M., Robinson, S.J., 2001. What causes inefficient transmission of male-killing *Wolbachia* in *Drosophila*?. *Heredity*, 87(2), pp.220-226.
- Hurst, G.D., Johnson, A.P., Schulenburg, J.H.G.V., Fuyama, Y., 2000. Male-killing *Wolbachia* in *Drosophila*: a temperature-sensitive trait with a threshold bacterial density. *Genetics*, 156(2), pp.699-709.
- Hurst, G.D., Walker, L.E., Majerus, M.E., 1996. Bacterial infections of hemocytes associated with the maternally inherited male-killing trait in British populations of the two spot ladybird, *Adalia bipunctata*. *Journal of invertebrate pathology*, 68(3), pp.286-292.
- Hustache, A. & Bruch, C., 1936. Descripción y notas biológicas de un curculiónido mirmecófilo (Col. Curcul.). *Revista de Entomología*, pp.332-338.
- Hwang, R.Y., Zhong, L., Xu, Y., Johnson, T., Zhang, F., Deisseroth, K., Tracey, W.D., 2007. Nociceptive neurons protect *Drosophila* larvae from parasitoid wasps. *Current Biology*, 17(24), pp.2105-2116.
- Ikeda, T., Ishikawa, H., Sasaki, T., 2003. Regulation of *Wolbachia* density in the Mediterranean flour moth, *Ephesia kuehniella*, and the almond moth, *Cadra cautella*. *Zoological science*, 20(2), pp.153-157.
- Iline, I.I. & Phillips, C.B., 2004. Allozyme markers to help define the South American origins of *Microctonus hyperodae* (Hymenoptera: Braconidae) established in New Zealand for biological control of Argentine stem weevil. *Bulletin of entomological research*, 94(3), pp.229-234.

- Integrated DNA Technologies. How can I check my PCR primers using the OligoAnalyzer® program to ensure there are no significant primer design issues? IDT. <https://www.idtdna.com/pages/support/faqs/how-can-i-check-my-pcr-primers-using-the-oligoanalyzer-program-to-ensure-there-are-no-significant-primer-design-issues>
- Integrated DNA Technologies OligoAnalyzer (RRID:SCR\_001363)
- Ishmael, N., Hotopp, J.C.D., Ioannidis, P., Biber, S., Sakamoto, J., Siozios, S., Nene, V., Werren, J., Bourtzis, K., Bordenstein, S.R., Tettelin, H., 2009. Extensive genomic diversity of closely related *Wolbachia* strains. *Microbiology*, 155(Pt 7), p.2211.
- Jaenike, J., 2007. Spontaneous emergence of a new *Wolbachia* phenotype. *Evolution*, 61(9), pp.2244-2252.
- Jaenike, J., Stahlhut, J.K., Boelio, L.M., Unckless, R.L., 2010a. Association between *Wolbachia* and *Spiroplasma* within *Drosophila neotestacea*: an emerging symbiotic mutualism?. *Molecular Ecology*, 19(2), pp.414-425.
- Jaenike, J., Unckless, R., Cockburn, S.N., Boelio, L.M., Perlman, S.J., 2010b. Adaptation via symbiosis: recent spread of a *Drosophila* defensive symbiont. *Science*, 329(5988), pp.212-215.
- Jaron, K.S., Bast, J., Nowell, R.W., Ranallo-Benavidez, T.R., Robinson-Rechavi, M., Schwander, T., 2021. Genomic features of parthenogenetic animals. *Journal of Heredity*, 112(1), pp.19-33.
- Jiggins, F.M., Hurst, G.D.D., Jiggins, C.D., vd Schulenburg, J.H.G., Majerus, M.E.N., 2000. The butterfly *Danaus chrysippus* is infected by a male-killing *Spiroplasma* bacterium. *Parasitology*, 120(5), pp.439-446.
- Johannesen, J., 2017. Tracing the history and ecological context of *Wolbachia* double infection in a specialist host (*Urophora cardui*)-parasitoid (*Eurytoma serratulae*) system. *Ecol Evol* 7, 986–996. <https://doi.org/10.1002/ece3.2713>
- Jolley, K., Bray, J., Maiden, M.C.J.J., 2018. Open-access bacterial population genomics: BIGSdb software, the PubMLST. org website and their applications. *Wellcome open research*, 3(124).
- Kajtoch, Ł., Kolasa, M., Kubisz, D., Gutowski, J.M., Ścibior, R., Mazur, M.A., Holecová, M., 2019. Using host species traits to understand the *Wolbachia* infection distribution across terrestrial beetles. *Scientific Reports*, 9(1), p.847.
- Kajtoch, Ł. & Kotásková, N., 2018. Current state of knowledge on *Wolbachia* infection among Coleoptera: a systematic review. *PeerJ*, 6, p.e4471.
- Kampfraath, A.A., Klasson, L., Anvar, S.Y., Vossen, R.H.A.M., Roelofs, D., Kraaijeveld, K., Ellers, J., 2019. Genome expansion of an obligate parthenogenesis-associated *Wolbachia* poses an exception to the symbiont reduction model. *BMC genomics*, 20(1), pp.1-14.
- Kang, D.D., Froula, J., Egan, R., Wang, Z., 2014. MetaBAT: metagenome binning based on abundance and tetranucleotide frequency.
- Kang, D.D., Froula, J., Egan, R., Wang, Z., 2015. MetaBAT, an efficient tool for accurately reconstructing single genomes from complex microbial communities. *PeerJ*, 3, p.e1165.
- Kang, D.D., Li, F., Kirton, E., Thomas, A., Egan, R., An, H., Wang, Z., 2019. MetaBAT 2: an adaptive binning algorithm for robust and efficient genome reconstruction from metagenome assemblies. *PeerJ*, 7, p.e7359.
- Kaur, R., Shropshire, J.D., Cross, K.L., Leigh, B., Mansueto, A.J., Stewart, V., Bordenstein, S.R., Bordenstein, S.R., 2021. Living in the endosymbiotic world of *Wolbachia*: a centennial review. *Cell host and microbe*, 29(6), pp.879-893.

- Kearney, M., 2005. Hybridization, glaciation and geographical parthenogenesis. *Trends in ecology and evolution*, 20(9), pp.495-502.
- Kellen, W.R., Hoffmann, D.F., Kwock, R.A., 1981. *Wolbachia* sp.(Rickettsiales: Rickettsiaceae) a symbiont of the almond moth, *Ephesia cautella*: ultrastructure and influence on host fertility. *Journal of Invertebrate Pathology*, 37(3), pp.273-283.
- Kent, B.N. & Bordenstein, S.R., 2010. Phage WO of *Wolbachia*: lambda of the endosymbiont world. *Trends in microbiology*, 18(4), pp.173-181.
- Khardori, N., 2006. Potential agents of bioterrorism: historical perspective and an overview. *Bioterrorism Preparedness: Medicine–Public Health–Policy*, pp.1-31.
- Kikuchi, Y., 2009. Endosymbiotic bacteria in insects: their diversity and culturability. *Microbes and Environments*, 24(3), pp.195-204.
- Kikuchi, Y. & Fukatsu, T., 2005. *Rickettsia* infection in natural leech populations. *Microbial ecology*, 49, pp.265-271.
- Kim-Jo, C., Gatti, J.-L., Poirié, M., 2019. *Drosophila* Cellular Immunity Against Parasitoid Wasps: A Complex and Time-Dependent Process. *Front. Physiol.* 10, 603. <https://doi.org/10.3389/fphys.2019.00603>
- Kingsley, P.C., Bryan, M.D., Day, W.H., Burger, T.L., Dysart, R.J., Schwalbe, C.P., 1993. Alfalfa weevil (Coleoptera: Curculionidae) biological control: spreading the benefits. *Environmental Entomology*, 22(6), pp.1234-1250.
- Kistner, D.H., 1982. The social insects' bestiary. *Social insects*, 3, pp.1-244.
- Koga, R., Tsuchida, T., Fukatsu, T., 2003. Changing partners in an obligate symbiosis: a facultative endosymbiont can compensate for loss of the essential endosymbiont *Buchnera* in an aphid. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 270(1533), pp.2543-2550.
- Koivisto, R.K. & Braig, H.R., 2003. Microorganisms and parthenogenesis. *Biological Journal of the Linnean Society*, 79(1), pp.43-58.
- Kondo, N., Shimada, M., Fukatsu, T., 2005. Infection density of *Wolbachia* endosymbiont affected by co-infection and host genotype. *Biology letters*, 1(4), pp.488-491.
- Konstantinidis, K.T. & Tiedje, J.M., 2005. Genomic insights that advance the species definition for prokaryotes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102(7), pp.2567-2572.
- Kovarik, P.W., Reitz, S.R., 2005. *Oestrophasia (Cenosoma) sabroskyi* Diptera: Tachinidae, a Parasitoid of *Artipus floridanus* (Coleoptera: Curculionidae): Taxonomy and Bionomics. *Annals of the Entomological Society of America*, 98(3), pp.245-251.
- Kremer, N., Charif, D., Henri, H., Bataille, M., Prevost, G., Kraaijeveld, K., Vavre, F., 2009. A new case of *Wolbachia* dependence in the genus *Asobara*: evidence for parthenogenesis induction in *Asobara japonica*. *Heredity*, 103(3), pp.248-256.
- Kumar, B., 2022. Sexual Reproduction. In *Reproductive Strategies in Insects* (pp. 17-34). CRC Press. eBook ISBN 9781003043195.
- Kumar, S., Stecher, G., Li, M., Knyaz, C., Tamura, K., 2018. MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across Computing Platforms. *Molecular Biology and Evolution* 35, 1547–1549. <https://doi.org/10.1093/molbev/msy096>
- Kumm, S. & Moritz, G., 2008. First detection of *Wolbachia* in arrhenotokous populations of thrips species (Thysanoptera: Thripidae and Phlaeothripidae) and its role in reproduction. *Environmental entomology*, 37(6), pp.1422-1428.

- Labrosse, C., Eslin, P., Doury, G., Drezen, J.M., Poirié, M., 2005. Haemocyte changes in *D. melanogaster* in response to long gland components of the parasitoid wasp *Leptopilina bouhardi*: a Rho-GAP protein as an important factor. *Journal of Insect Physiology* 51, 161–170. <https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2004.10.004>
- Langmead, B. & Salzberg, S.L., 2012. Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. *Nature methods*, 9(4), pp.357-359.
- Langmead, B., Trapnell, C., Pop, M., Salzberg, S.L., 2009. Ultrafast and memory-efficient alignment of short DNA sequences to the human genome. *Genome biology*, 10(3), pp.1-10.
- Langmead, B., Wilks, C., Antonescu, V., Charles, R., 2019. Scaling read aligners to hundreds of threads on general-purpose processors. *Bioinformatics*, 35(3), pp.421-432.
- Lanteri, A.A., 1994. Bases para el control integrado de los gorgojos de la alfalfa. De la Campana Ediciones, La Plata, 119 pp.
- Lanteri, A.A., Bigolin, M., del Río, M.G., Guedes, J.V.C., 2013. On the presence of five species of Naupactini (Coleoptera: Curculionidae) damaging soybean in Brazil. *Neotropical entomology*, 42(3), pp.325-327.
- Lanteri, A.A. & del Río, M. G. Naupactini (Coleoptera: Curculionidae) species from Argentina and Uruguay. [fecha de acceso: 05-05-2023]. < <https://biodar.unlp.edu.ar/naupactini/> >
- Lanteri, A.A., Guedes, J.C., Parra, J.R., 2002a. Weevils injurious for roots of citrus in São Paulo State, Brazil. *Neotropical Entomology*, 31, pp.561-569.
- Lanteri, A.A., Loiacono, M., Díaz, N., Marvaldi, A., 1998. Natural enemies of weevils (Coleoptera: Curculionoidea) harmful to crops in Argentina. *Revta. Bras. Ent.*, 41, pp.517-522.
- Lanteri, A.A., Marvaldi, A.E., Suárez, S.M., 2002b. Gorgojos de la Argentina y sus plantas huéspedes. *Publicación Especial de la Sociedad Entomológica Argentina*, 1.
- Lawrence, J.G. & Hendrickson, H., 2005. Genome evolution in bacteria: order beneath chaos. *Current opinion in microbiology*, 8(5), pp.572-578.
- Lawson, E.T., Mousseau, T.A., Klaper, R., Hunter, M.D., Werren, J.H., 2001. *Rickettsia* associated with male-killing in a buprestid beetle. *Heredity*, 86(4), pp.497-505.
- Le Clec'h, W., Chevalier, F.D., Genty, L., Bertaux, J., Bouchon, D., Sicard, M., 2013. Cannibalism and predation as paths for horizontal passage of *Wolbachia* between terrestrial isopods. *PloS one*, 8(4), p.e60232.
- Lee, I., Ouk Kim, Y., Park, S.C., Chun, J., 2016. OrthoANI: an improved algorithm and software for calculating average nucleotide identity. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 66(2), pp.1100-1103.
- Lee, I.M., Bottner, K.D., Munyaneza, J.E., Davis, R.E., Crosslin, J.M., du Toit, L.J., Crosby, T., 2006. Carrot purple leaf: a new spiroplasmal disease associated with carrots in Washington State. *Plant Disease*, 90(8), pp.989-993.
- Lefoulon, E., Clark, T., Borveto, F., Perriat-Sanguinet, M., Moulia, C., Slatko, B.E., Gavotte, L., 2020a. Pseudoscorpion *Wolbachia* symbionts: diversity and evidence for a new supergroup S. *BMC microbiology*, 20(1), pp.1-15.
- Lefoulon, E., Clark, T., Guerrero, R., Cañizales, I., Cardenas-Callirgos, J.M., Junker, K., Vallarino-Lhermitte, N., Makepeace, B.L., Darby, A.C., Foster, J.M., Martin, C., 2020b. Diminutive, degraded but dissimilar: *Wolbachia* genomes from filarial nematodes do not conform to a single paradigm. *Microbial genomics*, 6(12).

- Lefoulon, E., Truchon, A., Clark, T., Long, C., Frey, D., Slatko, B.E., 2021. Greenhead (*Tabanus nigrovittatus*) *Wolbachia* and Its Microbiome: A Preliminary Study. *Microbiology Spectrum*, 9(2), pp.e00517-21.
- Lele, S. R., Keim, J. L., Solymos, P., 2019. ResourceSelection: Resource Selection (Probability) Functions for Use-Availability Data. R package version 0.3-5. <https://CRAN.R-project.org/package=ResourceSelection>
- Lenth, R., 2020. emmeans: Estimated Marginal Means, aka Least-Squares Means. R package version 1.4.8. <https://CRAN.R-project.org/package=emmeans>
- LePage, D.P., Metcalf, J.A., Bordenstein, S.R., On, J., Perlmutter, J.I., Shropshire, J.D., Layton, E.M., Funkhouser-Jones, L.J., Beckmann, J.F., Bordenstein, S.R., 2017. Prophage WO genes recapitulate and enhance *Wolbachia*-induced cytoplasmic incompatibility. *Nature*, 543(7644), pp.243-247.
- Letourneau, D.K., Jedlicka, J.A., Bothwell, S.G., Moreno, C.R., 2009. Effects of natural enemy biodiversity on the suppression of arthropod herbivores in terrestrial ecosystems. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, 40, pp.573-592.
- Li, D., Liu, C.M., Luo, R., Sadakane, K., Lam, T.W., 2015. MEGAHIT: an ultra-fast single-node solution for large and complex metagenomics assembly via succinct de Bruijn graph. *Bioinformatics*, 31(10), pp.1674-1676.
- Li, D., Luo, R., Liu, C.M., Leung, C.M., Ting, H.F., Sadakane, K., Yamashita, H., Lam, T.W., 2016. MEGAHIT v1.0: a fast and scalable metagenome assembler driven by advanced methodologies and community practices. *Methods*, 102, pp.3-11.
- Li, H., 2018. Minimap2: pairwise alignment for nucleotide sequences. *Bioinformatics*, 34(18), pp.3094-3100.
- Li, H., 2021. New strategies to improve minimap2 alignment accuracy. *Bioinformatics*, 37(23), pp.4572-4574.
- Li, S.J., Ahmed, M.Z., Lv, N., Shi, P.Q., Wang, X.M., Huang, J.L., Qiu, B.L., 2017. Plant mediated horizontal transmission of *Wolbachia* between whiteflies. *The ISME journal*, 11(4), pp.1019-1028.
- Li, Y.Y., Floate, K.D., Fields, P.G., Pang, B.P., 2014. Review of treatment methods to remove *Wolbachia* bacteria from arthropods. *Symbiosis*, 62, pp.1-15.
- Lin, Z., Cheng, Y., Wang, R.-J., Du, J., Volovych, O., Li, J.-C., Hu, Y., Lu, Z.-Y., Lu, Z., Zou, Z., 2018. A Metalloprotease Homolog Venom Protein From a Parasitoid Wasp Suppresses the Toll Pathway in Host Hemocytes. *Front. Immunol.* 9, 2301. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.02301>
- Lind, P.A. & Andersson, D.I., 2008. Whole-genome mutational biases in bacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(46), pp.17878-17883.
- Lindsey, A.R., Werren, J.H., Richards, S., Stouthamer, R., 2016. Comparative genomics of a parthenogenesis-inducing *Wolbachia* symbiont. *G3: Genes, Genomes, Genetics*, 6(7), pp.2113-2123.
- Liu, Q., Zhang, H., Zeng, L., Yu, Y., Lin, X., Huang, X., 2021. Coexistence of three dominant bacterial symbionts in a social aphid and implications for ecological adaptation. *Insects*, 12(5), p.416.
- Lo, W.S., Ku, C., Chen, L.L., Chang, T.H., Kuo, C.H., 2013. Comparison of metabolic capacities and inference of gene content evolution in mosquito-associated *Spiroplasma diminutum* and *S. taiwanense*. *Genome Biology and Evolution*, 5(8), pp.1512-1523.

- Loan, C.C. & Lloyd, D.C., 1974. Description and field biology of *Microctonus hyperodae* Loan, n. sp. [Hymenoptera: Braconidae, Euphorinae] a parasite of *Hyperodes bonariensis* in South America [Coleoptera: Curculionidae]. *Entomophaga*, 19(1), pp.7-12.
- Logan, D.P., Maher, B.J., Dobson, S.S., Connolly, P.G., 2008. Larval Survival of Fuller's Rose Weevil, *Naupactus cervinus*, on Common Groundcover Species in Orchards of New Zealand Kiwifruit. *Journal of Insect Science* 8, 1–10. <https://doi.org/10.1673/031.008.5101>
- Loiacono, M.S., 1982. Un nuevo platigastrido (Hymenoptera-Platygastridae) criado de huevos de *Naupactus xanthographus* germ.(Coleoptera-Curculionidae). *Revista de la Sociedad Entomológica Argentina*, 41(1-4).
- Lokki, J., Saura, A., Lankinen, P., Suomalainen, E., 1976. Genetic polymorphism and evolution in parthenogenetic animals: VI. Diploid and triploid *Polydrosus mollis* (Coleoptera: Curculionidae). *Hereditas*, 82(2), pp.209-216.
- López-Madrugal, S. & Duarte, E.H., 2019. Titer regulation in arthropod-*Wolbachia* symbioses. *FEMS microbiology letters*, 366(23), p.fnz232.
- Lüdecke, D., 2023. *\_sjPlot: Data Visualization for Statistics in Social Science\_*. R package version 2.8.13, <URL: <https://CRAN.R-project.org/package=sjPlot>>.
- Łukasik, P., Guo, H., Van Asch, M., Ferrari, J., Godfray, H.C.J., 2013a. Protection against a fungal pathogen conferred by the aphid facultative endosymbionts *Rickettsia* and *Spiroplasma* is expressed in multiple host genotypes and species and is not influenced by co-infection with another symbiont. *Journal of Evolutionary Biology*, 26(12), pp.2654-2661.
- Łukasik, P., van Asch, M., Guo, H., Ferrari, J., Charles J. Godfray, H., 2013b. Unrelated facultative endosymbionts protect aphids against a fungal pathogen. *Ecology letters*, 16(2), pp.214-218.
- Lundmark, M. & Saura, A., 2006. Asexuality alone does not explain the success of clonal forms in insects with geographical parthenogenesis. *Hereditas*, 143(2006), pp.23-32.
- Lynch, M., Bürger, R., Butcher, D., Gabriel, W., 1993. The mutational meltdown in asexual populations. *Journal of Heredity*, 84(5), pp.339-344.
- Ma, W.J. & Schwander, T., 2017. Patterns and mechanisms in instances of endosymbiont-induced parthenogenesis. *Journal of Evolutionary Biology*, 30(5), pp.868-888.
- Mabiala-Moundougou, A.D.N., Doury, G., Eslin, P., Cherqui, A., Prévost, G., 2010. Deadly venom of *Asobara japonica* parasitoid needs ovarian antidote to regulate host physiology. *Journal of Insect Physiology* 56, 35–41. <https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2009.09.001>
- Madge, D.G., Clarke, K., Buchanan, G.A., Wilkins, B., 1992. Seasonal abundance and distribution of Fuller's rose weevil, *Asynonychus cervinus* (Boheman) (Coleoptera: Curculionidae) in *Sunraysia citrus* groves. *Plant Protection Quarterly*, 7(1), pp.3-6.
- Magro, A., Lecompte, E., Hemptinne, J.L., Soares, A.O., Dutrillaux, A.M., Murienne, J., Fürsch, H., Dutrillaux, B., 2020. First case of parthenogenesis in ladybirds (Coleoptera: Coccinellidae) suggests new mechanisms for the evolution of asexual reproduction. *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research*, 58(1), pp.194-208.
- Majerus, T.M.O., Von Der Schulenburg, J.G., Majerus, M.E.N., Hurst, G.D.D., 1999. Molecular identification of a male-killing agent in the ladybird *Harmonia axyridis* (Pallas) (Coleoptera: Coccinellidae). *Insect molecular biology*, 8(4), pp.551-555.
- Makowski, D., Ben-Shachar, M. S., Patil, I., Lüdecke, D., 2020. Estimation of Model-Based Predictions, Contrasts and Means. CRAN.

- Margulis, L., 1970. Origin of eukaryotic cells: Evidence and research implications for a theory of the origin and evolution of microbial, plant and animal cells on the precambrian Earth. Yale University Press.
- Martin, P., 2015. Parthenogenesis: mechanisms, evolution, and its relevance to the role of marbled crayfish as model organism and potential invader. *Freshwater crayfish: a global overview*, pp.63-82.
- Martin, O.Y., Gubler, A., Wimmer, C., Germann, C., Bernasconi, M.V., 2012. Infections with *Wolbachia* and *Spiroplasma* in the Scathophagidae and other Muscoidea. *Infection, Genetics and Evolution*, 12(2), pp.315-323.
- Martinez-Rodriguez, P., Hernandez-Perez, M., Bella, J.L., 2013. Detection of *Spiroplasma* and *Wolbachia* in the bacterial gonad community of *Chorthippus parallelus*. *Microbial ecology*, 66, pp.211-223
- Mateos, M., Castrezana, S.J., Nankivell, B.J., Estes, A.M., Markow, T.A., Moran, N.A., 2006. Heritable endosymbionts of *Drosophila*. *Genetics*, 174(1), pp.363-376.
- Maynard Smith, J., 1978. *The evolution of sex* (Vol. 4). Cambridge: Cambridge University Press.
- McCutcheon, J.P. & Moran, N.A., 2012. Extreme genome reduction in symbiotic bacteria. *Nature Reviews Microbiology*, 10(1), pp.13-26.
- McGraw, E.A., Merritt, D.J., Droller, J.N., O'Neill, S.L., 2002. *Wolbachia* density and virulence attenuation after transfer into a novel host. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(5), pp.2918-2923.
- Mendelsohn, E., Allen, G.E., MacLeod, R.M., MacLeod, R.M. eds., 2001. *Science, History and Social Activism* (Vol. 228). Springer Science and Business Media.
- Mengoni Goñalons, C., Varone, L., Logarzo, G., Guala, M., Rodriguero, M., Hight, S.D., Carpenter, J.E., 2014. Geographical range and laboratory studies on *Apanteles opuntiarum* (Hymenoptera: Braconidae) in Argentina, a candidate for biological control of *Cactoblastis cactorum* (Lepidoptera: Pyralidae) in North America. *Florida Entomologist*, pp.1458-1468.
- Michel-Salzat, A., Cordaux, R., Bouchon, D., 2001. *Wolbachia* diversity in the *Porcellionides pruinosus* complex of species (Crustacea: Oniscidea): evidence for host-dependent patterns of infection. *Heredity*, 87(4), pp.428-434.
- Miller, W.J., Ehrman, L., Schneider, D., 2010. Infectious speciation revisited: impact of symbiont-depletion on female fitness and mating behavior of *Drosophila paulistorum*. *PLoS pathogens*, 6(12), p.e1001214.
- Mira, A. & Moran, N.A., 2002. Estimating population size and transmission bottlenecks in maternally transmitted endosymbiotic bacteria. *Microbial Ecology*, 44, pp.137-143.
- Montenegro, H., Hatadani, L.M., Medeiros, H.F., Klaczko, L.B., 2006. Male killing in three species of the tripunctata radiation of *Drosophila* (Diptera: Drosophilidae). *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research*, 44(2), pp.130-135.
- Montenegro, H., Solferini, V.N., Klaczko, L.B., Hurst, G.D.D., 2005. Male-killing *Spiroplasma* naturally infecting *Drosophila melanogaster*. *Insect molecular biology*, 14(3), pp.281-287.
- Montllor, C.B., Maxmen, A., Purcell, A.H., 2002. Facultative bacterial endosymbionts benefit pea aphids *Acyrtosiphon pisum* under heat stress. *Ecological Entomology*, 27(2), pp.189-195.



- Moran, N.A., Degnan, P.H., Santos, S.R., Dunbar, H.E., Ochman, H., 2005. The players in a mutualistic symbiosis: insects, bacteria, viruses, and virulence genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102(47), pp.16919-16926.
- Moran, N.A., McCutcheon, J.P., Nakabachi, A., 2008. Genomics and evolution of heritable bacterial symbionts. *Annual review of genetics*, 42, pp.165-190.
- Morrow, J.L., Frommer, M., Shearman, D.C.A., Riegler, M., 2014. Tropical tephritid fruit fly community with high incidence of shared *Wolbachia* strains as platform for horizontal transmission of endosymbionts. *Environmental Microbiology*, 16(12), pp.3622-3637.
- Morse JG, DeMason DA, Arpaia MS, Phillips PA, Goodell PB, Haney PB, Smith DJ (1988) Options in controlling the Fuller rose beetle. *Citrograph* 73(7):135–140
- Moutailler, S., Valiente Moro, C., Vaumourin, E., Michelet, L., Tran, F.H., Devillers, E., Cosson, J.F., Gasqui, P., Van, V.T., Mavingui, P., Vourc'h, G., 2016. Co-infection of ticks: the rule rather than the exception. *PLoS neglected tropical diseases*, 10(3), p.e0004539.
- Mouton, L., Dedeine, F., Henri, H., Boulétreau, M., Profizi, N., Vavre, F., 2004. Virulence, multiple infections and regulation of symbiotic population in the *Wolbachia-Asobara tabida* symbiosis. *Genetics*, 168(1), pp.181-189.
- Mouton, L., Henri, H., Bouletreau, M., Vavre, F., 2003. Strain-specific regulation of intracellular *Wolbachia* density in multiply infected insects. *Molecular ecology*, 12(12), pp.3459-3465.
- Mouton, L., Henri, H., Bouletreau, M., Vavre, F., 2006. Effect of temperature on *Wolbachia* density and impact on cytoplasmic incompatibility. *Parasitology*, 132(1), pp.49-56.
- Moya, A., Peretó, J., Gil, R., Latorre, A., 2008. Learning how to live together: genomic insights into prokaryote–animal symbioses. *Nature Reviews Genetics*, 9(3), pp.218-229.
- Muesebeck, C.F.W., 1958. New Neotropical wasps of the family Braconidae (Hymenoptera) in the US National Museum. *Proceedings of the United States National Museum*.
- Muller, H.J., 1964. The relation of recombination to mutational advance. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 1(1), pp.2-9.
- Nahm, F.S., 2016. Nonparametric statistical tests for the continuous data: the basic concept and the practical use. *Korean journal of anesthesiology*, 69(1), pp.8-14.
- Nakabachi, A. & Ishikawa, H., 1999. Provision of riboflavin to the host aphid, *Acyrtosiphon pisum*, by endosymbiotic bacteria, *Buchnera*. *Journal of Insect Physiology*, 45(1), pp.1-6.
- Negri, I., Franchini, A., Gonella, E., Daffonchio, D., Mazzoglio, P.J., Mandrioli, M., Alma, A., 2009. Unravelling the *Wolbachia* evolutionary role: the reprogramming of the host genomic imprinting. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 276(1666), pp.2485-2491.
- Netzer, R., Ribičić, D., Aas, M., Cavé, L., Dhawan, T., 2021. Absolute quantification of priority bacteria in aquaculture using digital PCR. *Journal of Microbiological Methods*, 183, p.106171.
- Newton, I.L., Clark, M.E., Kent, B.N., Bordenstein, S.R., Qu, J., Richards, S., Kelkar, Y.D., Werren, J.H., 2016. Comparative genomics of two closely related *Wolbachia* with different reproductive effects on hosts. *Genome biology and evolution*, 8(5), pp.1526-1542.
- Newton, I.L. & Slatko, B.E., 2019. Symbiosis comes of age at the 10th biennial meeting of *Wolbachia* researchers. *Applied and environmental microbiology*, 85(8), pp.e03071-18.

- Ng, J. & Smith, S.D., 2014. How traits shape trees: new approaches for detecting character state-dependent lineage diversification. *Journal of evolutionary biology*, 27(10), pp.2035-2045.
- Nofemela, R.S., 2017. Strong active defensive reaction of late instar *Plutella xylostella* (L.)(Lepidoptera: Plutellidae) towards *Cotesia vestalis* (Haliday)(Hymenoptera: Braconidae) correlates with its low suitability for parasitism. *African Entomology*, 25(2), pp.454-461.
- Norman, K., Ramle, M., Saharul, A.M., Mohd, R.S., 2018. Fruit set and weevil pollination issues in oil palm. *Planter*, 94(1110), pp.565-578.
- Normark, B.B., 1994. Phylogeny and evolution of parthenogenesis in the *Aramigus tessellatus* complex (Coleoptera: Curculionidae). Cornell University.
- Normark, B.B., 1996. Phylogeny and evolution of parthenogenetic weevils of the *Aramigus tessellatus* species complex (Coleoptera: Curculionidae: Naupactini): evidence from mitochondrial DNA sequences. *Evolution*, 50(2), pp.734-745.
- Normark, B.B., 2003. The evolution of alternative genetic systems in insects. *Annual review of entomology*, 48(1), pp.397-423.
- Normark, B.B., 2014. Modes of reproduction. *The Evolution of Insect Mating Systems*. Oxford University Press, Oxford, pp.1-19.
- Normark, B.B. & Lanteri, A.A., 1998. Incongruence between morphological and mitochondrial-DNA characters suggests hybrid origins of parthenogenetic weevil lineages (genus *Aramigus*). *Systematic Biology*, 47(3), pp.475-494.
- Nugnes, F., Gebiola, M., Monti, M.M., Gualtieri, L., Giorgini, M., Wang, J., Bernardo, U., 2015. Genetic diversity of the invasive gall wasp *Leptocybe invasa* (Hymenoptera: Eulophidae) and of its *Rickettsia* endosymbiont, and associated sex-ratio differences. *PloS one*, 10(5), p.e0124660.
- Nunan, L.M., Lightner, D.V., Oduori, M.A., Gasparich, G.E., 2005. *Spiroplasma penaei* sp. nov., associated with mortalities in *Penaeus vannamei*, Pacific white shrimp. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 55(6), pp.2317-2322.
- Nunan, L.M., Pantoja, C.R., Salazar, M., Aranguren, F., Lightner, D.V., 2004. Characterization and molecular methods for detection of a novel *Spiroplasma* pathogenic to *Penaeus vannamei*. *Diseases of aquatic organisms*, 62(3), pp.255-264.
- Nylander, J.A.A., 2004. MrModeltest v.2, Program distributed by the author. Program distributed by the author. Evolutionary Biology Centre, Uppsala University.
- O'Brien, F.E., 1948. The control of humidity by saturated salt solutions. *Journal of Scientific Instruments*, 25(3), p.73.
- O'Hara, J.E., 2013. History of tachinid classification (Diptera, Tachinidae). *ZooKeys*, (316), p.1.
- O'Hara, J.E. & Henderson, S.J. 2020. World genera of the Tachinidae (Diptera) and their regional occurrence. Version 11.0. PDF document, 90 pp. Available from: [http://www.nadsdiptera.org/Tach/WorldTachs/Genera/Gentach\\_ver11.pdf](http://www.nadsdiptera.org/Tach/WorldTachs/Genera/Gentach_ver11.pdf) (accessed 26-07-2021).
- O'Hara, J.E., Henderson, S.J., Wood, D.M. 2020. Preliminary checklist of the Tachinidae (Diptera) of the world. Version 2.1. PDF document, 1039 pp. Available from: [http://www.nadsdiptera.org/Tach/WorldTachs/Checklist/Tachchlist\\_ver2.1.pdf](http://www.nadsdiptera.org/Tach/WorldTachs/Checklist/Tachchlist_ver2.1.pdf) (accessed 26-07-2021).
- O'Neill, S.L., Giordano, R., Colbert, A.M., Karr, T.L., Robertson, H., 1992. 16S rRNA phylogenetic analysis of the bacterial endosymbionts associated with cytoplasmic

- incompatibility in insects. *Proceedings of the national academy of sciences*, 89(7), pp.2699-2702.
- Oberprieler, R.G., Marvaldi, A.E., Anderson, R.S., 2007. Weevils, weevils, weevils everywhere. *Zootaxa*, 1668(1), pp.491-520.
- Ogle, D.H., Doll, J.C., Wheeler, P., Dinno, A., 2022. FSA: Fisheries Stock Analysis. R package version 0.9.3, <https://github.com/fishR-Core-Team/FSA>.
- Ohsaki, N. & Sato, Y., 1990. Avoidance mechanisms of three *Pieris* butterfly species against the parasitoid wasp *Apanteles glomerulus*. *Ecological Entomology*, 15(2), pp.169-176.
- Olivares, N., Morales, N., Luppichini, P., López, E., 2014. Oviposition of *Naupactus cervinus* (Boheman) and *Naupactus xanthographus* (Germar) (Coleoptera: Curculionidae) under laboratory conditions on orange fruit. *Chilean J. Agric. Res.* 74, 502–505. <https://doi.org/10.4067/S0718-58392014000400019>
- Oliver, K.M., Degnan, P.H., Hunter, M.S., Moran, N.A., 2009. Bacteriophages Encode Factors Required for Protection in a Symbiotic Mutualism. *Science* 325, 992–994. <https://doi.org/10.1126/science.1174463>
- Oliver, K.M., Moran, N.A., Hunter, M.S., 2005. Variation in resistance to parasitism in aphids is due to symbionts not host genotype. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 102, 12795–12800. <https://doi.org/10.1073/pnas.0506131102>
- Palévody, C., 1973. Étude cytologique de la parthénogenèse chez *Folsomia candida* (Collembole, Isotomide). *CR Acad Sci III*, 277, pp.2501-2504.
- Pannebakker, B.A., Pijnacker, L.P., Zwaan, B.J., Beukeboom, L.W., 2004. Cytology of *Wolbachia*-induced parthenogenesis in *Leptopilina clavipes* (Hymenoptera: Figitidae). *Genome*, 47(2), pp.299-303.
- Pannebakker, B.A., Schidlo, N.S., Boskamp, G.J.F., Dekker, L., Van Dooren, T.J.M., Beukeboom, L.W., Zwaan, B.J., Brakefield, P.M., Van Alphen, J.J.M., 2005. Sexual functionality of *Leptopilina clavipes* (Hymenoptera: Figitidae) after reversing *Wolbachia*-induced parthenogenesis. *Journal of Evolutionary Biology*, 18(4), pp.1019-1028.
- Parks, D.H., Chuvochina, M., Chaumeil, P.A., Rinke, C., Mussig, A.J., Hugenholtz, P., 2019. Selection of representative genomes for 24,706 bacterial and archaeal species clusters provide a complete genome-based taxonomy. *BioRxiv*, p.771964.
- Parks, D.H., Chuvochina, M., Waite, D.W., Rinke, C., Skarshewski, A., Chaumeil, P.A., Hugenholtz, P., 2018. A standardized bacterial taxonomy based on genome phylogeny substantially revises the tree of life. *Nature biotechnology*, 36(10), pp.996-1004.
- Parks, D.H., Imelfort, M., Skennerton, C.T., Hugenholtz, P., Tyson, G.W., 2015. CheckM: assessing the quality of microbial genomes recovered from isolates, single cells, and metagenomes. *Genome research*, 25(7), pp.1043-1055.
- Patil, I., 2021. Visualizations with statistical details: The 'ggstatsplot' approach. *Journal of Open Source Software*, 6(61), 3167, doi:10.21105/joss.03167
- Pereira-Marques, J., Hout, A., Ferreira, R.M., Weber, M., Pinto-Ribeiro, I., Van Doorn, L.J., Knetsch, C.W., Figueiredo, C., 2019. Impact of host DNA and sequencing depth on the taxonomic resolution of whole metagenome sequencing for microbiome analysis. *Frontiers in microbiology*, 10, p.1277.
- Pérez-Lachaud, G. & Lachaud, J.P., 2014. Arboreal ant colonies as ‘hot-points’ of cryptic diversity for myrmecophiles: the weaver ant *Camponotus* sp. aff. *textor* and its interaction network with its associates. *Plos One*, 9(6), p.e100155.

- Perlman, S.J., Hunter, M.S., Zchori-Fein, E., 2006. The emerging diversity of *Rickettsia*. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 273(1598), pp.2097-2106.
- Perlmutter, J.I., Bordenstein, S.R., Unckless, R.L., LePage, D.P., Metcalf, J.A., Hill, T., Martinez, J., Jiggins, F.M., Bordenstein, S.R., 2019. The phage gene *wmk* is a candidate for male killing by a bacterial endosymbiont. *PLoS pathogens*, 15(9), p.e1007936.
- Perotti, B.M.A., Clarke, H.K., Turner, B.D., Braig, H.R., Perotti, B.M.A., Clarke, H.K., Turner, B.D., Braig, H.R., 2006. *Rickettsia* as obligate and mycetomic. *The FASEB Journal*, 20(13), pp.2372-2374.
- Pfaffl, M.W., 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic acids research*, 29(9), pp.e45-e45.
- Phillips, C.B., Goldson, S.L., Reimer, L., Kuhlmann, U., 2000. Progress in the search for biological control agents of clover root weevil, *Sitona lepidus* (Coleoptera: Curculionidae). *New Zealand Journal of Agricultural Research* 43, 541–547. <https://doi.org/10.1080/00288233.2000.9513451>
- Phillips, C.B., McNeill, M.R., Hardwick, S., Vink, C.J., Kean, J.M., Bewsell, D., Ferguson, C.M., Winder, L.M., Iline, I.I., Barron, M.C., Stuart, B., 2007. Clover root weevil in the South Island detection response and current distribution. *New Zealand Plant Protection*, 60, pp.209-216.
- Phillips, C.B., Vink, C.J., Blanchet, A., Hoelmer, K.A., 2008. Hosts are more important than destinations: What genetic variation in *Microctonus aethiopoidea* (Hymenoptera: Braconidae) means for foreign exploration for natural enemies. *Molecular phylogenetics and evolution*, 49(2), pp.467-476.
- Phillips, E.F., 1903. A Review of Parthenogenesis. *Proceedings of the American Philosophical Society*, 42(174), pp.275-345.
- Phillips, R.N. & Humphery-Smith, I., 1995. The histopathology of experimentally induced infections of *Spiroplasma taiwanense* (class: Mollicutes) in *Anopheles stephensi* mosquitoes. *Journal of Invertebrate Pathology*, 66(2), pp.185-195.
- Pietri, J.E., DeBruhl, H., Sullivan, W., 2016. The rich somatic life of *Wolbachia*. *Microbiologyopen*, 5(6), pp.923-936.
- Pijls, J.W., van Steenberg, H.J., van Alphen, J.J., 1996. Asexuality cured: the relations and differences between sexual and asexual *Apoanagyrus diversicornis*. *Heredity*, 76(5), pp.506-513.
- Pike, N. & Kingcombe, R., 2009. Antibiotic treatment leads to the elimination of *Wolbachia* endosymbionts and sterility in the diploid collembolan *Folsomia candida*. *BMC biology*, 7, pp.1-6.
- Pilgrim, J., Thongpreem, P., Davison, H.R., Siozios, S., Baylis, M., Zakharov, E.V., Ratnasingham, S., DeWaard, J.R., Macadam, C.R., Smith, M.A., Hurst, G.D., 2021. Torix *Rickettsia* are widespread in arthropods and reflect a neglected symbiosis. *GigaScience*, 10(3), p.giab021.
- Pinheiro, J., Bates, D., DebRoy, S., Sarkar, D., R Core Team, 2020. *nlme: Linear and Nonlinear Mixed Effects Models*. R package version 3.1-148, <URL: <https://CRAN.R-project.org/package=nlme>>.
- Poinsot, D., Bourtzis, K., Markakis, G., Savakis, C., Merçot, H., 1998. *Wolbachia* transfer from *Drosophila melanogaster* into *D. simulans*: host effect and cytoplasmic incompatibility relationships. *Genetics*, 150(1), pp.227-237.

- Potting, R.P.J., Vermeulen, N.E., Conlong, D.E., 1999. Active defence of herbivorous hosts against parasitism: Adult parasitoid mortality risk involved in attacking a concealed stemboring host. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 91(1), pp.143-148.
- Poulin, R. & Combes, C., 1999. The concept of virulence: interpretations and implications. *Parasitology Today*, 15(12), pp.474-475.
- Prevost, G., Eslin, P., Doury, G., Moreau, S.J.M., Guillot, S., 2005. *Asobara*, braconid parasitoids of *Drosophila* larvae: unusual strategies to avoid encapsulation without VLPs. *Journal of Insect Physiology* 51, 171–179. <https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2004.10.002>
- Pride, D.T., Meinersmann, R.J., Wassenaar, T.M., Blaser, M.J., 2003. Evolutionary implications of microbial genome tetranucleotide frequency biases. *Genome research*, 13(2), pp.145-158.
- Prokopowich, C.D., Gregory, T.R., Crease, T.J., 2003. The correlation between rDNA copy number and genome size in eukaryotes. *Genome*, 46(1), pp.48-50.
- Quince, C., Walker, A.W., Simpson, J.T., Loman, N.J., Segata, N., 2017. Shotgun metagenomics, from sampling to analysis. *Nature biotechnology*, 35(9), pp.833-844.
- R Core Team, 2013. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. <http://www.R-project.org/>.
- Radcliffe, E.B. & Flanders, K.L., 1998. Biological control of alfalfa weevil in North America. *Integrated Pest Management Reviews*, 3(4), pp.225-242.
- Raju, B.C., Nyland, G., Backus, E.A., McLean, D.L., 1981. Association of a *Spiroplasma* with brittle root of horseradish. *Phytopathology*, 71(10), pp.1067-1072.
- Ramakers, C., Ruijter, J.M., Deprez, R.H.L., Moorman, A.F., 2003. Assumption-free analysis of quantitative real-time polymerase chain reaction (PCR) data. *Neuroscience letters*, 339(1), pp.62-66.
- Ramírez-Puebla, S.T., Servín-Garcidueñas, L.E., Ormeño-Orrillo, E., Vera-Ponce de León, A., Rosenblueth, M., Delaye, L., Martínez, J., Martínez-Romero, E., 2015. "Species in *Wolbachia*? Proposal for the designation of ‘*Candidatus Wolbachia bourtzisii*’, ‘*Candidatus Wolbachia onchocercicola*’, ‘*Candidatus Wolbachia blaxteri*’, ‘*Candidatus Wolbachia brugii*’, ‘*Candidatus Wolbachia taylori*’, ‘*Candidatus Wolbachia collembolicola*’ and ‘*Candidatus Wolbachia multihospitum*’ for the different species within *Wolbachia* supergroups." *Systematic and applied microbiology* 38(6), pp.390-399.
- Raoult, D. & Roux, V., 1997. Rickettsioses as paradigms of new or emerging infectious diseases. *Clinical microbiology reviews*, 10(4), pp.694-719.
- Ratnasingham, S., Hebert, P.D.N., 2007. BARCODING: bold: The Barcode of Life Data System (<http://www.barcodinglife.org>): BARCODING. *Molecular Ecology Notes* 7, 355–364. <https://doi.org/10.1111/j.1471-8286.2007.01678.x>
- Read, A.F., 1994. The evolution of virulence. *Trends in microbiology*, 2(3), pp.73-76.
- Rebrikov, D.V. & Trofimov, D.Y., 2006. Real-time PCR: a review of approaches to data analysis. *Applied biochemistry and microbiology*, 42(5), pp.455-463.
- Reif, K.E. & Macaluso, K.R., 2009. Ecology of *Rickettsia felis*: a review. *Journal of medical entomology*, 46(4), pp.723-736.
- Rice, D.W., Sheehan, K.B., Newton, I.L., 2017. Large-scale identification of *Wolbachia pipientis* effectors. *Genome Biology and Evolution*, 9(7), pp.1925-1937.

- Richardson, P.M., Holmes, W.P., Saul II, G.B., 1987. The effect of tetracycline on nonreciprocal cross incompatibility in *Mormoniella* [= *Nasonia*] *vitripennis*. *Journal of invertebrate Pathology*, 50(3), pp.176-183.
- Riley, M.A. & Lizotte-Waniewski, M., 2009. Population genomics and the bacterial species concept. *Horizontal gene transfer: Genomes in Flux*, pp.367-377.
- Riparbelli, M.G., Giordano, R., Callaini, G., 2006. Centrosome inheritance in the parthenogenetic egg of the collembolan *Folsomia candida*. *Cell and tissue research*, 326, pp.861-872.
- Rodriguero, M.S., 2009. Origen y consecuencias de la reproducción asexual en una especie de gorgojo de importancia agronómica. Tesis Doctoral. Universidad de Buenos Aires. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Recuperado de [http://hdl.handle.net/20.500.12110/tesis\\_n4436\\_Rodriguero](http://hdl.handle.net/20.500.12110/tesis_n4436_Rodriguero)
- Rodriguero, M.S., 2022. Parthenogenesis. In *Reproductive Strategies in Insects* (pp. 35-71). CRC Press. eBook ISBN 9781003043195.
- Rodriguero, M.S., Adilardi, R.S., Antunes, C., Lanteri, A.A., Confalonieri, V.A., 2019. La partenogénesis ocurre a través de una fase reduccional en gorgojos de la tribu Naupactini. III Reunión argentina de Biología Evolutiva. Ciudad de Buenos Aires, Argentina, 6-8 de agosto de 2019.
- Rodriguero, M.S., Aquino, D.A., Loíacono, M.S., Elías Costa, A.J., Confalonieri, V.A., Lanteri, A.A., 2014. Parasitism of the “Fuller’s rose weevil” *Naupactus cervinus* by *Microctonus* sp. in Argentina. *BioControl*, 59(5), pp.547-556.
- Rodriguero, M.S., Confalonieri, V.A., Guedes, J.V.C., Lanteri, A.A., 2010a. *Wolbachia* infection in the tribe Naupactini (Coleoptera, Curculionidae): association between thelytokous parthenogenesis and infection status. *Insect Molecular Biology*, 19(5), pp.631-640.
- Rodriguero, M.S., Confalonieri, V.A., Mackay Smith, A., Dornon, M.K., Zagoren, E., Palmer, A., Sequeira, A.S., 2023. Genetically depauperate and still successful: few multilocus genotypes of the introduced parthenogenetic weevil *Naupactus cervinus* (Coleoptera: Curculionidae) prevail in the Continental United States. *Insects*, 14(2), p.113.
- Rodriguero, M.S., Guzmán, N.V., Lanteri, A.A., Confalonieri, V.A., 2019. The effect of reproductive system on invasiveness: lessons from South American weevils. *Florida Entomologist*, 102(3), pp.495-500.
- Rodriguero, M.S., Lanteri, A.A., Confalonieri, V.A., 2010b. Mito-nuclear genetic comparison in a *Wolbachia* infected weevil: insights on reproductive mode, infection age and evolutionary forces shaping genetic variation. *BMC Evolutionary Biology*, 10(1), pp.1-15.
- Rodriguero, M.S., Lanteri, A.A., Guzmán, N.V., Carús Guedes, J.V., Confalonieri, V.A., 2016. Out of the forest: past and present range expansion of a parthenogenetic weevil pest, or how to colonize the world successfully. *Ecology and evolution*, 6(15), pp.5431-5445.
- Rodriguero, M.S., Scannapieco, A.C., Monti, D.S., Chifflet, L., Elias-Costa, A.J., Lanteri, A.A., Confalonieri, V.A., 2021. Dependence of egg hatching on *Wolbachia* density in a parthenogenetic weevil revealed by antibiotic treatment. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 169(4), pp.384-392.
- Rodríguez, A., Rodríguez, M., Córdoba, J.J., Andrade, M.J., 2015. Design of primers and probes for quantitative real-time PCR methods. *PCR primer design*, pp.31-56.
- Ross, P.A., Axford, J.K., Yang, Q., Staunton, K.M., Ritchie, S.A., Richardson, K.M., Hoffmann, A.A., 2020. Heatwaves cause fluctuations in *wMel Wolbachia* densities and frequencies in *Aedes aegypti*. *PLoS neglected tropical diseases*, 14(1), p.e0007958.

- Roughgarden, J., 1972. Evolution of niche width. *The American Naturalist*, 106(952), pp.683-718.
- RStudio Team, 2020. RStudio: Integrated Development for R. RStudio, PBC, Boston, MA URL <http://www.rstudio.com/>.
- Rugman-Jones, P.F., Wharton, R., Noort, T. van, Stouthamer, R., 2009. Molecular differentiation of the *Psytalia concolor* (Szépligeti) species complex (Hymenoptera: Braconidae) associated with olive fly, *Bactrocera oleae* (Rossi) (Diptera: Tephritidae), in Africa. *Biological Control* 49, 17–26. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2008.12.005>
- Ruijter, J.M., Barnewall, R.J., Marsh, I.B., Szentirmay, A.N., Quinn, J.C., van Houdt, R., Gunst, Q.D., van den Hoff, M.J., 2021. Efficiency correction is required for accurate quantitative PCR analysis and reporting. *Clinical chemistry*, 67(6), pp.829-842.
- Ruijter, J.M., Pfaffl, M.W., Zhao, S., Spiess, A.N., Boggy, G., Blom, J., Rutledge, R.G., Sisti, D., Lievens, A., De Preter, K., Derveaux, S., 2013. Evaluation of qPCR curve analysis methods for reliable biomarker discovery: bias, resolution, precision, and implications. *Methods*, 59(1), pp.32-46.
- Ruijter, J.M., Ramakers, C., Hoogaars, W.M.H., Karlen, Y., Bakker, O., Van den Hoff, M.J.B., Moorman, A., 2009. Amplification efficiency: linking baseline and bias in the analysis of quantitative PCR data. *Nucleic acids research*, 37(6), pp.e45-e45.
- Ruijter, J.M., Thygesen, H.H., Schoneveld, O.J., Das, A.T., Berkhout, B., Lamers, W.H., 2006. Factor correction as a tool to eliminate between-session variation in replicate experiments: application to molecular biology and retrovirology. *Retrovirology*, 3(1), pp.1-8.
- Ruijter, J.M., Villalba, A.R., Hellemans, J., Untergasser, A., van den Hoff, M.J., 2015. Removal of between-run variation in a multi-plate qPCR experiment. *Biomolecular detection and quantification*, 5, pp.10-14.
- Russell, J.E. & Stouthamer, R., 2011. The genetics and evolution of obligate reproductive parasitism in *Trichogramma pretiosum* infected with parthenogenesis-inducing *Wolbachia*. *Heredity*, 106(1), pp.58-67.
- Sagan, L., 1967. On the origin of mitosing cells. *Journal of theoretical biology*, 14(3), pp.225-236.
- Saglio, P., Lhospital, M., Lafleche, D., Dupont, G., Bové, J.M., Tully, J.G., Freundt, E.A., 1973. *Spiroplasma citri* gen. and sp. n.: a mycoplasma-like organism associated with “stubborn” disease of citrus. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 23(3), pp.191-204.
- Sakurai, M., Koga, R., Tsuchida, T., Meng, X.Y., 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(7), pp.4069-4075.
- Salzberg, S.L., Hotopp, J.C.D., Delcher, A.L., Pop, M., Smith, D.R., Eisen, M.B., Nelson, W.C., 2005. Serendipitous discovery of *Wolbachia* genomes in multiple *Drosophila* species. *Genome biology*, 6(3), pp.1-8.
- Salzman, S., Crook, D., Calonje, M., Stevenson, D.W., Pierce, N.E., Hopkins, R., 2021. Cycad-Weevil pollination symbiosis is characterized by rapidly evolving and highly specific plant-insect chemical communication. *Frontiers in Plant Science*, 12, p.639368.
- Sanada-Morimura, S., Matsumura, M., Noda, H., 2013. Male killing caused by a *Spiroplasma* symbiont in the small brown planthopper, *Laodelphax striatellus*. *Journal of heredity*, 104(6), pp.821-829.

- Sanaei, E., Charlat, S., Engelstädter, J., 2021. *Wolbachia* host shifts: routes, mechanisms, constraints and evolutionary consequences. *Biological Reviews*, 96(2), pp.433-453.
- Sánchez-Peña, S.R., Quechulpa-Montalvo, F., García-Martínez, M., 2001. Natural enemies of the apple bud weevil (Coleoptera: Curculionidae), an apple pest in Coahuila, Mexico. *Journal of Entomological Science*, 36(2), pp.211-213.
- Sanderson, A.R., 1973. 3.—The Cytology of the Parthenogenetic Australian Weevil *Listroderes costirostris* Schönh. *Earth and Environmental Science Transactions of The Royal Society of Edinburgh*, 69(3), pp.71-89.
- Santis, M.D. de, 2017. Análís e cladística da tribo Dufouriini (Diptera, Tachinidae) (Mestrado em Zoologia). Universidade de São Paulo, São Paulo. <https://doi.org/10.11606/D.41.2017.tde-19122016-114252>
- Santos, A.M. & Quicke, D.L., 2011. Large-scale diversity patterns of parasitoid insects. *Entomological Science*, 14(4), pp.371-382.
- Sasajima, Y. & Miyata, M., 2021. Prospects for the mechanism of *Spiroplasma* swimming. *Frontiers in microbiology*, 12, p.706426.
- Sasakawa, K., Ikeda, H., Sutou, M., Dobata, S., Itô, M., 2011. Parasitism of adult *Poecilus versicolor* (Coleoptera: Carabidae) by hymenopteran larvae. *Can Entomol* 143, 211–223. <https://doi.org/10.4039/n11-007>
- Scataglini, M.A., Lanteri, A.A., Confalonieri, V.A., 2005. Phylogeny of the Pantomorus–Naupactus complex based on morphological and molecular data (Coleoptera: Curculionidae). *Cladistics*, 21(2), pp.131-142.
- Schebeck, M., Feldkirchner, L., Marín, B., Krumböck, S., Schuler, H., Stauffer, C., 2018. Reproductive manipulators in the bark beetle *Pityogenes chalcographus* (Coleoptera: Curculionidae)—the role of *Cardinium*, *Rickettsia*, *Spiroplasma*, and *Wolbachia*. *Journal of Insect Science*, 18(3), p.4.
- Schilthuizen, M.O. & Stouthamer, R., 1997. Horizontal transmission of parthenogenesis–inducing microbes in *Trichogramma* wasps. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 264(1380), pp.361-366.
- Schindel, D.E. & Miller, S.E., 2005. DNA barcoding a useful tool for taxonomists. *Nature*.
- Schneider, D.I., Ehrman, L., Engl, T., Kaltenpoth, M., Hua-Van, A., Le Rouzic, A., Miller, W.J., 2019. Symbiont-driven male mating success in the neotropical *Drosophila paulistorum* superspecies. *Behavior Genetics*, 49, pp.83-98.
- Schoch, C.L., Seifert, K.A., Huhndorf, S., Robert, V., Spouge, J.L., Levesque, C.A., Chen, W., Fungal Barcoding Consortium, Fungal Barcoding Consortium Author List, Bolchacova, E., Voigt, K., 2012. Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi. *Proceedings of the national academy of Sciences*, 109(16), pp.6241-6246.
- Scholz, M., Albanese, D., Tuohy, K., Donati, C., Segata, N., Rota-Stabelli, O., 2020. Large scale genome reconstructions illuminate *Wolbachia* evolution. *Nature Communications*, 11(1), p.5235.
- Schwander, T. & Crespi, B.J., 2009. Twigs on the tree of life? Neutral and selective models for integrating macroevolutionary patterns with microevolutionary processes in the analysis of asexuality. *Molecular Ecology*, 18(1), pp.28-42.
- Schwander, T., Crespi, B.J., Gries, R., Gries, G., 2013. Neutral and selection-driven decay of sexual traits in asexual stick insects. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 280(1764), p.20130823.



- Seemann, T., 2014. Prokka: rapid prokaryotic genome annotation. *Bioinformatics*, 30(14), pp.2068-2069.
- 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(6800), pp.81-86.
- Shropshire, J.D. & Bordenstein, S.R., 2019. Two-by-one model of cytoplasmic incompatibility: synthetic recapitulation by transgenic expression of *cifA* and *cifB* in *Drosophila*. *PLoS Genetics*, 15(6), p.e1008221.
- Shropshire, J.D., Hamant, E., Cooper, B.S., 2021. Male age and *Wolbachia* dynamics: investigating how fast and why bacterial densities and cytoplasmic incompatibility strengths vary. *MBio*, 12(6), pp.e02998-21.
- Simon, J.C., Delmotte, F., Rispe, C., Crease, T., 2003. Phylogenetic relationships between parthenogens and their sexual relatives: the possible routes to parthenogenesis in animals. *Biological Journal of the Linnean Society*, 79(1), pp.151-163.
- Smith, D., Beattie, G.A., Broadley, R., 1997. Citrus pests and their natural enemies: integrated pest management in Australia. Department of Primary Industries and Horticultural Research and Development Corporation, Brisbane, Australia.
- Smith, F.F., 1932. Biology and control of the black vine weevil (No. 325). US Department of Agriculture.
- Smith, M.A., Rodriguez, J.J., Whitfield, J.B., Deans, A.R., Janzen, D.H., Hallwachs, W., Hebert, P.D., 2008. Extreme diversity of tropical parasitoid wasps exposed by iterative integration of natural history, DNA barcoding, morphology, and collections. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(34), pp.12359-12364.
- Smith, S.G., 1971. Parthenogenesis and polyploidy in beetles. *American Zoologist*, 11(2), pp.341-349.
- Snook, R.R., Cleland, S.Y., Wolfner, M.F., Karr, T.L., 2000. Offsetting effects of *Wolbachia* infection and heat shock on sperm production in *Drosophila simulans*: analyses of fecundity, fertility and accessory gland proteins. *Genetics*, 155(1), pp.167-178.
- Son, Y., Luckhart, S., Zhang, X., Lieber, M.J., Lewis, E.E., 2008. Effects and implications of antibiotic treatment on *Wolbachia*-infected vine weevil (Coleoptera: Curculionidae).
- Stenberg, P. & Lundmark, M., 2004. Distribution, mechanisms and evolutionary significance of clonality and polyploidy in weevils. *Agricultural and Forest Entomology*, 6(4), pp.259-266.
- Stireman, J.O., O'Hara, J.E., Wood, D.M., 2006. Tachinidae: Evolution, Behavior, and Ecology. *Annu. Rev. Entomol.* 51, 525-555. <https://doi.org/10.1146/annurev.ento.51.110104.151133>
- Stireman, J.O., Cerretti, P., O'Hara, J.E., Blaschke, J.D., Moulton, J.K., 2019. Molecular phylogeny and evolution of world Tachinidae (Diptera). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 139, 106358. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2018.12.002>
- Stouthamer, R., 2009. *Wolbachia*. In *Encyclopedia of insects* (pp. 1061-1063). Academic Press.
- Stouthamer, R. & Kazmer, D.J., 1994. Cytogenetics of microbe-associated parthenogenesis and its consequences for gene flow in *Trichogramma* wasps. *Heredity*, 73(3), pp.317-327.
- Stouthamer, R., Luck, R.F., Hamilton, W.D., 1990. Antibiotics cause parthenogenetic *Trichogramma* (Hymenoptera/Trichogrammatidae) to revert to sex. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 87(7), pp.2424-2427.

- Stouthamer, R. & Mak, F., 2002. Influence of antibiotics on the offspring production of the *Wolbachia*-infected parthenogenetic parasitoid *Encarsia formosa*. *Journal of invertebrate pathology*, 80(1), pp.41-45.
- Stouthamer, R. & Werren, J.H., 1993. Microbes associated with parthenogenesis in wasps of the genus *Trichogramma*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 61(1), pp.6-9.
- Strand, M.R., Pech, L.L., 1995. Immunological Basis for Compatibility in Parasitoid-Host Relationships. *Annu. Rev. Entomol.* 40, 31–56. <https://doi.org/10.1146/annurev.en.40.010195.000335>
- Strand, M.R., Burke, G.R., 2015. Polydnviruses: From discovery to current insights. *Virology* 479–480, 393–402. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2015.01.018>
- Sunnucks, P. & Hales, D.F., 1996. Numerous transposed sequences of mitochondrial cytochrome oxidase I-II in aphids of the genus *Sitobion* (Hemiptera: Aphididae). *Molecular biology and evolution*, 13(3), pp.510-524.
- Suomalainen, E., 1940. Polyploidy in parthenogenetic Curculionidae. *Hereditas*, 26(1-2), pp.51-64.
- Suomalainen, E., 1950. Parthenogenesis in animals. *Advances in genetics*, 3, pp.193-253.
- Suomalainen, E., 1969. Evolution in Parthenogenetic Curculionidae. In: *Evolutionary Biology* vol. 3 (Dobzhansky T., Hecht M. and Steere W., eds.). Plenum Press, New York (N.Y.), pp. 261-296.
- Suomalainen, E. & Saura, A., 1973. Genetic polymorphism and evolution in parthenogenetic animals. I. Polyploid Curculionidae. *Genetics*, 74(3), pp.489-508.
- Tabata, J., Hattori, Y., Sakamoto, H., Yukuhiro, F., Fujii, T., Kugimiya, S., Mochizuki, A., Ishikawa, Y., Kageyama, D., 2011. Male killing and incomplete inheritance of a novel *Spiroplasma* in the moth *Ostrinia zaguliaevi*. *Microbial ecology*, 61, pp.254-263.
- Takenouchi, Y., 1965. Chromosome survey in thirty-four species of bisexual and parthenogenetic weevils of Canada. *Canadian Journal of Genetics and Cytology*, 7(4), pp.663-687.
- Takenouchi, Y., 1976. On the chromosomes of parthenogenetic curculionid weevils in Japan. *Proceedings of the Japan Academy*, 52(3), pp.126-129.
- Tamas, I., Klasson, L., Canback, B., Naslund, A.K., Eriksson, A.S., Wernegreen, J.J., Sandstrom, J.P., Moran, N.A., Andersson, S.G., 2002. 50 million years of genomic stasis in endosymbiotic bacteria. *Science*, 296(5577), pp.2376-2379.
- Teeling, H., Meyerdierks, A., Bauer, M., Amann, R., Glöckner, F.O., 2004. Application of tetranucleotide frequencies for the assignment of genomic fragments. *Environmental microbiology*, 6(9), pp.938-947.
- Terry, I., 2001. Thrips and weevils as dual, specialist pollinators of the Australian cycad *Macrozamia communis* (Zamiaceae). *International Journal of Plant Sciences*, 162(6), pp.1293-1305.
- Tettelin, H., Masignani, V., Cieslewicz, M.J., Donati, C., Medini, D., Ward, N.L., Angiuoli, S.V., Crabtree, J., Jones, A.L., Durkin, A.S., DeBoy, R.T., 2005. Genome analysis of multiple pathogenic isolates of *Streptococcus agalactiae*: implications for the microbial “pan-genome”. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102(39), pp.13950-13955.
- Thompson, J.D., Higgins, D.G., Gibson, T.J., 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res* 22, 4673–4680. <https://doi.org/10.1093/nar/22.22.4673>

- Thornton, B. & Basu, C., 2011. Real-time PCR (qPCR) primer design using free online software. *Biochemistry and molecular biology education*, 39(2), pp.145-154.
- Tichopad, A., Dilger, M., Schwarz, G., Pfaffl, M.W., 2003. Standardized determination of real-time PCR efficiency from a single reaction set-up. *Nucleic acids research*, 31(20), pp.e122-e122.
- Timmermans, M.J. & Ellers, J., 2009. *Wolbachia* endosymbiont is essential for egg hatching in a parthenogenetic arthropod. *Evolutionary ecology*, 23, pp.931-942.
- Tinsley, M.C. & Majerus, M.E.N., 2006. A new male-killing parasitism: *Spiroplasma* bacteria infect the ladybird beetle *Anisosticta novemdecimpunctata* (Coleoptera: Coccinellidae). *Parasitology*, 132(6), pp.757-765.
- Tironi, P., von Treuenfels, A., Parra, J.R.P., 2004. Biology of *Microctonus* sp. (Hymenoptera: Braconidae), a parasitoid of *Cyrtomon luridus* BOH. (Coleoptera: Ccurculionidae). *Scientia Agricola*, 61, pp.538-541.
- Toh, H., Weiss, B.L., Perkin, S.A., Yamashita, A., Oshima, K., Hattori, M., Aksoy, S., 2006. Massive genome erosion and functional adaptations provide insights into the symbiotic lifestyle of *Sodalis glossinidius* in the tsetse host. *Genome research*, 16(2), pp.149-156.
- Toma, R., 2012. Tachinidae: una discusión sobre el problema de la identificación de los taxones de la Región Neotropical. *Entomotropica*, 27, pp.145-152.
- Unckless, R.L., Boelio, L.M., Herren, J.K., Jaenike, J., 2009. *Wolbachia* as populations within individual insects: causes and consequences of density variation in natural populations. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 276(1668), pp.2805-2811.
- Valentini, A., Pompanon, F., Taberlet, P., 2009. DNA barcoding for ecologists. *Trends in ecology and evolution*, 24(2), pp.110-117.
- Van, V., 1973. A new evolutionary law. *Evolutionary Theory*, 1(1), pp.1-30.
- van der Kooij, C.J., Matthey-Doret, C., Schwander, T., 2017. Evolution and comparative ecology of parthenogenesis in haplodiploid arthropods. *Evolution letters* 1(6), pp.304-316.
- van der Kooij, C.J. & Schwander, T., 2014. On the fate of sexual traits under asexuality. *Biological Reviews*, 89(4), pp.805-819.
- Van Ham, R.C., Kamerbeek, J., Palacios, C., Rausell, C., Abascal, F., Bastolla, U., Fernández, J.M., Jiménez, L., Postigo, M., Silva, F.J., Tamames, J., 2003. Reductive genome evolution in *Buchnera aphidicola*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(2), pp.581-586.
- Van Opijnen, T. & Breeuwer, J.A.J., 1999. High temperatures eliminate *Wolbachia*, a cytoplasmic incompatibility inducing endosymbiont, from the two-spotted spider mite. *Experimental and applied acarology*, 23, pp.871-881.
- Van Valen, L., 1977. The red queen. *The American Naturalist*, 111(980), pp.809-810.
- Vautrin, E. & Vavre, F., 2009. Interactions between vertically transmitted symbionts: cooperation or conflict?. *Trends in microbiology*, 17(3), pp.95-99.
- Vavre, F., Fleury, F., Lepetit, D., Fouillet, P., Boulétreau, M., 1999. Phylogenetic evidence for horizontal transmission of *Wolbachia* in host-parasitoid associations. *Molecular biology and evolution*, 16(12), pp.1711-1723.
- Velázquez, D.N.J., Guerrero, R.E., Sánchez, V.V.M., Aguirre, U.L.A., 2002. Biología y comportamiento de *Oestrophasia* sp. parasitoide del picudo de la yema del manzano *Amphidees* spp. *Entomología Mexicana*, 1, pp.289-291.

- Vershinina, A.O. & Kuznetsova, V.G., 2016. Parthenogenesis in Hexapoda: Entognatha and non-holometabolous insects. *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research*, 54(4), pp.257-268.
- Vink, C.J., 2012. A simple PCR-RFLP method to distinguish between species and strains of *Microctonus* parasitoids found in New Zealand. *New Zealand Plant Protection*, 65, pp.186-191.
- Vink, C.J., Barratt, B.I., Phillips, C.B., Barton, D.M., 2012. Moroccan specimens of *Microctonus aethioides* spice our understanding of genetic variation in this internationally important braconid parasitoid of adult weevils. *BioControl*, 57(6), pp.751-758.
- Vink, C.J., Phillips, C.B., Mitchell, A.D., Winder, L.M., Cane, R.P., 2003. Genetic variation in *Microctonus aethioides* (Hymenoptera: Braconidae). *Biological Control*, 28(2), pp.251-264.
- Vrain, T.C., Wakarchuk, D.A., Levesque, A.C., Hamilton, R.I., 1992. Intraspecific rDNA restriction fragment length polymorphism in the *Xiphinema americanum* group. *Fundamental and applied Nematology*, 15(6), pp.563-573.
- Vrijenhoek, R.C., 1979. Factors affecting clonal diversity and coexistence. *American Zoologist*, 19(3), pp.787-797.
- Vrijenhoek, R.C., 1998. Animal clones and diversity. *Bioscience*, 48(8), pp.617-628.
- Waggy, S.L., Beardsley, J.W., 1974. Biological studies on two sibling species of *Lixophaga* (Diptera: Tachinidae), parasites of the New Guinea sugarcane weevil, *Rhabdoscelus obscurus* (Boisduval). *Proceedings of the Hawaiian Entomological Society*, 21(3), pp.485-494.
- Wang, W., Gu, W., Ding, Z., Ren, Y., Chen, J., Hou, Y., 2005. A novel *Spiroplasma* pathogen causing systemic infection in the crayfish *Procambarus clarkii* (Crustacea: Decapod), in China. *FEMS microbiology letters*, 249(1), pp.131-137.
- Wang, W., Wen, B., Gasparich, G.E., Zhu, N., Rong, L., Chen, J., Xu, Z., 2004. A *Spiroplasma* associated with tremor disease in the Chinese mitten crab (*Eriocheir sinensis*). *Microbiology*, 150(9), pp.3035-3040.
- Weeks, A.R. & Breeuwer, J.A.J., 2001. *Wolbachia*-induced parthenogenesis in a genus of phytophagous mites. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 268(1482), pp.2245-2251.
- Weinert L.A., 2015. The diversity and phylogeny of *Rickettsia*. In: *Parasite diversity and diversification: evolutionary ecology meets phylogenetics* (eds , Morand S, Krasnov B and Littlewood T), pp. 150–181. Cambridge, UK: Cambridge University Press.
- Weinert, L.A., Araujo-Jnr, E.V., Ahmed, M.Z., Welch, J.J., 2015. The incidence of bacterial endosymbionts in terrestrial arthropods. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 282(1807), p.20150249.
- Weinert, L.A., Tinsley, M.C., Temperley, M., Jiggins, F.M., 2007. Are we underestimating the diversity and incidence of insect bacterial symbionts? A case study in ladybird beetles. *Biology Letters*, 3(6), pp.678-681.
- Weinert, L.A., Werren, J.H., Aebi, A., Stone, G.N., Jiggins, F.M., 2009. Evolution and diversity of *Rickettsia* bacteria. *BMC biology*, 7(1), pp.1-15.
- Wernegreen, J.J., 2002. Genome evolution in bacterial endosymbionts of insects. *Nature Reviews Genetics*, 3(11), pp.850-861.
- Wernegreen, J.J. & Moran, N.A., 1999. Evidence for genetic drift in endosymbionts (*Buchnera*): analyses of protein-coding genes. *Molecular biology and evolution*, 16(1), pp.83-97.

- Werren, J.H. & Windsor, D.M., 2000. *Wolbachia* infection frequencies in insects: evidence of a global equilibrium?. Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences, 267(1450), pp.1277-1285.
- Werren, J.H., Windsor, D., Guo, L.R., 1995a. Distribution of *Wolbachia* among neotropical arthropods. Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences, 262(1364), pp.197-204.
- Werren, J.H., Zhang, W., Guo, L.R., 1995b. Evolution and phylogeny of *Wolbachia*: reproductive parasites of arthropods. Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences, 261(1360), pp.55-63.
- Wick, R.R., Judd, L.M., Gorrie, C.L., Holt, K.E., 2017a. Completing bacterial genome assemblies with multiplex MinION sequencing. Microbial genomics, 3(10).
- Wick, R.R., Judd, L.M., Gorrie, C.L., Holt, K.E., 2017b. Unicycler: resolving bacterial genome assemblies from short and long sequencing reads. PLoS computational biology, 13(6), p.e1005595.
- Wickham, H., 2016. ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis. Springer-Verlag New York.
- Wolfner, M.F., 1997. Tokens of love: functions and regulation of *Drosophila* male accessory gland products. Insect biochemistry and molecular biology, 27(3), pp.179-192.
- Wolfner, M.F., 2002. The gifts that keep on giving: physiological functions and evolutionary dynamics of male seminal proteins in *Drosophila*. Heredity, 88(2), pp.85-93.
- Wood, D.M. & Cave, R.D., 2006. Description of a new genus and species of weevil parasitoid from Honduras (Diptera: Tachinidae). Florida Entomologist, 89(2), pp.239-244. [https://doi.org/10.1653/0015-4040\(2006\)89\[239:DOANGA\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1653/0015-4040(2006)89[239:DOANGA]2.0.CO;2)
- Wu, M., Sun, L.V., Vamathevan, J., Riegler, M., Deboy, R., Brownlie, J.C., McGraw, E.A., Martin, W., Esser, C., Ahmadinejad, N., Wiegand, C., 2004. Phylogenomics of the reproductive parasite *Wolbachia pipientis* wMel: a streamlined genome overrun by mobile genetic elements. PLoS biology, 2(3), p.e69.
- Wu, X., Lindsey, A.R., Chatterjee, P., Werren, J.H., Stouthamer, R., Yi, S.V., 2020. Distinct epigenomic and transcriptomic modifications associated with *Wolbachia*-mediated asexuality. PLoS pathogens, 16(3), p.e1008397.
- Xie, J., Butler, S., Sanchez, G., Mateos, M., 2014. Male killing *Spiroplasma* protects *Drosophila melanogaster* against two parasitoid wasps. Heredity 112, 399–408. <https://doi.org/10.1038/hdy.2013.118>
- Xie, J., Vilchez, I., Mateos, M., 2010. *Spiroplasma* bacteria enhance survival of *Drosophila hydei* attacked by the parasitic wasp *Leptopilina heterotoma*. Plos one, 5(8), p.e12149.
- Xie, K., Lu, Y.J., Yang, K., Huo, S.M., Hong, X.Y., 2020. Co-infection of *Wolbachia* and *Spiroplasma* in spider mite *Tetranychus truncatus* increases male fitness. Insect science, 27(5), pp.921-937.
- Yang, K., Chen, H., Bing, X.L., Xia, X., Zhu, Y.X., Hong, X.Y., 2021. *Wolbachia* and *Spiroplasma* could influence bacterial communities of the spider mite *Tetranychus truncatus*. Experimental and Applied Acarology, 83, pp.197-210.
- Yang, K., Xie, K., Zhu, Y.X., Huo, S.M., Hoffmann, A., Hong, X.Y., 2020a. *Wolbachia* dominate *Spiroplasma* in the co-infected spider mite *Tetranychus truncatus*. Insect molecular biology, 29(1), pp.19-37.
- Yang, L., Qiu, L., Fang, Q., Stanley, D.W., Ye, G., 2020b. Cellular and humoral immune interactions between *Drosophila* and its parasitoids. Insect Science 28(5): 1208-1227.. <https://doi.org/10.1111/1744-7917.12863>

- Yen, J.H. & Barr, A.R., 1971. New hypothesis of the cause of cytoplasmic incompatibility in *Culex pipiens* L. *Nature*, 232(5313), pp.657-658.
- Yen, J.H. & Barr, A.R., 1973. The etiological agent of cytoplasmic incompatibility in *Culex pipiens*. *Journal of invertebrate pathology*, 22(2), pp.242-250.
- Yoon, S.H., Ha, S.M., Lim, J., Kwon, S., Chun, J., 2017. A large-scale evaluation of algorithms to calculate average nucleotide identity. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 110, pp.1281-1286.
- Zchori-Fein, E., Borad, C., Harari, A.R., 2006. Oogenesis in the date stone beetle, *Coccotrypes dactyliperda*, depends on symbiotic bacteria. *Physiological Entomology*, 31(2), pp.164-169.
- Zchori-Fein, E. & Brown, J.K., 2002. Diversity of prokaryotes associated with *Bemisia tabaci* (Gennadius) (Hemiptera: Aleyrodidae). *Annals of the Entomological Society of America*, 95(6), pp.711-718.
- Zchori-Fein, E., Gottlieb, Y., Coll, M., 2000. *Wolbachia* density and host fitness components in *Muscidifurax uniraptor* (Hymenoptera: Pteromalidae). *Journal of invertebrate pathology*, 75(4), pp.267-272.
- Zchori-Fein, E., Perlman, S.J., Kelly, S.E., Katzir, N., Hunter, M.S., 2004. Characterization of a 'Bacteroidetes' symbiont in *Encarsia* wasps (Hymenoptera: Aphelinidae): proposal of '*Candidatus Cardinium hertigii*'. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 54(3), pp.961-968.
- Zeh, D.W., Zeh, J.A., Bonilla, M.M., 2005. *Wolbachia*, sex ratio bias and apparent male killing in the harlequin beetle riding pseudoscorpion. *Heredity*, 95(1), pp.41-49.
- Zhang, F., Toepfer, S., Riley, K., Kuhlmann, U., 2004. Reproductive biology of *Celatoria compressa* (Diptera: Tachinidae), a parasitoid of *Diabrotica virgifera virgifera* (Coleoptera: Chrysomelidae). *Biocontrol Science and Technology*, 14(1), pp.5-16.
- Zhang, Y.K., Chen, Y.T., Yang, K., Qiao, G.X., Hong, X.Y., 2016. Screening of spider mites (Acari: Tetranychidae) for reproductive endosymbionts reveals links between co-infection and evolutionary history. *Scientific Reports*, 6(1), pp.1-9.
- Zhou, J.C., Shang, D., Qian, Q., Zhang, C., Zhang, L.S., Dong, H., 2022. Penetrance during *Wolbachia*-mediated parthenogenesis of *Trichogramma* wasps is reduced by continuous oviposition, associated with exhaustion of *Wolbachia* titers in ovary and offspring eggs. *Pest Manag Sci*, 78, pp.3080-3089.
- Zhou, W., Rousset, F., O'Neill, S., 1998. Phylogeny and PCR-based classification of *Wolbachia* strains using *wsp* gene sequences. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 265(1395), pp.509-515.
- Zhu, L.Y., Zhang, K.J., Zhang, Y.K., Ge, C., Gotoh, T., Hong, X.Y., 2012. *Wolbachia* strengthens *Cardinium*-induced cytoplasmic incompatibility in the spider mite *Tetranychus piercei* McGregor. *Current microbiology*, 65, pp.516-523.
- Zhu, Y.X., Song, Z.R., Song, Y.L., Hong, X.Y., 2020. Double infection of *Wolbachia* and *Spiroplasma* alters induced plant defense and spider mite fecundity. *Pest Management Science*, 76(9), pp.3273-3281.
- Zhu, Y.X., Song, Z.R., Zhang, Y.Y., Hoffmann, A.A., Hong, X.Y., 2021. Spider mites singly infected with either *Wolbachia* or *Spiroplasma* have reduced thermal tolerance. *Frontiers in microbiology*, 12, p.706321.
- Zhu, Y.X., Song, Y.L., Zhang, Y.K., Hoffmann, A.A., Zhou, J.C., Sun, J.T., Hong, X.Y., 2018. Incidence of facultative bacterial endosymbionts in spider mites associated with local

environments and host plants. *Applied and Environmental Microbiology*, 84(6), pp.e02546-17.

Zimmerman, E.C., 1994. Australian Weevils (Coleoptera: Curculionoidea) I: Anthribidae to Attelabidae: The Primitive Weevils. CSIRO PUBLISHING.

Zug, R. & Hammerstein, P., 2012. Still a host of hosts for *Wolbachia*: analysis of recent data suggests that 40% of terrestrial arthropod species are infected. *PloS one*, 7(6), p.e38544.

Zwolfer, H. & Bennett, F.D., 1969. *Ludovix fasciatus* Gyll. (Col., Curculionidae), an entomophagous weevil. *Entomol Mon Mag*.



Lucia Fernandez Goya

Doctoranda



Dra. Marcela S. Rodriguez

Directora de Tesis



Dra. Viviana A. Confalonieri

Directora Adjunta de Tesis