



**UNIVERSIDAD DE TALCA
INSTITUTO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**ASOCIACIÓN DE LA BACTERIA ENDOSIMBIONTE *Hamiltonella defensa* CON
EL ÁFIDO *Myzus persicae* (SULZER) (HEMIPTERA: APHIDIDAE) Y SU EFECTO
SOBRE EL PARASITOIDE *Aphidius colemani* VIERECK (HYMENOPTERA:
BRACONIDAE)**

Vixania Ignacia Faúndez Droguett

Tesis para optar al Grado de Magíster en Ecología Aplicada

*Profesor Guía:
Dr. Eduardo Fuentes Contreras*

TALCA – CHILE

2017



**UNIVERSIDAD DE TALCA
INSTITUTO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**ASOCIACIÓN DE LA BACTERIA ENDOSIMBIONTE *Hamiltonella defensa* CON
EL ÁFIDO *Myzus persicae* (SULZER) (HEMIPTERA: APHIDIDAE) Y SU EFECTO
SOBRE EL PARASITOIDE *Aphidius colemani* VIERECK (HYMENOPTERA:
BRACONIDAE)**

Vixania Ignacia Faúndez Droguett

Tesis para optar al Grado de Magíster en Ecología Aplicada

*Profesor Guía:
Dr. Eduardo Fuentes Contreras*

TALCA – CHILE

2017

CONSTANCIA

La Dirección del Sistema de Bibliotecas a través de su unidad de procesos técnicos certifica que el autor del siguiente trabajo de titulación ha firmado su autorización para la reproducción en forma total o parcial e ilimitada del mismo.



Talca, 2019

ASOCIACIÓN DE LA BACTERIA ENDOSIMBIONTE *Hamiltonella defensa* CON EL ÁFIDO *Myzus persicae* (SULZER) (HEMIPTERA: APHIDIDAE) Y SU EFECTO SOBRE EL PARASITOIDE *Aphidius colemani* VIERECK (HYMENOPTERA: BRACONIDAE)

ASSOCIATION OF THE ENDOSYMBIOTIC BACTERIA *Hamiltonella defensa* WITH THE APHID *Myzus persicae* (SULZER) (HEMIPTERA: APHIDIDAE) AND ITS EFFECT ON THE PARASITOID *Aphidius colemani* VIERECK (HYMENOPTERA: BRACONIDAE)

Vixania Ignacia Faúndez Droguett

Fecha de inicio de la tesis : 14/01/2016

Fecha de término : 12/10/2017

Profesor guía: Dr. Eduardo Fuentes - Contreras

Departamento de Producción Agrícola, Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad de Talca, Casilla 747, Talca, Chile
efuentes@utalca.cl

Revisor externo: Dr. Gonzalo Díaz Ulloa

Laboratorio de Patología Frutal, Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad de Talca, Casilla 747-721; Talca, Chile
g.diaz@utalca.cl

Profesor Co- Guía: Dr. Marco Cabrera Brandt
Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad de Talca macabrera@utalca.cl

DEDICATORIA

A:

Mi Familia Faúndez Droguett, especialmente a mis Padres Noemi Droguett y Marcelo Faúndez por el apoyo incondicional, por sus consejos, por su amor y palabras de tranquilidad para mantener la perseverancia en los estudios.

Mi amado Kevin Ibáñez por su compañía en este proceso, su paciencia, alegría y motivación constante para seguir adelante y especialmente por el amor que me entrega cada día.

La Familia Rojas Díaz por su confianza, ayuda y buenos deseos que me entregan día a día.

La Familia Ibáñez Hernández que me acogió como parte de su familia y me entregó su cariño y aliento.

Mis profesores Eduardo Fuentes y Marco Cabrera por su confianza en mi trabajo, su ayuda en este logro de mi vida.

Al Dr. Ricardo Ceballos por su colaboración en la metodología del proyecto y agradecida de su buena voluntad y disposición para enseñar su trabajo.

AGRADECIMIENTOS

Esta Tesis fue lograda por un conjunto de personas que me apoyaron de manera incondicional y que de alguna u otra manera aportaron tanto emocionalmente como laboralmente en dicha tesis. Quedo agradecida de mis profesores tutores Dr. Eduardo Fuentes y Dr. Marco Cabrera por su colaboración en el trabajo tanto de escrito como de laboratorio, por su dedicación y paciencia.

A mi pareja Kevin Ibáñez por mi complemento de vida, y que me da dicha energía para continuar adelante con mis objetivos, su amor incondicional y contención en momentos de estrés. Por ser la persona que cuida de mí y me ayuda constantemente en cada meta que me propongo.

A mis Familia Faúndez Droguett por su amor, confianza, apoyo y la oportunidad que me han dado de realizarme como profesional, ya que todo lo que soy y tengo es gracias a ellos. Los amo.

A mi prima y amiga del alma que me ha entregado ánimo para seguir adelante en cada etapa de mi vida, por quererme por escucharme, por levantarme cuando me he caído y amarme por sobre todas las cosas.

A Nuri Cabrera, Lucía, Armando Alfaro, Jennifer Alvarez, Mario Moya, Guillermo Ramírez, Gabriel Ballesteros, Sebastián Ortiz por su ayuda inmensa en el laboratorio de molecular y en los ensayos, por su ánimo, amistad, compañerismo, por cada momento en la oficina que lloramos y reímos juntos.

A Blas Lavandero, que fue la persona que incentivo mi continuidad de estudios, por sus consejos, por su ayuda y buena disposición.

Este trabajo fue financiado por Iniciativa Científica Milenio (ICM) NC120027

RESUMEN

Los áfidos son importantes plagas agrícolas que generan diferentes daños a los cultivos. Una especie muy importante es el pulgón verde del duraznero, *Myzus persicae* (Sulzer), el cual tiene una distribución cosmopolita y es altamente polífago. Los áfidos presentan asociaciones con una gama de bacterias endosimbióticas facultativas, entre las que destaca *Hamiltonella defensa*. Esta bacteria provee al áfido defensas contra algunos de sus enemigos naturales como los parasitoides. Uno de los controladores biológicos de *M. persicae* es el parasitoide *Aphidius colemani*, el que se utiliza comercialmente en los cultivos de invernadero. Actualmente, no existe información del efecto de la asociación áfido-endosimbionte (*M. persicae* – *H. defensa*) sobre el control biológico de *A. colemani*. Por lo tanto, para estudiar este problema se seleccionaron cuatro genotipos de *M. persicae* infectados naturalmente con la bacteria endosimbionte facultativa *H. defensa* en comparación con estos mismos genotipos que no la presentan. Se evaluaron los comportamientos de defensa de los áfidos frente al parasitoide *A. colemani*, así como la conducta de oviposición del parasitoide. Luego se evaluó el efecto de *H. defensa* en el desarrollo del parasitoide. Además, se determinó el contenido de la feromona de alarma (E- β farneseno) en los genotipos de *M. persicae* con y sin *H. defensa*. Los resultados obtenidos indican que los áfidos infectados con *H. defensa* presentan menor frecuencia de conductas defensivas. La conducta de los parasitoides presentó menor frecuencia de ataques, pinchazos con el ovipositor y rechazos de oviposición frente a los áfidos con infección de *H. defensa*. En relación al desarrollo de *A. colemani* no existieron diferencias significativas en porcentaje de momificación, emergencia de parasitoides y razón sexual secundaria. Tres de los cuatro genotipos presentaron una menor cantidad de E- β farneseno al estar infectados con *H. defensa*. Este menor contenido de E- β farneseno podría estar asociado a un menor peso fresco corporal de los genotipos con *H. defensa*. Nuestros resultados indican que el control biológico del parasitoide *A. colemani* podría ser afectado por la presencia de *H. defensa* en *M. persicae* y a su vez sería más efectivo en áfidos libres de la infección.

Palabras clave: *Áfido, endosimbiontes, parasitoides, conducta defensiva*

ABSTRACT

Aphids are important agricultural pests that cause different damage to crops. A very important species is the green peach aphid, *Myzus persicae* (Sulzer), which has a cosmopolitan distribution and is highly polyphagous. Aphids have associations with a range of facultative endosymbiotic bacteria, among which *Hamiltonella defensa* stands out. This bacterium provides the aphid defenses against some of its natural enemies like the parasitoids. One of the biological controllers of *M. persicae* is the parasitoid *Aphidius colemani*, which is used commercially in greenhouse crops. Currently, there is no information on the effect of the association aphid-endosymbiont (*M. persicae* - *H. defensa*) on the biological control of *A. colemani*. Therefore, to study this problem four *M. persicae* genotypes naturally infected with the endosymbiont bacterium *H. defensa* faculty were selected in comparison to these same genotypes that do not present it. The defense behavior of aphids against parasitoid *A. colemani*, as well as oviposition behavior of the parasitoid, were evaluated. The effect of *H. defensa* on parasitoid development was then evaluated. In addition, the content of the alarm pheromone (E- β farnesene) in the genotypes of *M. persicae* with and without *H. defensa* was determined. The results indicate that aphids infected with *H. defensa* have a lower frequency of defensive behavior. The behavior of the parasitoids presented less frequency of attacks, stabbing with the ovipositor and rejection of oviposition against the aphids with infection of *H. defensa*. Regarding the development of *A. colemani*, there were no significant differences in the percentage of mummification, adult emergence and secondary sex ratio. Three out of four genotypes showed a lower content of E- β farnesene when infected with *H. defensa*. This lower E- β farnesene content could be associated with a lower fresh body weight of genotypes infected with *H. defensa*.

Our results indicate that the biological control of the parasitoid *A. colemani* could be affected by the presence of *H. defensa* in *M. persicae* and in turn would be more effective in aphid free of infection.

Keywords: *Aphid, parasitoid, endosymbiont, defense behaviour*

TABLA DE CONTENIDOS

ÍNDICE DE CONTENIDOS	
DEDICATORIA	iii
AGRADECIMIENTOS	iv
RESUMEN	v
ABSTRACT	vi
1. ARTÍCULO CIENTÍFICO	11
2. INTRODUCCIÓN	12
3. HIPÓTESIS	16
4. OBJETIVOS	17
4.1 OBJETIVO GENERAL	17
4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	17
5. MATERIALES Y MÉTODOS	18
6. RESULTADOS	25
7. DISCUSIÓN	28
8. REFERENCIAS	31
9. ANEXOS	38

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Conducta de oviposición del parasitoide *A. colemani* y conducta defensiva de cada genotipo del áfido *M. persicae* con y sin *H. defensa*. Hd-: Sin *Hamiltonella defensa*; Hd+: Con *Hamintonella defensa*; Ataque: búsqueda y contacto antenal de la avispa; Pinchazo: contacto del ovipositor de la avispa con el áfido; Rechazo: la avispa no tiene contacto del ovipositor con el áfido; Defensa: conducta del áfido para defenderse del ataque de la avispa, ya sea pateo, espasmos, caminar o secreción cornicular; Sin Reacción: el áfido inmóvil, no se defiende. Medias en cada columna con diferente letra son significativamente diferentes según ANDEVA y prueba de Tukey ($P \leq 0,05$).

Tabla 2. Desarrollo del parasitoide *A. colemani* para cada genotipo de *M. persicae* con y sin *H. defensa*. Infección: Hd-: Sin *Hamiltonella defensa*; Hd+: Con *Hamintonella defensa*; Momificación: Porcentaje de momificación; Emergencia: Porcentaje de adultos emergidos; SSR (hembras/machos): Razón sexual secundaria. Medias en cada columna con diferente letra son significativamente diferentes según ANDEVA y prueba de Tukey ($P \leq 0,05$).

Tabla 3. Cantidad de E- β -farneseno corregido con el peso corporal de los áfidos de cada genotipo de *M. persicae* con y sin la infección de *H. defensa*. Hd-: Sin *Hamiltonella defensa*; Hd+: Con *Hamintonella defensa*. Medias en cada columna con diferente letra son significativamente diferentes según ANDEVA y prueba de Tukey ($P \leq 0,05$).

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1. Cromatograma para evaluar la concentración de E- β Farneseno en extracto de *M. persicae*.

- Anexo 2.** Conducta defensiva de los diferentes genotipos de *M. persicae* infectados y no infectados con *H. defensa*
- Anexo 3.** Momificación de los diferentes genotipos de *M. persicae* infectados y no infectados con *H. defensa*
- Anexo 4.** Ataque de la avispa en los diferentes genotipos de *M. persicae* infectados y no infectados con *H. defensa*
- Anexo 5.** Rechazo de la avispa en los diferentes genotipos de *M. persicae* infectados y no infectados con *H. defensa*
- Anexo 6.** Oviposición de la avispa en los diferentes genotipos de *M. persicae* infectados y no infectados con *H. defensa*
- Anexo 7.** Proporción de momificación, emergencia y razón sexual secundaria de *A. colemani* desarrollados en los diferentes genotipos de *M. persicae* infectados y no infectados con *H. defensa*
- Anexo 8.** Determinación mediante amplificación de partidores específicos de la infección de bacterias endosimbióticas facultativas en los diferentes genotipos de *M. persicae*.
- Anexo 9.** ANOVA de comportamiento de ataque del parasitoide *Aphidius colemani*
- Anexo 10.** ANOVA de comportamiento de pinchazo del parasitoide *Aphidius colemani*
- Anexo 11.** ANOVA de rechazo del parasitoide *Aphidius colemani*
- Anexo 12.** ANOVA de comportamiento de defensa del áfido *Myzus persicae* con y sin *Hamiltonella defensa*
- Anexo 13.** ANOVA de comportamiento sin reacción áfido *Myzus persicae* con y sin *Hamiltonella defensa*
- Anexo 14.** ANOVA del contenido de feromona de alarma en el áfido *Myzus persicae* con y sin *Hamiltonella defensa*

1. ARTÍCULO CIENTÍFICO

ASOCIACIÓN DE LA BACTERIA ENDOSIMBIONTE *Hamiltonella defensa* CON EL ÁFIDO *Myzus persicae* (SULZER) (HEMIPTERA: APHIDIDAE) Y SU EFECTO SOBRE EL PARASITOIDE *Aphidius colemani* VIERECK (HYMENOPTERA: BRACONIDAE)

Vixania Faúndez-Droguett¹, Ricardo Ceballos², Marco Cabrera- Brandt¹² and Eduardo Fuentes-Contreras¹³

1 Núcleo Milenio, Centro en Ecología molecular y Evolución aplicada en Agroecosistemas. Instituto de Ciencias Biológicas, Universidad de Talca, Avenida Lircay s/n, Talca, Chile.

2 INIA-Quilamapu, Chillán, Chile.

1-2 Departamento de Producción Agrícola, Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad de Talca, Casilla 747, Talca, Chile.

1-3 1-2 Departamento de Producción Agrícola, Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad de Talca, Casilla 747, Talca, Chile.

2. INTRODUCCIÓN

En la naturaleza existe una gran diversidad de asociaciones simbióticas interespecíficas, entre organismos que pueden estar muy alejados filogenéticamente, incluso entre especies pertenecientes a diferentes reinos, como es el caso de las interacciones entre el reino Animalia y Bacteria (Werren & Windsor 2000; Zchori-Fein & Perlman 2004; Ruggiero et al., 2015). En el caso de los insectos y las bacterias se han reportado variadas interacciones, que pueden resultar en efectos deletéreos (bacterias entomopatógenas) para los insectos (Broderick et al., 2006) o benéficos que incluyen la capacidad de utilizar ciertos recursos tróficos, como es el caso de la flora intestinal presente en las termitas, que degrada la celulosa a azúcares menos complejos que pueden ser aprovechados por el insecto (Ikeda- ohtsubo & Brune, 2009); o los áfidos que poseen endosimbiontes que les proveen de nutrientes que no están presentes en su dieta (Baumann, 2005), siendo estas interacciones tan estrechas, que algunos dípteros, blatodeos, curculiónidos y áfidos, han desarrollado un órgano especializado, denominado bacteriocito, para contener a sus endosimbiontes primarios u obligados, ya que sin ellos el insecto no puede sobrevivir (Douglas, 1998; Wernegreen, 2002). Además de los simbiosiontes primarios, existen otras especies de bacterias que no son indispensables para la sobrevivencia del insecto huésped, pero el poseerlas produce en el insecto diferentes efectos tanto ecológicos como evolutivos (Oliver et al. 2003; Oliver et al., 2005). Estas asociaciones simbióticas entre insectos y bacterias a menudo son heredables, transmitidas con alta fidelidad a la prole (Werren & O'Neill, 1997; Oliver et al., 2010) y poseen consecuencias importantes, afectando diferentes rasgos fenotípicos que incluyen: i) el modo reproductivo (Bull, 1983; Werren & O'Neill, 1997); ii) la resistencia al estrés térmico (Dunbar et al., 2007); y iii) la resistencia a enemigos naturales, afectando la infectividad, virulencia y las respuestas defensivas del insecto, como se ha observado en áfidos que portan a los endosimbiontes facultativos *Regiella insecticola* y *Hamiltonella defensa* (Buchner, 1965; Vorburger et al., 2010).

Los áfidos (Hemiptera: Aphididae) son insectos picadores chupadores que incluyen algunas especies que constituyen plagas agrícolas distribuidas ampliamente alrededor del

mundo, causando pérdidas económicas directamente por su forma de alimentación, e indirectamente, ya que son los principales vectores de virus fitopatógenos importantes para la agricultura (Blackman & Eastop, 2000). Los áfidos además presentan asociaciones simbióticas con diferentes tipos de bacterias, el simbiote primario u obligado de los áfidos es *Buchnera aphidicola*, que le proporciona al áfido algunos nutrientes que no obtiene en cantidades suficientes desde una dieta pobre en aminoácidos y proteínas en el floema (Douglas, 1998; Moran et al., 2009; Oliver et al., 2010). Al mismo tiempo los áfidos pueden ser también infectados con una o más bacterias simbiotes secundarias o facultativas, las que no son requeridas para el desarrollo y la reproducción, sin embargo, estos simbiotes facultativos le confieren a los áfidos nuevos atributos como la tolerancia a altas temperaturas ambientales, expansión de su rango de hospederos y protección contra enemigos naturales, como la resistencia contra el desarrollo de avispas parasitoides en algunas especies de áfidos (Oliver & Russell, 2003, Desneux et al., 2009; Oliver et al., 2010).

Hamiltonella defensa es una gamma-proteobacteria que bloquea el desarrollo larval de las avispas parasitoides (Degnan et al., 2009) demostrando aumentar la resistencia de los áfidos al ser atacados por estos enemigos naturales (Oliver et al., 2003). En particular, *H. defensa* confiere resistencia en *Acyrtosiphon pisum* y *Aphis craccivora* frente al parasitoide *Aphidius ervi* (Oliver et al., 2003; Oliver et al., 2010), y parece realizar el mismo efecto en el áfido *Aphis fabae* frente al parasitoide *Lysiphlebus fabarum* (Vorburger et al., 2009). Según los estudios realizados con *A. ervi* y su hospedero *A. pisum* se espera que la infectividad, descrita como el comportamiento de búsqueda de una hembra parasitoide cuando elige su hospedero, debería aumentar (Desneux et al., 2009; Zepeda-Paulo et al., 2013). Por otra parte, la virulencia se relaciona con el éxito relativo del desarrollo del parasitoide en el interior del áfido hospedero (Antolin et al., 2006), la cual debería disminuir (Dion et al., 2011). Este fenómeno ocurre debido a la disminución en las conductas de defensa y escape del áfido frente al parasitoide al estar infectado con *H. defensa*, pero al mismo tiempo el desarrollo del parasitoide dentro de áfidos infectados con esta bacteria es menor por lo que se puede concluir que produce un efecto de aumento de la defensa ante el parasitoidismo (Dion et al., 2011). Estos cambios pueden afectar el control

biológico debido a que con estas conductas defensivas del áfido pueden disminuir el nivel de parasitoidismo (González et al., 1995).

Entre los áfidos que han explotado con éxito los agroecosistemas templados, destaca el pulgón verde del duraznero, *Myzus persicae* (Sulzer), debido a que es altamente generalista (Margaritopoulos et al., 2009; Srigiriraju et al., 2010) utilizando más de 400 especies de plantas distribuidas en 50 familias diferentes como recurso trófico (Schoonhoven et al., 2005). En Chile *M. persicae* es la plaga de mayor importancia en los cultivos agroindustriales y el tercero de importancia a nivel general en todos los cultivos agrícolas (Klein & Waterhouse, 2000). Este áfido presenta varios mecanismos de resistencia a los insecticidas, entre los que se destacan la i) sobreproducción de carboxilesterasas detoxificadoras (E4 o FE4) que confieren resistencia principalmente a los organofosforados, ii) mutación del sitio activo de la enzima acetilcolinesterasa (acetilcolinesterasa modificada, MACE) que le confiere la insensibilidad a los carbamatos de dimetilo iii) mutación del canal de sodio controlado por voltaje (resistencia knockdown, kdr y súper kdr) que le dan resistencia a piretroides, iv) mutación del receptor de GABA asociada a la resistencia a ciclodienos, v) sobreproducción de la enzima monooxigenasa del citocromo P 450 (CYP6CY3) que le brinda resistencia a neonicotinoides y vi) la mutación del receptor de acetilcolina que también entrega resistencia a los neonicotinoides (Bass et al., 2014). Se ha descrito que la presencia de las mutaciones MACE y kdr afectan la conducta de defensa de este áfido, haciéndolos menos sensibles a su feromona de alarma (E-β-farneseno) y consecuentemente más susceptibles a la oviposición por el parasitoide *A. colemani* (Foster et al., 2003; 2007).

El control biológico de *M. persicae*, ha cobrado relevancia en el último tiempo, como una alternativa más amigable ambientalmente al control químico (Nicholls, 2008). Para este propósito se ha estado utilizando enemigos naturales, como los parasitoides pertenecientes a la sub familia Aphidiinae (Hymenoptera: Braconidae), los cuales son endoparasitoides, solitarios y koinobiontes que se desarrollan en ninfas y adultos de este áfido (Johnson & Borror, 2005). En Chile se han registrado como parasitoides del áfido *M. persicae* a: *Aphidius colemani* Vier., *A. ervi* Hal., *A. matricariae* Hal., *A. ropalosiphi* DeStef., *A. uzbekistanicus* Luzh., *Diaeretiella rapae* McInt., *Ephedrus persicae* Frog. y *Praon volucre* Hal. (Starý, 1995). Entre estos el más utilizado en el control biológico

aumentativo de *M. persicae* es *A. colemani*, ya que es generalista sobre varias especies de áfidos y eficaz a nivel de campo y en cultivos bajo cubierta (e.g., invernaderos) (Van Steenis et al., 1995; Vásquez et al., 2006).

Se ha reportado que la bacteria simbiote facultativa *Regiella insecticola* otorga resistencia al áfido *M. persicae* frente al parasitoide *A. colemani* (Vorburger, 2010). Sin embargo, aún no existen estudios que evalúen el efecto que genera *H. defensa* en el áfido *Myzus persicae* infectados de manera natural con este endosimbionte secundario, sobre el parasitoidismo. Bajo esta interrogante proponemos en este estudio evaluar si *H. defensa* confiere resistencia a *M. persicae* frente a *A. colemani*, como una manera de determinar la interacción con este endosimbionte secundario. Para esto se estudió la infectividad y virulencia (Dion et al., 2011) de *A. colemani* parasitando al áfido *M. persicae* infectado con la bacteria simbiótica *H. defensa*. Debido a todos los antecedentes antes mencionados se hipotetizó que la asociación de la bacteria endosimbiótica facultativa *Hamiltonella defensa* le confiere resistencia al áfido *Myzus persicae* frente al parasitoide *Aphidius colemani*.

3. HIPÓTESIS

La bacteria endosimbiótica facultativa *Hamiltonella defensa* le confiere resistencia al áfido *Myzus persicae* frente al parasitoide *Aphidius colemani*.

Predicción: Los áfidos *Myzus persicae* infectados con *Hamiltonella defensa* serán menos parasitados, como consecuencia de una mayor infectividad, pero con una menor virulencia del parasitoide *Aphidius colemani*.

Los áfidos *Myzus persicae* infectados con la bacteria endosimbiótica facultativa *Hamiltonella defensa*, tendrán menos conducta de defensa y escape frente al parasitoide *Aphidius colemani*. Esto produciría un aumento en la oviposición del parasitoide *Aphidius colemani* sobre los áfidos de *Myzus persicae* infectados con la bacteria *Hamiltonella defensa*

Los áfidos *Myzus persicae* infectados con la bacteria endosimbiótica facultativa *Hamiltonella defensa*, producen una reducción de la sobrevivencia y aumento del tiempo de desarrollo del parasitoide *Aphidius colemani*.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo general:

Determinar el efecto de la bacteria endosimbiótica *Hamiltonella defensa* en la interacción entre el áfido *Myzus persicae* frente al parasitoide *Aphidius colemani*.

4.2 Objetivos específicos:

1. Determinar infectividad del parasitoide *Aphidius colemani* en el áfido *Myzus persicae* con y sin presencia de la bacteria endosimbiótica *Hamiltonella defensa*
2. Determinar la virulencia del parasitoide *Aphidius colemani* en el áfido *Myzus persicae* con y sin la presencia de la bacteria endosimbiótica *Hamiltonella defensa*
3. Evaluar las conductas defensivas del áfido *Myzus persicae* con y sin la presencia de la bacteria endosimbiótica *Hamiltonella defensa*.
4. Evaluar el contenido de feromona de alarma (E- β Farneseno) en el áfido *Myzus persicae* con y sin la presencia de *Hamiltonella defensa*

5. MATERIALES Y MÉTODOS

Muestreo de áfidos y elección de genotipos

Se recolectaron individuos de *M. persicae* en campos sobre cultivos de papa (*Solanum tuberosum*) entre la región del Libertador Bernardo O'Higgins y la región de Magallanes, recogidos en placas de Petri modificadas de 100 x15mm con una abertura en la parte superior sellada con un tul fino que permite la aireación de los áfidos y evitar que escapen. Posteriormente, estos fueron codificados con la fecha de colecta y luego transferidos al laboratorio de interacciones de insecto planta. Una vez transportados al laboratorio, los áfidos fueron transferidos a plántulas de pimiento (*Capsicum annuum*), Pimiento California Wonder 300 (Semillas Music) var. Resistant y mantenidos en cámaras a 22 °C con un fotoperiodo de 16L: 8D para su posterior genotipificación.

Extracción– cuantificación de ADN de M. persicae

La extracción de ADN de *Myzus persicae* se realizó utilizando el método de "salting out" descrito por Sunnucks y Hales (1996). Cada muestra se secó durante 5 minutos sobre papel absorbente, después se depositó en cada tubo estéril Eppendorf de 1,7 ml, etiquetando cada tubo con su código respectivo. Se añadió un total de 296 µl de buffer TNES (Trizma base, NaCl, EDTA, SDS), se añadieron 2 µl de proteinasa K (proteinasa K siempre a -4 °C). Los áfidos se trituraron utilizando pistilos de plástico estériles, este procedimiento se realizó hasta que la muestra se homogeneizó completamente y después se agitó durante 3 segundos. Las muestras se incubaron a 37 °C durante 4 horas. Después del período de incubación, se añadieron 85 µl de NaCl 5M para precipitar las proteínas, luego se sometieron a un vortex durante 15 segundos cada tubo. Las muestras se centrifugaron después a 13.200 rpm durante 20 minutos a 10 °C. Posteriormente se transfirió el

sobrenadante (aproximadamente 200 μ l) a un nuevo tubo estéril, teniendo cuidado de no tomar ninguna cantidad de pellet y se añadieron 350 μ l de etanol al 100% (frío), se homogeneizaron y se dejaron a -20 °C durante la noche para precipitar el ADN.

Al día siguiente, las muestras se centrifugaron a 13.200 rpm a 10 °C durante 10 minutos y el etanol se retiró volteando los tubos sobre papel absorbente y deslizándolo lentamente. A continuación, se añadieron 350 μ l de etanol al 70% (frío) a cada tubo. Luego se centrifugó de nuevo a 13200 rpm a 10 °C durante 10 minutos y se eliminó el etanol por volteo directo del tubo sobre el recipiente. Los tubos abiertos se colocaron entonces en la estufa a 37 °C, hasta que los residuos de etanol se secaron por completo durante 1-3 horas. Después de secar las muestras, se añadieron 30 μ l de agua ultrapura estéril. El ADN se dejó entonces suspender a 4 °C durante toda la noche. La cuantificación del ADN se realizó en un espectrofotómetro NanoDrop (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA), que estima la concentración de ADN en ng/ μ l, la relación de ADN y disolventes orgánicos como fenoles (relación 260/230) y la relación entre ADN y proteínas (Relación 260/280). Estas proporciones indican si hay algún grado de contaminación aislada de ADN, y cuyos valores de referencia deben estar entre 1,8 - 2,0.

En Enero del 2016, los cuatro genotipos diferentes con y sin la infección de la bacteria *H. defensa* fueron genotipificados para corroborar que no existiera contaminación tomando como muestras 3 áfidos por cada genotipo. Se utilizaron marcadores genéticos de tipo microsatélite, previamente descritos en la literatura (Sloane et al. 2001, Wilson et al., 2004). Para ello, se realizó una extracción de ADN de un único individuo a partir de clones criados en el laboratorio. Con el ADN extraído, mediante la reacción de PCR se amplificó 7 loci microsatélites, correspondientes a Myz 3, Myz 9, Myz 25, Myz 35, Myz 37, Myz 40, Myz63. Los productos de PCR se genotipificaron en Macrogen Inc (Rep. de Corea) y los

electroferogramas obtenidos se analizaron utilizando el programa GENEMARK 1.3 (Borodovsky y McIninch 1993).

Amplificación de bacterias endosimbióticas

La identificación de las bacterias endosimbióticas secundarias encontradas en los áfidos de *M. persicae* se realizó mediante la amplificación de regiones específicas del ADN ribosómico (16S rDNA) de cada una de las siete especies de bacterias endosimbióticas secundarias (facultativas) descrita en literatura para los áfidos. Se utilizaron los siguientes partidores específicos desarrollados para el áfido *A. pisum*: Spi1500R (*Spiroplasma*), PASS1140R (*Serratia symbiotica*), PAUS16SR (*Regiella insecticola*) Ric600R (*Rickettsia*) PABS480R (*Hamiltonella defensa*) PAXSF, PAXSR (Paxs) y un partidador universal 16SA1. Como un control positivo de la amplificación por PCR, se incluyó la bacteria *Buchnera aphidicola*, endosimbionte obligatorio o primario usando el partidador Buch270R específico, el cual estuvo presente en todos los áfidos.

La amplificación de los fragmentos de ADN específicos se realizó en un termociclador modelo 9902 Veriti Applied BioSystems, Carlsbad, USA, utilizando un programa consistente en 1 ciclo de desnaturalización inicial de ADN a 94 °C durante 5 minutos, seguido de 30 ciclos a 94 °C durante 30 segundos, 64 °C durante 30 segundos, 72 °C durante 1 minuto. Finalmente, para completar 1 ciclo de extensión a 72 °C durante 5 minutos (Pecoudd et al., 2013).

Determinación molecular para las diferentes especies de endosimbiontes

Los productos de PCR se visualizaron en geles de agarosa al 1,5% y se determinaron bacterias endosimbióticas en función del tamaño en pares de bases (pb) de los fragmentos amplificados para cada individuo de *M. persicae*. Se utilizaron los siguientes tamaños diagnósticos: *Spiroplasma* (1500 pb), *Serratia symbiotica* (1140 pb), *Regiella*

insecticola (840 pb), *Rickettsia* (600 pb), *Hamiltonella defensa* (480 pb) y *Buchnera aphidicola* (270 pb). Para determinar los diferentes tamaños en pares de bases se utilizó un peso molecular estándar GeneRuler 100bp Plus DNA Ladder (Fermentas, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA). Además, se envió a secuenciar el producto PCR de la bacteria endosimbiótica *H. defensa* a Australomics (Valdivia, Chile).

Q-PCR para discriminación alélica

Para descartar la presencia de la mutación MACE, *kdr* y súper *kdr* en los áfidos utilizados y que pudiera afectar las variables respuestas estudiadas (Anstead et al., 2008), se alicuotaron las muestras de ADN a $25\text{ng } \mu\text{l}^{-1}$ y se agregó $2,0 \mu\text{l}$ a cada tubo de PCR, luego de descongelados los reactivos se preparó un Mix en un tubo Eppendorf de $1,7 \mu\text{l}$ para *kdr* y súper *kdr*. Para ello se agregó $6,0 \mu\text{l}$ de TaqMan 2X, $1,5 \mu\text{l}$ de Primer R $10 \mu\text{M}$, $1,5 \mu\text{l}$ de Primer F 10 Mm , $0,5 \mu\text{l}$ Sonda R 10 Mm , $0,5 \mu\text{l}$ Sonda S 10 Mm . Se sometieron a un vortex y se agregó el Mix *kdr* y súper *kdr* a cada tubo de PCR. Luego se realizó el Mix para MACE utilizando $12,0 \mu\text{l}$ de TaqMan 2X, $3,0 \mu\text{l}$ de Primer R $10 \mu\text{M}$, $3,0 \mu\text{l}$ de Primer F 10 Mm , $0,5 \mu\text{l}$ Sonda R 10 Mm , $0,5 \mu\text{l}$ Sonda S 10 Mm y $5,0 \mu\text{l}$ de agua ultrapura y posteriormente se sometieron a un vortex y se añadió el Mix MACE a nuevos tubos de PCR con $2 \mu\text{l}$ de ADN. Terminado este proceso se colocan las muestras en el termociclador Real Time Bio-Rad, Hércules, USA. La amplificación se realiza con las siguientes ciclos: Para *kdr* y súper *kdr* $50 \text{ }^\circ\text{C}$ por 2 minutos, $95 \text{ }^\circ\text{C}$ por 16:40 minutos, $92 \text{ }^\circ\text{C}$ por 15 segundos, $60 \text{ }^\circ\text{C}$ por 1 minuto y $72 \text{ }^\circ\text{C}$ por 15 segundos con 35 ciclos. Para MACE: $50 \text{ }^\circ\text{C}$ por 2 minutos, $95 \text{ }^\circ\text{C}$ por 10 minutos, $92 \text{ }^\circ\text{C}$ por 15 segundos y $60 \text{ }^\circ\text{C}$ por 1 minuto con 35 ciclos.

Diseño experimental

El experimento tuvo como objetivo medir la infectividad y virulencia del parasitoide, así como el comportamiento defensivo del áfido cuando fue atacado por la avispa parasitoide.

Las hembras de parasitoides fueron seleccionadas y se aparearon durante 24 horas individualmente con un macho. Luego, cada hembra apareada fue transferida a una arena experimental (una placa de Petri invertida de 9 cm de diámetro con agar), que contiene 10 áfidos de segundo y tercer instar sobre una pequeña hoja de pimiento. La infectividad se midió a través de la observación de diferentes comportamientos de la hembra parasitoide experimental. La observación comenzó cuando la avispa parasitoide aterrizó sobre la hoja y comenzó la búsqueda de los áfidos y terminó a los 10 minutos de grabación. Después de localizar y contactar con un áfido, el evento fue considerado como un ataque de parasitoide. El resultado de un ataque fue la aceptación del áfido para la oviposición o su rechazo. El contacto del cuerpo del áfido con el ovipositor de la hembra parasitoide se consideró como una oviposición exitosa. A la inversa, cualquier ataque del parasitoide que no condujera a un comportamiento de contacto con el ovipositor con el áfido se consideró como un rechazo, siendo los rechazos producto de los comportamientos defensivos del áfido (es decir, movimientos rápidos de sus patas y / o cuerpo que repelían el ataque de la avispa para emprender un comportamiento de ovipostura) o por decisión del parasitoide de no oviponer (sin comportamiento defensivo de los áfidos) según lo descrito por Dion et al. (2011).

El desarrollo posterior del parasitoide en el áfido se estudió como un indicador de la virulencia de los parasitoides, y está relacionado con el éxito relativo del desarrollo de parasitoides en su hospedero (Antolin et al., 2006). Para ello, los áfidos de *M. persicae* que

fueron ovipositados se dejaron en la arena para la posterior emergencia del parasitoide y así medir la tasa de parasitismo en relación a los áfidos efectivamente ovipositados.

Análisis E-β-farneseno

Se evaluó la cantidad de feromona de alarma (E-β Farneseno) presente en el cuerpo de *M. persicae*, ya que este podría ser el mecanismo que explicaría diferencias conductuales en la oviposición del parasitoide o en la defensa de los áfidos. Para determinar las diferencias de E-β-farneseno en el cuerpo de *Myzus persicae* infectados y no infectados con *H. defensa* se siguió el protocolo descrito por Oliver et al. (2012). Para ello se tomaron tres muestras de 30 áfidos de cada tipo en un tubo Eppendorf y fueron extraídos (macerados) con 100 µl de diclorometano por cinco minutos.

Una alícuota (1,0 µl) de cada extracción fue analizada empleando un cromatógrafo de gases acoplado a un espectrómetro de masas GCMS QP2010 Plus, Shimadzu, Tokyo, Japón, equipado con una columna capilar HP-5ms: (5%-Phenyl)-methylpolysiloxane; 30 m × 0.25 mm ID × 0.25 µm; Agilent Technology, Palo Alto, USA. Se empleó helio como gas transportador, con un flujo de 0.90 ml min⁻¹. La adquisición de los espectros se realizó en el rango de masas de 35 a 500 *m/z*. La ionización se realizó por impacto electrónico a 70 eV con la fuente iones a 250 °C. El horno del cromatógrafo fue programado a 60 °C por 2 min, luego se incrementó la temperatura a una razón de 10 °C min⁻¹ hasta alcanzar los 300 °C y mantenida por cinco minutos. La interface fue programada a 250 °C.

La identidad de E-β-farneseno fue corroborada por comparación de su tiempo de retención y espectro de masas con aquellos obtenidos por inyección del estándar comercial (Sigma Aldrich, St. Louis, USA). Para cuantificar la cantidad de E-β-farneseno en cada muestra, se confeccionó una curva de calibración usando cinco concentraciones 1,0 ng µl⁻¹; 2,0 ng µl⁻¹, 3,0 ng µl⁻¹, 4,0 ng µl⁻¹ y 5,0 ng µl⁻¹.

Un total de 15 áfidos sincronizados de tercer instar fueron pesados individualmente para cada genotipo de *M.persicae* infectado y no infectado con *H. defensa*. Cada áfido fue colocado con un pincel en un pocillo de papel aluminio sobre un ice-pack para así evitar su movimiento, posteriormente fueron pesados en una microbalanza (mg) XS3DU, Mettler Toledo, Greifensee, Suiza. Las cantidades de E-β-farneseno expresadas en ng por áfido fueron divididas por el peso fresco medio de cada genotipo con y sin infección de *H. defensa*.

Análisis estadísticos

La conducta de ataque y oviposición por parte de la avispa parasitoide y la conducta defensiva rechazo, defensa y sin reacción realizada por los áfidos, se evaluaron como la frecuencia de estas conductas en el periodo de observación. El efecto de los tratamientos sobre el desarrollo del parasitoide se evaluó como la proporción de momias y parasitoides emergidos, y la razón sexual secundaria como la proporción de hembras en relación a la de machos. El efecto de los tratamientos de presencia o ausencia de *H. defensa* y los cuatro genotipos de *M. persicae* se consideraron como variables independientes en un ANDEVA de dos factores con su interacción. Cuando se detectaron efectos significativos en el ANDEVA, las medias fueron comparadas según la prueba de Tukey ($P \leq 0,05$). Los datos no fueron transformados pues cumplieron los supuestos de normalidad y homoscedasticidad de varianzas.

El contenido de E-β-farneseno y peso fresco de los cuatro genotipos de *M. persicae* fueron corregidos por el peso de los áfidos. Los tratamientos de infección de *H. defensa* de cada genotipo se evaluaron como variable independiente en un ANDEVA de dos factores con su respectiva interacción. Al determinar efectos significativos en el ANDEVA se compararon las medias a través de la prueba Tukey ($P \leq 0,05$). Los datos de E-β-farneseno

fueron transformados por log para cumplir con los supuestos de normalidad y homoscedasticidad de varianzas.

6. RESULTADOS

Identificación de las diferentes bacterias endosimbióticas y discriminación alélica

Los cuatro genotipos de *M.persicae* seleccionados fueron: MpCh II, MpCh IV, MpCh VII y MpCh XIV. Los cuatro genotipos presentaron el endosimbionte primario *Buchnera aphidicola*. Estos cuatro genotipos presentaban linajes asexuales recolectados en campo con y sin infestación de *H. defensa*. Los cuatro genotipos fueron susceptibles para las mutaciones MACE, kdr y súper kdr.

Infectividad y virulencia

En la Tabla 1 podemos observar que los parasitoides atacan más a los genotipos que no presentan la infección de *H. defensa*. En particular, los genotipos MpCh II y MpCh VII sin infección de *H. defensa* fueron más atacados que los genotipos MpCh IV y MpCh XIV en esta misma condición. La mayor frecuencia de ataques a los genotipos sin infección de *H. defensa*, resultó también en una mayor frecuencia de pinchazos del parasitoide en los genotipos sin infección de *H. defensa*. Similarmente, los genotipos sin infección de *H. defensa* presentaron una mayor frecuencia de rechazos de oviposición por parte del parasitoide. Sin embargo, los genotipos sin infección de *H. defensa* presentaron una mayor frecuencia de conductas defensivas que los genotipos infectados. Finalmente, no hubo

diferencias en la frecuencia de ausencia de reacción defensiva en los diferentes genotipos independientemente de su condición de infección con *H. defensa*.

La Tabla 2 muestra que los genotipos de *M. persicae* con y sin la infección de *H. defensa* no presentan diferencias en el porcentaje de momificación ni tampoco en la emergencia de los individuos momificados, sin embargo en la razón sexual secundaria (SSR), el genotipo MpCh XIV sin la infección de *H. defensa* presenta el menor SSR.

Tabla 1. Conducta de oviposición del parasitoide *A. colemani* y conducta defensiva de cada genotipo del áfido *M. persicae* con y sin *H. defensa*. Hd-: Sin *Hamiltonella defensa*; Hd+: Con *Hamiltonella defensa*; Ataque: búsqueda y contacto antenal de la avispa; Pinchazo: contacto del ovipositor de la avispa con el áfido; Rechazo: la avispa no tiene contacto del ovipositor con el áfido; Defensa: conducta del áfido para defenderse del ataque de la avispa, ya sea pateo, espasmos, caminar o secreción cornicular; Sin Reacción: el áfido inmóvil, no se defiende. Medias en cada columna con diferente letra son significativamente diferentes según ANDEVA y prueba de Tukey ($P \leq 0,05$).

Genotipo	Infección	Parasitoide			Áfido	
		Ataque	Pinchazo	Rechazo	Defensa	Sin Reacción
MpCh II	Hd-	11,9 a	9,3 a	10,9 a	7,1 a	3,9
	Hd+	7,7 c	6,5 b	7,3 b	2,9 b	4,4
MpCh IV	Hd-	10,6 b	9,3 a	11,4 a	6,7 a	4,7
	Hd+	7,2 c	6,1 b	7,6 b	3,1 b	4,5
MpCh VII	Hd-	11,9 a	9,4 a	11,4 a	6,8 a	4,6
	Hd+	7,7 c	6,4 b	7,5 b	3,1 b	4,4
MpCh XIV	Hd-	10,8 b	9,6 a	11,5 a	6,8 a	4,7
	Hd+	7,7 c	6,4 b	7,3 b	2,7 b	4,6

Tabla 2. Desarrollo del parasitoide *A. colemani* para cada genotipo de *M. persicae* con y sin *H. defensa*. Infección: Hd-: Sin *Hamiltonella defensa*; Hd+: Con *Hamiltonella defensa*;

Momificación: Porcentaje de momificación; Emergencia: Porcentaje de adultos emergidos; SSR (hembras/machos): Razón sexual secundaria. Medias en cada columna con diferente letra son significativamente diferentes según ANDEVA y prueba de Tukey ($P \leq 0,05$).

Genotipo	Infección	Momificación (%)	Emergencia (%)	SSR (H/M)
MpCh II	Hd-	100	97	0,6 ab
	Hd+	100	99	0,6 ab
MpCh IV	Hd-	90	98	0,6 ab
	Hd+	100	98	0,8 b
MpCh VII	Hd-	100	100	0,6 ab
	Hd+	90	100	0,7 b
MpCh XIV	Hd-	90	96	0,5 a
	Hd+	100	98	0,7 ab

Análisis del contenido de E-β-farneseno según el peso corporal de los áfidos

Los genotipos MpCh II, MpCh IV y MpCh VII con infección de *H. defensa* presentaron un mayor contenido de E-β-farneseno que cuando no estaban infectados con *H. defensa*. En el caso del genotipo MpCh XIV esta diferencia no resultó ser significativa (Tabla 3). En relación al peso fresco todos los genotipos presentaron un mayor peso fresco corporal al estar sin la infección de *H. defensa*.

Tabla 3. Cantidad de E-β-farneseno corregido con el peso corporal de los áfidos de cada genotipo de *M. persicae* con y sin la infección de *H. defensa*. Hd-: Sin *Hamiltonella defensa*; Hd+: Con *Hamintonella defensa*. Medias en cada columna con diferente letra son significativamente diferentes según ANDEVA y prueba de Tukey ($P \leq 0,05$).

Genotipo	Infección	Feromona (ng/mg)	Peso fresco (mg)
-----------------	------------------	-------------------------	-------------------------

MpCh II	Hd-	0,421 ab	0,110 a
	Hd+	0,236 c	0,070 c
MpCh IV	Hd-	0,508 ab	0,107 ab
	Hd+	0,222 c	0,0743 c
MpCh VII	Hd-	0,547 a	0,098 b
	Hd+	0,363 bc	0,070 c
MpCh XIV	Hd-	0,374 abc	0,104 ab
	Hd+	0,229 c	0,068 c

7. DISCUSIÓN

Los insectos constituyen un buen modelo para el estudio de relaciones simbióticas entre eucariontes y procariontes, debido a las estrechas interacciones que presentan con sus bacterias endosimbiontes, destacando los áfidos por su coexistencia con endosimbiontes obligados o facultativos (Gil et al., 2004), estos últimos pueden afectar diferentes rasgos de los áfidos como la supervivencia tasa reproductiva, protección contra enemigos naturales o su respuesta a presiones medioambientales (Oliver et al., 2003; Moran et al., 2005; Scarborough et al., 2005). El endosimbionte *H. defensa* se ha descrito que confiere protección al áfido *A. pisum*, contra la avispa parasitoide *A. ervi* (Oliver et al., 2003; Moran & Hunter, 2005), así como al áfido *A. fabae* frente al parasitoide *L. fabarum* (Vorburger et al., 2009). Sin embargo, hasta ahora, no se había estudiado esta asociación simbiótica entre el áfido *M. persicae* y *H. defensa*.

En este estudio los resultados muestran que la bacteria endosimbiótica *H. defensa* afecta las conductas defensivas de *M. persicae*, frente a la avispa parasitoide *A. colemani*, ya que los áfidos con *H. defensa* mostraron menor frecuencia de conductas defensivas como pateo, espasmos y secreción cornicular en comparación con los áfidos que no poseían la bacteria. Dicha conducta defensiva por parte de los áfidos sería explicada por la infección de este endosimbionte *H. defensa*, ya que los genotipos utilizados se les realizó una prueba de mutación *kdr*, súper *kdr* y MACE para descartar la presencia de esta

mutación y una putativa influencia en las respuestas conductuales observadas. Los resultados obtenidos en la evaluación de comportamiento defensivo muestran que la presencia del endosimbionte facultativo *H. defensa* puede producir una alteración por parte del áfido y a la vez influir en la elección por parte del parasitoide, de los áfidos que atacará, resultando en una menor frecuencia de ataque y pinchazos con el ovipositor en áfidos que poseen *H. defensa*. Las modificaciones del comportamiento de los áfidos infectados con el endosimbionte *H. defensa* expuestos a los parasitoides también fueron evaluados con *A. pisum*, observándose que poseía una menor agresividad y menor comportamiento de escape que los áfidos no infectados al ser atacados por *A. ervi* (Dion et al., 2011).

Muchas respuestas defensivas de los áfidos están mediadas por la percepción de la feromona de alarma E- β farneseno, presente en la secreción cornicular que liberan los áfidos al ser atacados por sus enemigos naturales (Vosteen et al., 2016). Esta feromona de alarma interfiere con la alimentación o la oviposición por enemigos naturales, provocando en las poblaciones de áfidos detener la alimentación y alejarse de peligros, generando un estado de alerta (Montgomery & Nault, 1977; Beale et al., 2006), y si la exposición se mantiene o se hace frecuente induce a los áfidos a producir morfos alados que dejan sus plantas huésped (Kunert et al., 2005), componentes que podrían ser utilizados por los parasitoides, además hay que tener en cuenta que las secreciones corniculares no sólo es la feromona de alarma volátil, sino que también otras sustancias no volátiles (Vosteen et al., 2016). Para evaluar si la variación en la producción de feromona de alarma puede afectar las respuestas conductuales medidas, se determinó la cantidad de E- β - farneseno producida por los áfidos. Por otra parte, los parasitoides son atraídos por la feromona de alarma de los áfidos, por lo que el E- β - farneseno es considerado una kairomona que aumenta sus tasas de ataque y oviposición (Micha & Wyss, 1996; Du et al., 1998, Ameixa & Kindlmann, 2012). Los resultados obtenidos muestran que las conductas defensivas evaluadas estarían siendo afectadas por la producción de feromona de alarma, ya que se encontró una reducción significativa en el contenido de E- β - farneseno en los genotipos que presentaban infección de *H. defensa*.

A diferencia de los estudios con *A. pisum*-*A. ervi* y *A. fabae*-*L. fabarum* (Oliver et al., 2003; Vorburger et al., 2009), en nuestros resultados no se encontró una reducción de la sobrevivencia en el desarrollo del parasitoide en áfidos infectados con *H. defensa*. Esto

podría ser explicado por la presencia de un “strain” de *H. defensa* sin efectos patógenos sobre el parasitoide. Para *A. pisum*-*A. ervi* se ha descrito que la virulencia de *H. defensa* sobre el parasitoide la cual es mediada por bacteriófagos *A. pisum* endosimbionte secundario (APSE) (Moran et al., 2005), los cuales si no están presentes no se afecta la sobrevivencia del parasitoide durante su desarrollo en los áfidos infectados (Ferrari et al., 2004; Bensadia et al., 2005; Oliver et al., 2003; Oliver et al., 2005). La infección con *H. defensa* confiere niveles variables de protección contra el ataque por *A. ervi* dependiendo de la cepa del simbiote y los bacteriófagos asociados que infectan el endosimbionte bacteriano (Moran et al., 2005; Oliver et al., 2005; Oliver et al., 2009; Degnan & Moran, 2008). Por ejemplo, los áfidos infectados con *H. defensa* y fago APSE3 reciben altos niveles de protección, mientras que los que carecen de APSE no reciben protección (Oliver et al., 2009). A partir de los resultados de ausencia de efecto sobre el desarrollo de *A. colemani* en *M. persicae* infectados con *H. defensa*, surge una nueva línea de investigación de identificación de fagos asociados a la infección del endosimbionte secundario en estas especies.

La asociación del áfido *M. persicae* y el simbiote *H. defensa* podría generar un costo en el fitness de los áfidos, la causa subyacente es desconocida, pero *H. defensa* es auxotrófico para la mayoría de los aminoácidos esenciales y probablemente se basa en el áfido y compite por los nutrientes con su endosimbionte obligado *Buchnera aphidicola*, reduciendo los recursos disponibles para el crecimiento y reproducción (Degnan et al., 2009; Weldon et al., 2012). Esto podría explicar el menor peso fresco corporal de los áfidos infectados con *H. defensa*.

Los resultados obtenidos en este trabajo hacen necesarios nuevos estudios tendientes a conocer y relacionar las respuestas obtenidas en condiciones de laboratorio con lo que ocurre en el campo, para así optimizar las estrategias de control biológico para esta importante plaga agrícola cuando está asociada al endosimbionte *H. defensa*. Debemos tomar en cuenta que este ensayo fue realizado en condiciones de laboratorio, aunque los áfidos venían infectados desde campo, pero posiblemente dichos resultados se vean enfrentados a otra realidad como es el caso de Darby et al. (2003) en donde informaron que la fecundidad de los áfidos *A. pisum* que albergan a *H. defensa* no difiere de los áfidos sin este simbiote en condiciones naturales, lo que sugiere que los simbioses pueden tener

efectos poco significantivos en el campo, por lo que se hace necesario desarrollar más estudios para establecer efectos de simbiote sobre rasgos ecológicamente relevantes en el medio ambiente natural.

En conclusión los resultados de este trabajo indican que el efecto de la bacteria endosimbionte *H. defensa* en el áfido *M. persicae* defiende en conductas más que por un menor desarrollo, esto debido a la menor cantidad de E- β - farneseno, menor tamaño corporal y menor defensa de los genotipos de *M. persicae* y por un menor ataque, pinchazo y rechazo del parasitoide *A. colemani*.

8. REFERENCIAS

Antolin, M. F., Bjorksten, T. A., & Vaughn, T. T. (2006). Host-related fitness trade-offs in a presumed generalist parasitoid, *Diaeretiella rapae* (Hymenoptera: Aphidiidae). *Ecological Entomology*, *31*(3), 242-254.

Ameixa, O. M. C. C., & Kindlmann, P. (2012). Effect of synthetic and plant-extracted aphid pheromones on the behaviour of *Aphidius colemani*. *Journal of applied entomology*, *136*(4), 292-301.

Baumann, P. (2005). Biology of bacteriocyte-associated endosymbionts of plant sap-sucking insects. *Annu. Rev. Microbiol.*, *59*, 155-189.

Bass, C., Puinean, A. M., Zimmer, C. T., Denholm, I., Field, L. M., Foster, S. P., & Williamson, M. S. (2014). The evolution of insecticide resistance in the peach potato aphid, *Myzus persicae*. *Insect biochemistry and molecular biology*, *51*, 41-51.

Beale, M. H., Birkett, M. A., Bruce, T. J., Chamberlain, K., Field, L. M., Huttly, A. K., & Prosser, I. M. (2006). Aphid alarm pheromone produced by transgenic plants affects aphid and parasitoid behavior. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *103*(27), 10509-10513.

Bensadia, F., Boudreault, S., Guay, J. F., Michaud, D., & Cloutier, C. (2006). Aphid clonal resistance to a parasitoid fails under heat stress. *Journal of Insect Physiology*, 52(2), 146-157.

Broderick, N. A., Raffa, K. F., & Handelsman, J. (2006). Midgut bacteria required for *Bacillus thuringiensis* insecticidal activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(41), 15196-15199.

Borodovsky, M., & McIninch, J. (1993). GENMARK: parallel gene recognition for both DNA strands. *Computers & chemistry*, 17(2), 123-133.

Buchner P, editor. (1965) Endosymbiosis of animals with plant microorganisms. New York: John Wiley. 909 p.P. Buchner Endosymbiosis of animals with plant microorganisms 1965 New YorkJohn Wiley

Bull, J. J. (1983) *Evolution of Sex Determining Mechanisms*, ed. Bull, J. (Benjamin/Cummings, Menlo Park, CA)

Blackman, R. L., & Eastop, V. F. (2000). *Aphids on the world's crops: an identification and information guide* (No. Ed. 2). John Wiley & Sons Ltd.

Darby, A. C., Tosh, C. R., Walters, K. F. A., & Douglas, A. E. (2003). The significance of a facultative bacterium to natural populations of the pea aphid *Acyrtosiphon pisum*. *Ecological Entomology*, 28(2), 145-150.

Degnan, P. H., & Moran, N. A. (2008). Diverse phage-encoded toxins in a protective insect endosymbiont. *Applied and environmental microbiology*, 74(21), 6782-6791.

Degnan, P. H., Yu, Y., Sisneros, N., Wing, R. A., & Moran, N. A. (2009). *Hamiltonella defensa*, genome evolution of protective bacterial endosymbiont from pathogenic ancestors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(22), 9063-9068.

Desneux, N., Barta, R. J., Hoelmer, K. A., Hopper, K. R., & Heimpel, G. E. (2009). Multifaceted determinants of host specificity in an aphid parasitoid. *Oecologia*, *160*(2), 387-398.

Dion, E., Polin, S. E., Simon, J. C., & Outreman, Y. (2011). Symbiont infection affects aphid defensive behaviours. *Biology letters*, *7*(5), 743-746.

Douglas, A. E. (1998). Nutritional interactions in insect-microbial symbioses: aphids and their symbiotic bacteria *Buchnera*. *Annual review of entomology*, *43*(1), 17-37.

Du, Y., Poppy, G. M., Powell, W., Pickett, J. A., Wadhams, L. J., & Woodcock, C. M. (1998). Identification of semiochemicals released during aphid feeding that attract parasitoid *Aphidius ervi*. *Journal of chemical Ecology*, *24*(8), 1355-1368.

Dunbar, H.E., Wilson, A.C.C., Ferguson, N.R. & Moran, N.A. (2007) Aphid thermal tolerance is governed by a point mutation in bacterial symbionts. *PLoS Biology*, *5*, 1006–1015.

Ferrari, J., Darby, A. C., Daniell, T. J., Godfray, H. C. J., & Douglas, A. E. (2004). Linking the bacterial community in pea aphids with host-plant use and natural enemy resistance. *Ecological Entomology*, *29*(1), 60-65.

Foster, S. P., Kift, N. B., Baverstock, J., Sime, S., Reynolds, K., Jones, J. E., & Tatchell, G. M. (2003). Association of MACE-based insecticide resistance in *Myzus persicae* with reproductive rate, response to alarm pheromone and vulnerability to attack by *Aphidius colemani*. *Pest management science*, *59*(11), 1169-1178.

Foster, S. P., Cox, D., Oliphant, L., Mitchinson, S., & Denholm, I. (2008). Correlated responses to neonicotinoid insecticides in clones of the peach-potato aphid, *Myzus persicae* (Hemiptera: Aphididae). *Pest management science*, *64*(11), 1111-1114.

Gil, R., Latorre, A., & Moya, A. (2004). Bacterial endosymbionts of insects: insights from comparative genomics. *Environmental microbiology*, 6(11), 1109-1122.

González, D., Hagen, K. S., Stary, P., Bishop, G. W., Davis, D. W., Pike, K. S. (1995) in *Biological Control in the Western United States*, ed. Nechols, J. R. (Univ. California, Div. Agric. Nat. Resources, Oakland, CA)

Ikeda-ohtsubo & Brune, A. (2009). Cospeciation of termite gut flagellates and their bacterial endosymbionts: *Trichonympha* species and ‘*Candidatus Endomicrobium trichonymphae*’. *Molecular ecology*, 18(2), 332-342.

Kunert, G., Otto, S., Röse, U. S., Gershenson, J., & Weisser, W. W. (2005). Alarm pheromone mediates production of winged dispersal morphs in aphids. *Ecology Letters*, 8(6), 596-603.

Klein, C., Waterhouse, D.F. (2000) *Distribution and importance of arthropods associated with agriculture and forestry in Chile*. Canberra, ACIAR Monograph no. 68.

Margaritopoulos J, Kasprowicz L, Malloch G, Fenton B (2009). Tracking the global dispersal of a cosmopolitan insect pest, the peach potato aphid. *BMC Ecology* 9: 13.

Micha, S. G., & Wyss, U. (1996). Aphid alarm pheromone (E)- β -farnesene: A host finding kairomone for the aphid primary parasitoid *Aphidius uzbekistanicus* (Hymenoptera: Aphidiinae). *Chemoecology*, 7(3), 132-139.

Montgomery, M.E. & Nault, L.R. (1977). Comparative response of aphids to the alarm pheromone, (E)-beta-farnesene. *Ent. Exp. Appl.*, 22, 236–242.

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 of the United States of America*, 102(47), 16919-16926.

Moran, N. A., Russell, J. A., Koga, R., & Fukatsu, T. (2005). Evolutionary relationships of three new species of Enterobacteriaceae living as symbionts of aphids and other insects. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(6), 3302-3310.

Moran, N. A., McLaughlin, H. J., & Sorek, R. (2009). The dynamics and time scale of ongoing genomic erosion in symbiotic bacteria. *Science*, 323(5912), 379-382.

Nicholls, C. I. (2008). Control biológico de insectos: *un enfoque agroecológico*. Universidad de Antioquia.

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 of the United States of America*, 102(36), 12795-12800.

Oliver, K. M., Russell, J. A., Moran, N. A., & Hunter, M. S. (2003). Facultative bacterial symbionts in aphids confer resistance to parasitic wasps. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(4), 1803-1807.

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(5943), 992-994.

Oliver, K. M., Degnan, P. H., Burke, G. R., & Moran, N. A. (2010). Facultative symbionts in aphids and the horizontal transfer of ecologically important traits. *Annual review of entomology*, 55, 247-266.

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 of the United States of America*, *102*(36), 12795-12800.

Oliver, K. M., Noge, K., Huang, E. M., Campos, J. M., Becerra, J. X., & Hunter, M. S. (2012). Parasitic wasp responses to symbiont-based defense in aphids. *BMC biology*, *10*(1), 11.

Peccoud, J., Bonhomme, J., Maheo, F., de la Huerta, M., Cosson, O. and Simon, J.-C. (2013) Inheritance patterns of secondary symbionts during sexual reproduction of pea aphid biotypes. *Insect Science*, *21*,291–300.

Ruggiero, M. A., Gordon, D. P., Orrell, T. M., Bailly, N., Bourgoin, T., Brusca, R. C., & Kirk, P. M. (2015). Correction: A higher level classification of all living organisms. *PloS one*, *10*(6), e0130114.

Russell, J. A., Latorre, A., Sabater-Muñoz, B., Moya, A., & Moran, N. A. (2003). Side-stepping secondary symbionts: widespread horizontal transfer across and beyond the Aphidoidea. *Molecular Ecology*, *12*(4), 1061-1075.

Scarborough, C. L., Ferrari, J., & Godfray, H. C. J. (2005). Aphid protected from pathogen by endosymbiont. *Science*, *310*(5755), 1781-1781.

Schoonhoven, L., van Loon, J. J., and Dicke, M. (2005). *Insect-Plant Biology*. Oxford University Press Inc.421p

Starý, P. (1995). The Aphidiidae of Chile (Hymenoptera, Ichneumonoidea, Aphidiidae). *Deutsche Entomologische Zeitschrift*, *42*(1), 113-138.

Srigiriraju, L., Semtner, P. J., Anderson, T. D., & Bloomquist, J. R. (2010). Monitoring for MACE resistance in the tobacco-adapted form of the green peach aphid, *Myzus persicae*

(Sulzer)(Hemiptera: Aphididae) in the eastern United States. *Crop Protection*, 29(2), 197-202.

Triplehorn, C. A. J., Borror, N. F., Triplehorn, D. J. C. A., & Johnson, N. F. (2005). *Borror and DeLong's Introduction to the Study of Insects* (No. QL463 B69).

Vásquez G. M., Orr D. B., Baker J. R. (2006). Efficacy assessment of *Aphidius colemani*(Hymenoptera: Braconidae) for suppression of *Aphis gossypii* (Homoptera: Aphididae) in greenhouse-grown chrysanthemum. *J. Econ. Entomol.* 99: 1104–1111.

Van Steenis, M. (1995). Evaluation and application of parasitoids for biological control of *Aphis gossypii* in glasshouse cucumber crops.

Vorburger, C., Sandrock, C., Gouskov, A., Castañeda, L. E., & Ferrari, J. (2009). Genotypic variation and the role of defensive endosymbionts in an all parthenogenetic host parasitoid interaction. *Evolution*, 63(6), 1439-1450.

Vorburger, C., Gehrler, L., & Rodriguez, P. (2010). A strain of the bacterial symbiont *Regiella insecticola* protects aphids against parasitoids. *Biology letters*, 6(1), 109-111.

Vosteen, I., Weisser, W. W., & Kunert, G. (2016). Is there any evidence that aphid alarm pheromones work as prey and host finding kairomones for natural enemies?. *Ecological entomology*, 41(1), 1-12.

Werren, J. H., & Windsor, D. M. (2000). *Wolbachia* infection frequencies in insects: evidence of a global equilibrium?. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, 267 (1450), 1277-1285.

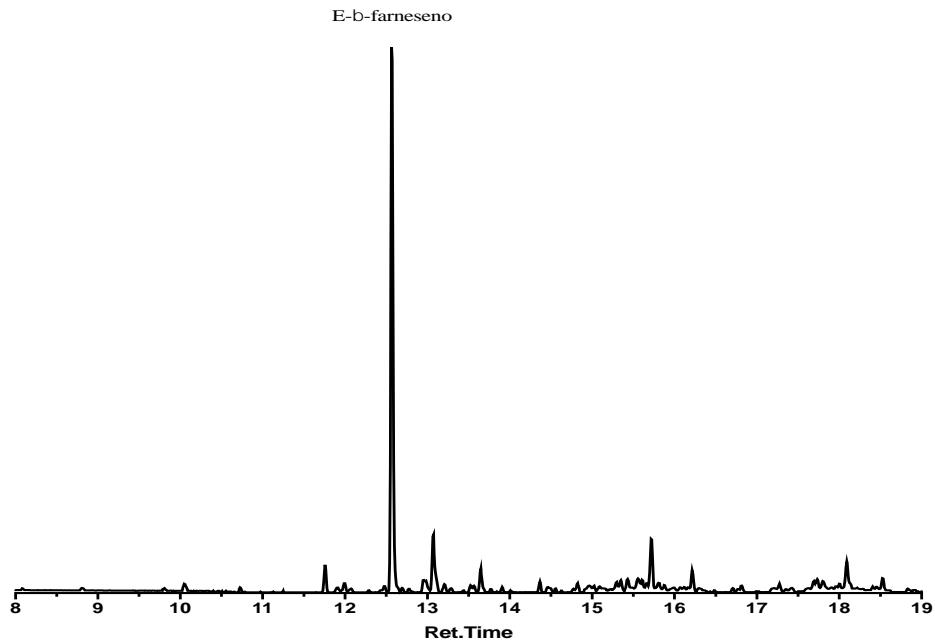
Werren, J. H., & O'Neill, S. L. (1997). The evolution of heritable symbionts. *Influential passengers: inherited microorganisms and arthropod reproduction*, 1-41.

Wernegreen, J. J. (2002). Genome evolution in bacterial endosymbionts of insects. *Nature reviews. Genetics*, 3(11), 850.

Zepeda-Paulo, F. A., Ortiz-Martínez, S. A., Figueroa, C. C., & Lavandero, B. (2013). Adaptive evolution of a generalist parasitoid: implications for the effectiveness of biological control agents. *Evolutionary applications*, 6(6), 983-999.

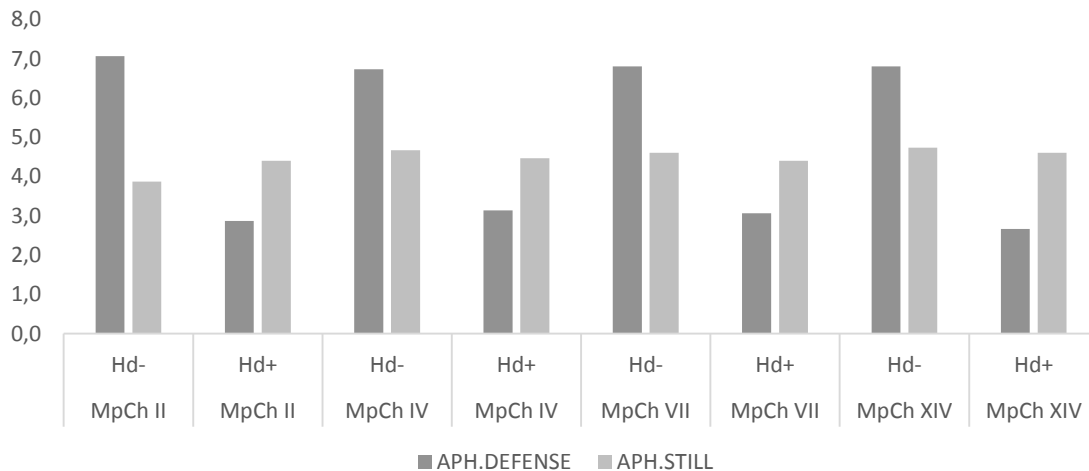
Zchori-Fein, E. I. N. A. T., & Perlman, S. J. (2004). Distribution of the bacterial symbiont *Cardinium* in arthropods. *Molecular Ecology*, 13(7), 2009-2016.

9. ANEXO

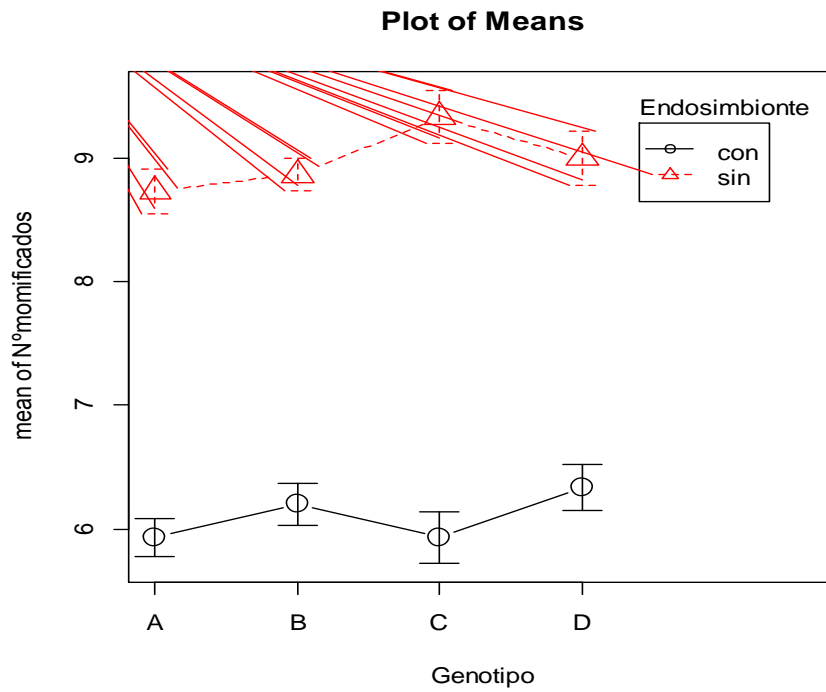


Anexo 1. Cromatograma para evaluar la concentración de E- β Farneseno en extracto de *M. persicae*.

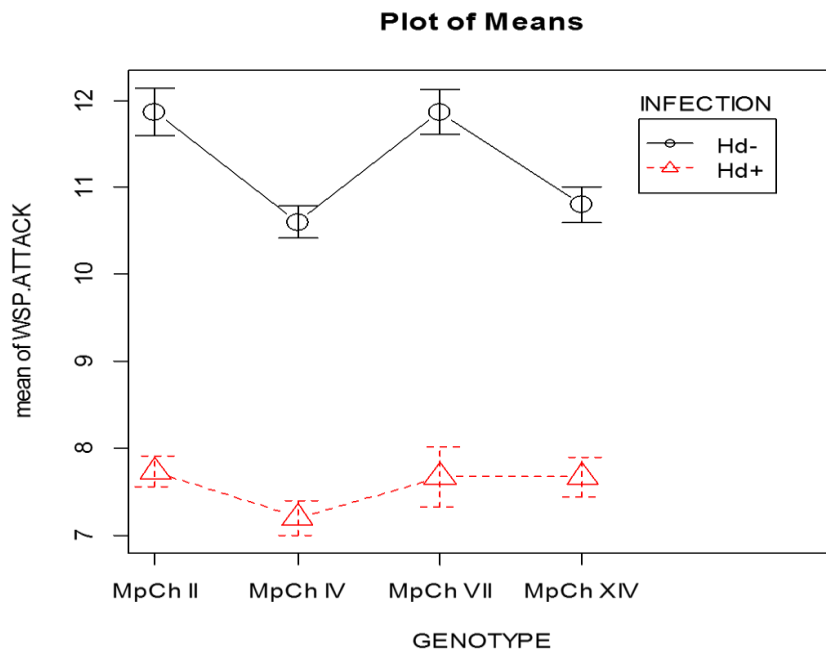
Conducta defensiva



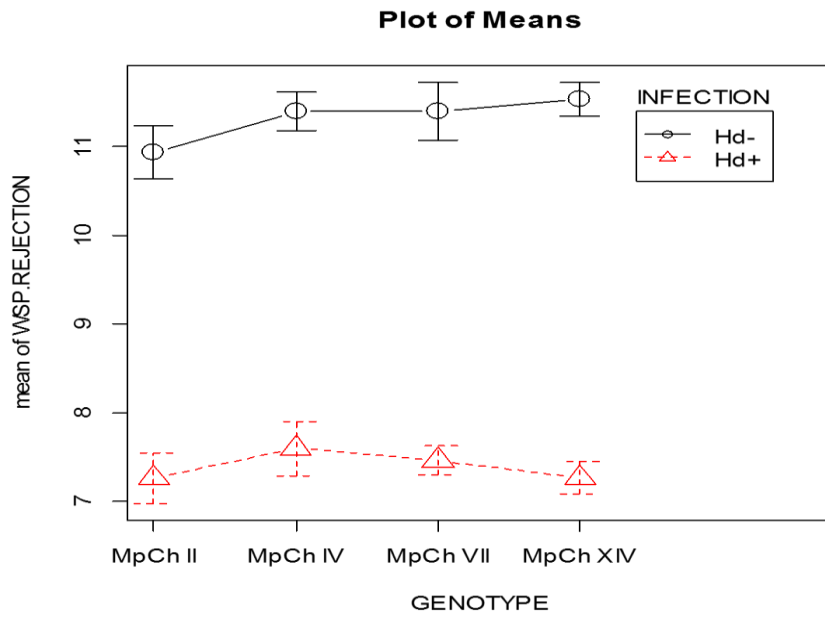
Anexo 2. Conducta defensiva de los diferentes genotipos de *M. persicae* infectados y no infectados con *H. defensa*



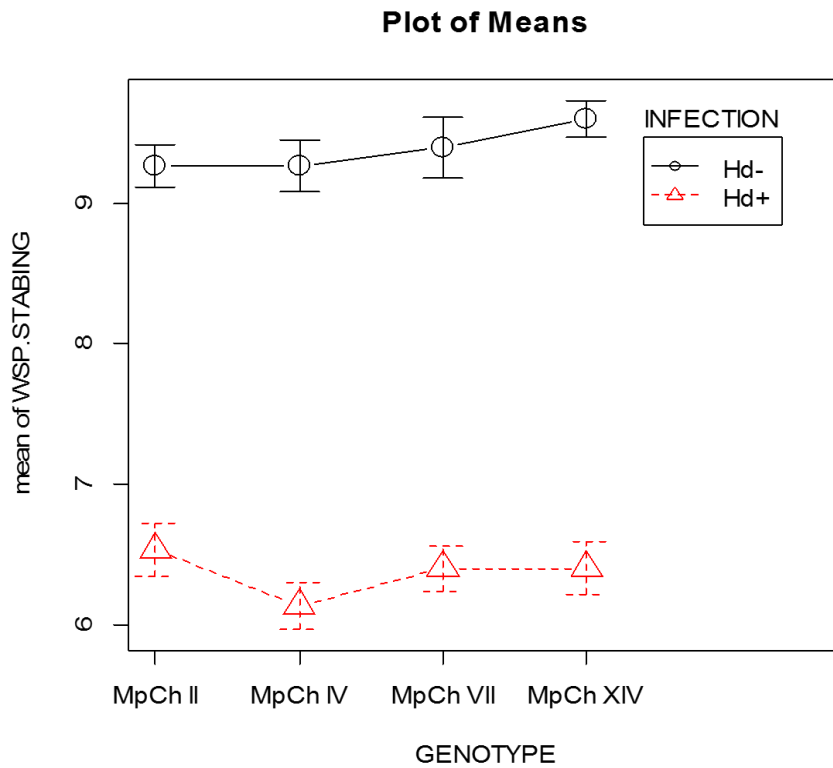
Anexo 3. Momificación de los diferentes genotipos de *M. persicae* infectados y no infectados con *H. defensa*.



Anexo 4. Ataque de la avispa en los diferentes genotipos de *M. persicae* infectados y no infectados con *H. defensa*.

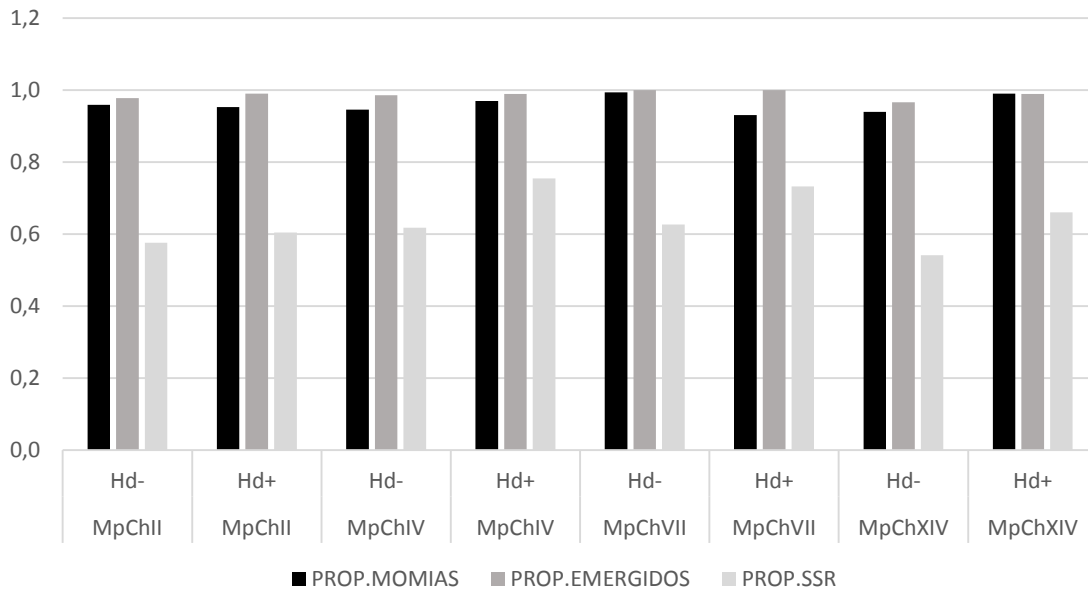


Anexo 5. Rechazo de la avispa en los diferentes genotipos de *M. persicae* infectados y no infectados con *H. defensa*.

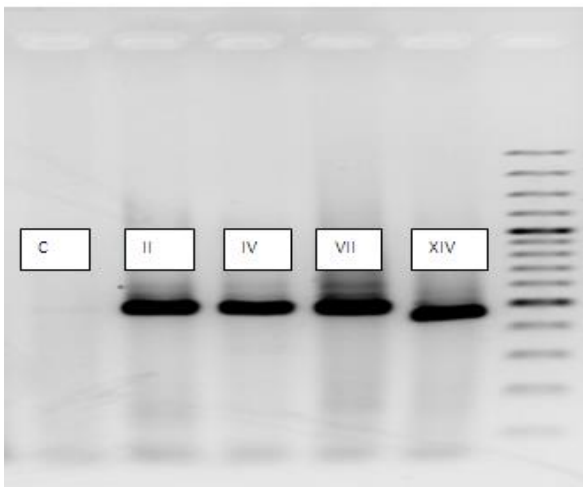


Anexo 6. Oviposición de la avispa en los diferentes genotipos de *M. persicae* infectados y no infectados con *H. defensa*.

Virulencia



Anexo 7. Proporción de momificación, emergencia y razón sexual secundaria de *A. colemani* desarrollados en los diferentes genotipos de *M. persicae* infectados y no infectados con *H. defensa*



Anexo 8. Determinación mediante amplificación de partidores específicos de la infección de bacterias endosimbióticas facultativas en los diferentes genotipos de *M. persicae*.

Univariate Tests of Significance for Attack (comportamiento.sta)					
Sigma-restricted parameterization					
Effective hypothesis decomposition					
Effect	SS	Degr. of Freedom	MS	F	p
Intercept	10659,68	1	10659,68	12249,15	0,000000
Gen	17,09	3	5,70	6,55	0,000405
Inf	414,41	1	414,41	476,20	0,000000
Gen*Inf	6,36	3	2,12	2,44	0,068494
Error	97,47	112	0,87		

Anexo 9. ANOVA de comportamiento de ataque del parasitoide *Aphidius colemani*

Univariate Tests of Significance for Pinch (Pinchazo)					
Sigma-restricted parameterization					
Effective hypothesis decomposition					
Effect	SS	Degr. of Freedom	MS	F	p
Intercept	7441,875	1	7441,875	16111,28	0,000000
Gen	1,425	3	0,475	1,03	0,382946
Inf	273,008	1	273,008	591,05	0,000000
Gen*Inf	0,958	3	0,319	0,69	0,559049
Error	51,733	112	0,462		

Anexo 10. ANOVA de comportamiento de pinchazo del parasitoide *Aphidius colemani*

Univariate Tests of Significance for rech (Spreadsheet5)					
Sigma-restricted parameterization					
Effective hypothesis decomposition					
Effect	SS	Degr. of Freedom	MS	F	p
Intercept	10509,41	1	10509,41	10993,65	0,000000
gen	2,83	3	0,94	0,99	0,402576
inf	460,21	1	460,21	481,41	0,000000
gen*inf	1,49	3	0,50	0,52	0,669290
Error	107,07	112	0,96		

Anexo 11. ANOVA de rechazo del parasitoide *Aphidius colemani*

Univariate Tests of Significance for def (Spreadsheet5)					
Sigma-restricted parameterization					
Effective hypothesis decomposition					
Effect	SS	Degr. of Freedom	MS	F	p
Intercept	2871,408	1	2871,408	5911,723	0,000000
gen	1,025	3	0,342	0,703	0,551924
inf	460,208	1	460,208	947,488	0,000000
gen*inf	1,958	3	0,653	1,344	0,263789
Error	54,400	112	0,486		

Anexo 12. ANOVA de comportamiento de defensa del áfido *Myzus persicae* con y sin *Hamiltonella defensa*

Univariate Tests of Significance for sinreac (Spreadsheet5) Sigma-restricted parameterization Effective hypothesis decomposition					
Effect	SS	Degr. of Freedom	MS	F	p
Intercept	2394,133	1	2394,133	4054,581	0,000000
gen	4,867	3	1,622	2,747	0,046262
inf	0,000	1	0,000	0,000	1,000000
gen*inf	2,867	3	0,956	1,618	0,189144
Error	66,133	112	0,590		

Anexo 13. ANOVA de comportamiento sin reacción áfido *Myzus persicae* con y sin *Hamiltonella defensa*

Univariate Tests of Significance for LOG F/P (Spreadsheet1) Sigma-restricted parameterization Effective hypothesis decomposition					
Effect	SS	Degr. of Freedom	MS	F	p
Intercept	3,152166	1	3,152166	778,0294	0,000000
GEN	0,080364	3	0,026788	6,6119	0,004092
INF	0,240361	1	0,240361	59,3268	0,000001
GEN*INF	0,016324	3	0,005441	1,3431	0,295610
Error	0,064824	16	0,004051		

Anexo 14. ANOVA del contenido de feromona de alarma en el áfido *Myzus persicae* con y sin *Hamiltonella defensa*