



Universidad de Talca  
Instituto de Ciencias Biológicas

Comparación del desempeño y respuestas defensivas del áfido del cereal  
*Sitobion avenae* (Fabricius) (Hemiptera: Aphididae) en relación a la presencia  
de endosimbiontes secundarios y planta hospedera.

*Guillermo Enrique Ramírez Cáceres*

*Tesis para optar al Grado de Magister en Ecología Aplicada*

*Profesor Guía:*

*Dr. Claudio C. Ramírez Rivera*

*Co-Guía*

*Dr. Cristian Villagra Gil*

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

Comparación del desempeño y respuestas defensivas del áfido del cereal *Sitobion avenae* (Fabricius) (Hemiptera: Aphididae) en relación a la presencia de endosimbiontes secundarios y planta hospedera.

Comparison of performance and defensive responses the cereal aphid *Sitobion avenae* (Fabricius) (Hemiptera: Aphididae) in relation to the presence of secondary endosymbionts and host plant.

Guillermo Enrique Ramírez Cáceres.

Fecha de inicio de Tesis: 14/01/2016

Fecha de Término de Tesis: 31/03/2017

---

Profesor Guía: Dr. Claudio C. Ramírez Rivera

Instituto de Ciencias Biológicas, 2 Norte 685, Talca, Universidad de Talca, Chile.

clramirez@utalca.cl

---

Profesor Co-Guía: Dr. Cristian Villagra Gil

Universidad Metropolitana de Ciencias de la Educación, Facultad de Ciencias Basicas,

Instituto de Entomología, Ñuñoa, Santiago, Chile

cristian.villagra@umce.cl

---

Revisor Externo: Dr. Blas Lavandero Icaza

Instituto de Ciencias Biológicas, 2 Norte 685, Talca, Universidad de Talca, Chile.

[blavandero@utalca.cl](mailto:blavandero@utalca.cl)

---

Dr. Marco Molina Montenegro

Instituto de Ciencias Biológicas, 2 Norte 685, Talca, Universidad de Talca, Chile.

[marco.molina@utalca.cl](mailto:marco.molina@utalca.cl)

---

## **Dedicatoria**

A:

Mi familia por el esfuerzo en conjunto que significo estos dos años de viajes, cansancio e incertidumbre, por el apoyo incondicional que recibí al partir este camino del postgrado y el desarrollo de la investigación, que si bien ninguno supo los costos de este procesos se pudo salir adelante, fruto del esfuerzo sostenido y el cariño de una gran familia.

Mi polola Yasna, de quien recibí el apoyo y paciencia eterna, quien a pesar de pagar el costo de vernos solo los fines de semana, pudo entenderme y aguantar la nostalgia de una relación de semidistancia, y que sin duda traerá sus frutos al pasar el tiempo, amo mucho.

## **Agradecimientos**

El desarrollo de esta tesis de magister no hubiera podido llevarse a cabo sin el aporte de la gente que de alguna forma contribuyo en el esfuerzo de este trabajo, principalmente al profesor Claudio Ramírez por guiar mi investigación, por confiar en mis capacidades.

Al Dr. Cristian Villagra, como olvidarlo!! Sin usted todo esta aventura hubiera sido humo sin su preocupación, muchas gracias por su entrega y preocupación, profesores así hay pocos.

Al Dr. Ricardo Ceballos por su colaboración en la metodología, por su disponibilidad y profesionalismo en su quehacer.

Al profesor Roberto Nespolo por abrir las puertas de su laboratorio de evolución experimental, por el trato amable y brindarme todo su apoyo en el mes y medio de mi estadía en Valdivia.

A mis amigos que conocí durante este largo camino, Manuel Quilodrán y Mario Moya, los cuales nos brindamos el apoyo necesario para no flaquear en momentos grises y que sin lugar a dudas seguiremos realizando investigación en conjunto en el mediano plazo, obviamente acompañado de un buen café.

También no puedo olvidar de mencionar a los chicos del laboratorio insecto-planta que me ayudaron en este proceso, como persona uno no nació sabiendo, por lo que todo lo que se en relación a mis crianzas se los debo a ellos, Nicolás Alamos Spuler y Mauricio Mosqueda por el soporte técnico recibido, como también por haber contribuido en la mantención durante mi estadía en Valdivia.

## Resumen

En las últimas décadas se han comenzado a estudiar con mayor profundidad en el contexto ecológico de la simbiosis bacteriana en insectos. En particular, se ha descrito que bajo ciertas condiciones ecológicas, los endosimbiontes secundarios confieren ventajas adaptativas condicionales a sus hospederos, las cuales han sido particularmente estudiadas en los áfidos. Sin embargo, hasta la fecha no se ha evaluado el efecto de áfidos infectados con el endosimbionte secundario *R. insecticola* frente a coccinélidos. En el presente estudio se abordó el efecto de la presencia de *R. insecticola* sobre el desempeño de las conductas defensivas de *S. avenae* y el efecto mediador de la planta hospedera. Para esto se evaluó 1) el porcentaje de depredación del coccinélido *Hippodamia variegata* sobre individuos de *S. avenae* infestados y no infestados con *R. insecticola*, 2) las concentraciones constitutivas de la feromona de alarma, 3) la conducta defensiva de evasión, 4) la tasa metabólica estándar y 5) el desempeño reproductivo en dos especies de plantas hospederas como trigo y cebada. Los resultados muestran diferencias significativas en el porcentaje de depredación como así también en los niveles de E-β-farneseno y el desempeño en las distintas plantas hospederas. Nuestros resultados apuntan a que efectivamente *R. insecticola* estaría generando en el áfido del grano *S. avenae* cierta variación en rasgos defensivos de características más bien fisiológicas que conductuales, como así también el desempeño a nivel poblacional estaría dependiendo de la planta hospedera

# Índice

<b>Dedicatoria</b> .....	4
<b>Agradecimientos</b> .....	5
<b>Resumen</b> .....	6
<b>I. INTRODUCCIÓN</b> .....	8
1.1 Simbiosis en insectos: Endosimbiontes en áfidos .....	8
1.2 Ecología de Invasión .....	12
1.2 Modelo de estudio .....	13
1.3 Problema a estudiar .....	14
<b>II. HIPOTESIS</b> .....	14
<b>III. OBJETIVOS</b> .....	16
3.1 Objetivo general.....	16
3.2 Objetivos específicos.....	16
<b>IV. MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	17
4.1 Material biológico .....	17
4.2 Detección de endosimbionte .....	18
4.3 Conducta Defensiva .....	18
4.4 Análisis Constitutivos de E- $\beta$ -farneseno en áfidos.....	19
4.5 Tasa metabólica estándar o en reposo (SMR).....	20
4.6 Tasa de Crecimiento Poblacional (PGR).....	21
4.7 Análisis de datos.....	22
<b>V. Resultados</b> .....	23
5.1 Susceptibilidad a la depredación .....	23
5.2 Niveles constitutivos de E- $\beta$ -farneseno .....	24
5.3 Conducta defensiva .....	25
5.4 Tasa Metabólica Estándar VCO <sub>2</sub> .....	26
5.6 Producción de alados.....	29
<b>VI. Discusión</b> .....	31
<b>VII. Bibliografía</b> .....	37
<b>VIII. Anexos</b> .....	45



# I. INTRODUCCIÓN

## 1.1 Simbiosis en insectos: Endosimbiontes en áfidos

El término “simbiosis” fue propuesto inicialmente por Anton de Bary, que lo definió como la convivencia entre dos organismos diferentes. Hoy en día el término abarca relaciones beneficiosas, perjudiciales y neutrales (Relman, 2008). Ha sido ampliamente demostrado que muchos insectos pueden establecer asociaciones con simbiosis microbianos transmitidos verticalmente a la descendencia (Wilson & Duncan, 2015). Estos antiguos simbiosis intracelulares, comúnmente se deben a sus reducidos genomas, muchas veces incultivables fuera de sus hospederos (Wilson & Duncan, 2015). La primera evidencia insecto/endosimbionte disponible fue la del pulgón del guisante *Acyrtosiphon pisum* y su endosimbionte bacteriano *Buchnera aphidicola* (Shigenobu et al. 2000). El segundo fue el piojo del cuerpo humano, *Pediculus humanus humanus* y su endosimbionte bacteriano primario *Candidatus riesia pediculicola* (Kirkness et al. 2010), seguido rápidamente por la hormiga carpintera, *Camponotus floridanus* (Bonasio et al. 2010) y su endosimbionte *Candidatus blochmannia floridanus* (Gil et al. 2003). Otros genomas de insectos holobiontes ahora incluyen la cochinilla de los cítricos, *Planococcus citri* con sus endosimbiontes duales (Husnik et al. 2013) y la mosca tsetse, *Glossina morsitans*, con su endosimbionte *Wigglesworthia glossinidia* (Watanabe et al. 2014).

Aunque hace tiempo se sabe de insectos que forman simbiosis con bacterias, sólo en las últimas décadas se han comenzado a estudiar en un contexto ecológico (McClean et al. 2011). Muchos insectos tienen relaciones mutualistas obligados con microorganismos que proporcionan sustancias esenciales que faltan en su dieta (Moran, 2001). En otras asociaciones insecto/bacteria, existen endosimbiontes que no son esenciales para el

crecimiento y desarrollo normal de su hospedero, lo que plantea la cuestión de cómo y por qué se mantienen tales simbiosis llamados facultativos o secundarios. En algunos casos, la bacteria manipula la reproducción del hospedero de forma tal que permite que se propague a través de la población, como en la muy estudiada bacteria *Wolbachia* sp. (Werren, 1997). En otras asociaciones, el endosimbionte parece aumentar la adecuación biológica del hospedero, pero sólo bajo ciertas condiciones ecológicas los endosimbiontes secundarios al parecer confieren ciertas ventajas adaptativas condicionales a sus hospederos, las cuales han sido particularmente estudiado en los áfidos (Dion et al. 2011; Mclean et al. 2011; Oliver et al. 2005; Oliver et al. 2012). En el pulgón del guisante *A. pisum*, los endosimbiontes secundarios mejor caracterizados son tres especies de  $\alpha$ -Proteobacteria: *Regiella insecticola*, *Hamiltonella defensa* y *Serratia symbiotica* (Moran et al. 2005). La transmisión de estos endosimbiontes vía materna a través de división partenogenética obligada retiene casi el 100% de endosimbiontes en colonias de laboratorio, lo que ocurre por períodos que abarcan numerosos años y cientos de generaciones (Russell & Moran, 2005; Sandström et al. 2001). En el caso de reproducción sexual, se pueden transferir diferentes simbiosis provenientes tanto del padre como de la madre, de modo que la progenie resultante eventualmente podría retener las infecciones de ambas líneas paternas. La frecuencia de tal herencia paterna en el campo es desconocida, pero es una explicación probable para la aparición de clones doblemente infectadas en poblaciones de campo (Degnan & Moran, 2008).

En el transcurso del tiempo se ha reportado más evidencia sobre los efectos fenotípicos mediados por los endosimbiontes secundarios, siendo los áfidos organismos ideales para investigar los efectos de simbiosis facultativos (Oliver et al. 2010).

Uno de los primeros reportes que dan cuenta de la defensa contra enemigos naturales, es el caso del áfido del guisante *A. pisum* asociado al endosimbionte secundario *Hamiltonella*

*defensa*, el cual confiere resistencia contra el parasitoide *Aphidius ervi* (Oliver et al. 2003). Se demostró que la presencia de la bacteria afectó considerablemente el número de momias (infección exitosa) y el desarrollo larval del parasitoide, encontrando tasas menores en áfidos infectados en relación a los no infectados (Dion et al. 2011). Sin embargo, las conductas defensivas de áfidos infectados con esta bacteria son menores que áfidos no infectados. Aparentemente el endosimbionte permite ahorrar energía que de otra manera sería destinada a conducta defensivas (frecuencia de caída, tasa de pateo, etc.) (Dion et al. 2011).

Al parecer, *H. defensa* requiere de la infección del bacteriófago llamado APSE, con variados niveles de protección dependiendo de la cepa del virus. El bacteriófago es responsable de la síntesis de toxinas que van en desmedro del huevo y larva del parasitoide, afectando su desarrollo a través de mecanismos directos e indirectos limitando la asimilación de nutrientes desde los bacteriocitos (Martinez et al. 2014).

A la fecha solo se ha descrito un trabajo con *H. defensa* en el áfido *S. avenae*, en que se evaluaron los posibles mecanismos defensivos otorgados por la bacteria endosimbiótica. Sin embargo, experimentalmente en cuatro genotipos del áfidos del cereal, no confirió resistencia alguna contra dos parasitoides *A. ervi* y *Ephedrus plagiator*, demostrando que el simbionte no protege universalmente a sus hospederos contra parasitoides himenópteros (Laksik, 2013).

En cuanto a la bacteria *Regiella insecticola*, si bien se ha reportado evidencia de defensa en áfidos infectados contra el patógeno fúngico *Pandora neoaphidis* (Oliver, 2013), al igual que *H. defensa*, se ha demostrado vía comparación de dos especies distintas de áfidos (*Myzus persicae* y *Aphis fabae*), que existen ventajas defensivas otorgadas contra larvas de parasitoides de la especie *Aphidius colemani* (Vorburger et al. 2010). En particular, se describió una menor tasa de momificación, como también se evidenció un aumento de la

masa en individuos adultos, en áfidos infectados en comparación con áfidos no infectados (Vorburguer et al. 2010). No obstante lo anterior, hasta la fecha no hay evidencias sobre la resistencia. Asimismo, hay evidencia que *R. insecticola* en el áfido *A. pisum*, además de conferir las ventajas anteriormente descritas, está implicado en la especialización del hospdero (Leornado & Muiru, 2003). Estos autores demostraron que áfidos que poseen el simbionte *R. insecticola* fueron incapaces de sobrevivir en alfalfa, no obstante, tuvieron el doble de descendencia que otros áfidos cuando estaban en trébol. Tsuchida et al (2004), paralelamente estudió este sistema, demostrando en el áfido *A. pisum*, a través de líneas infectadas y desinfectadas que la presencia de *R. insecticola* aumenta considerablemente el desempeño medido como el número de descendencia en *Trifolium repens*, pero no así en *Vicia sativa*, demostrando la ventaja otorgada de la bacteria en cierto hospedero infectado en el áfido. Por otro lado, *R. insecticola* se ha asociado con la producción de morfos alados en condiciones de hacinamiento, en donde el áfidos del guisante que contienen *R. insecticola* producen sólo la mitad del número de crías con alas en respuesta al hacinamiento, ocupando dos genotipos diferentes en comparación con áfidos que carecen *R. insecticola*, concluyendo que esta capacidad pudiera estar influenciado por la absorción de nutrientes y correlacionada con la especialización ha hospedero (Leornado & Mondor, 2006).

## 1.2 Ecología de Invasión

Las invasiones biológicas son a menudo causadas por introducción de especies exóticas, cuya presencia en una región biogeográfica, se debe a la introducción intencional o accidental como consecuencia de la actividad humana y que tienen el potencial de propagarse en un área considerable ocupando hábitats naturales (Richardson et al. 2000). El potencial establecimiento de una especie invasora puede definirse como una población con el tamaño lo suficientemente autosuficiente para persistir indefinidamente en el nuevo hábitat (Ehler, 1998)

Las poblaciones invasoras se ven expuestas a nuevas condiciones físicas y químicas, como también a la interacción de un conjunto de diferentes organismos nativos. Esta exposición de factores tanto abióticos como bióticos tendrán potencialmente un efecto sobre las poblaciones introducidas (Yoshida et al. 2007), ya que los principales rasgos al momento de evaluar una especie invasora como exitosa se consideran las características demográficas o historia de vida (Lodge, 1993). De este modo, las invasiones en sí, generan oportunidades para investigar procesos ecológicos de manera individual, poblacional o comunitaria subyacentes a escalas espaciales como temporales (Sax et al. 2007). Los insectos herbívoros son un buen ejemplo de especies invasoras, y las causas que dan cuenta de su éxito invasor no están del todo claras.

## 1.2 Modelo de estudio

Los áfidos son insectos distribuidos en todo el mundo. También constituyen importantes plagas agrícolas (von Burg et al. 2012). En Chile, se ha registrado para el cultivo de trigo las siguientes especies de áfidos: *Metopolophium dirhodum*, *Rhopalosiphum maidis* (FITCH), *Rhopalosiphum padi* (L.), *Schizaphis graminum* (RONDANI), *Diuraphis noxia* (KURDJUMOV) y *Sitobion avenae* (FABRICIUS). En particular *S. avenae*, o más conocido popularmente como el pulgón inglés del cereal, fue introducido en Chile hace unos 40 años (Apablaza, 1974). Se cree que la plaga procede de Europa, pero actualmente se distribuye en todo el mundo (Blackman & Eastop, 1984; Figueroa et al. 2005), y ha causado graves pérdidas económicas a lo que cultivo se refiere. Este áfido es una especie que puede desarrollarse en numerosas especies de Poaceae, incluyendo cereales y algunos pastos de climas templados. En Chile posee una zona de amplia distribución que abarca la zona centro-sur del país (Apablaza, 1974; Remaudière et al. 1993; Starý et al. 1994; Fuentes-Contreras et al. 1997).

En el caso de los áfidos de los cereales en Chile, se ha logrado un exitoso manejo mediante el control biológico clásico, a través de la acción de avispas parasitoides (Gerding et al. 1989; Starý et al. 1994; Zepeda-Paulo et al. 2013) y escarabajos coccinélidos depredadores (Frazier, 1988; Hodek & Honek. 1996; Obrycki et al. 2009; Zúñiga et al. 1986; Raymond et al. 2015). El principal coccinélido depredador de *S. avenae* es *Hippodamia variegata* (Goeze) (Zúñiga et al. 1986), especie introducida desde Sudáfrica a Chile en la década de 1970. Se sabe muy poco sobre su ecología en Chile (Grez, 1997). En relación a ello, Raymond et al. (2015) reportaron una alta abundancia del coccinélido *H. variegata* en campos de configuración complejo y simple de trigo en el valle central de Chile, lo que revela

la importancia en cuanto a coccinélidos se refiere como agente de control importante en los campos del valle central de Chile.

### 1.3 Problema a estudiar

Teniendo en consideración la falta de información del efecto de endosimbiontes secundarios en la especie *S. avenae*, hasta la fecha no se ha evaluado el posible efecto de áfidos infectados con endosimbiontes secundarios específicamente de *R. insecticola* frente a coccinélidos. No se sabe cómo podría estar afectando la presencia de *R. insecticola* el desempeño como las conductas defensivas de *S. avenae*, ni cómo esto podría estar mediado por diferentes plantas hospederas. Por consiguiente, las preguntas de esta tesis son:

¿Afectará la presencia del endosimbionte facultativo *Regiella insecticola* el desempeño y la conducta defensiva del áfido del grano *Sitobion avenae* frente a la presencia del depredador *Hippodamia variegata*? Y si esto fuese así, ¿será diferencial el efecto defensivo otorgado por la presencia del endosimbionte facultativo *R. insecticola* en *S. avenae* dependiendo del de la planta hospedera?

## II. HIPOTESIS

- i. La presencia del endosimbionte facultativo afectará el desempeño y las respuestas defensivas positivamente del áfido del grano *Sitobion avenae* frente a la presencia del depredador *Hippodamia variegata*.
  
- ii. El desempeño y el efecto en las respuestas defensivas otorgadas por la presencia del endosimbionte facultativo en *S. avenae* será diferencial dependiendo de la planta hospedera usada por *S. avenae*.



### III. OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo general

Evaluar y comparar el desempeño y las respuestas defensivas del áfido del cereal *Sitobion avenae* (Hemiptera: Aphididae) en función de la presencia de endosimbiontes secundarios como de la especie de planta hospedera.

#### 3.2 Objetivos específicos

- I. Evaluar la conducta de evasión del áfido *S. avenae* en presencia de *H. variegata*, como también el porcentaje de depredación en función de la infección con endosimbiontes secundarios sobre dos plantas hospederas (trigo y cebada).
- II. Determinar los niveles constitutivos de la feromona de alarma ( $\beta$ -farneseno) producida por *S. avenae* con y sin endosimbiontes secundarios sobre distintas plantas hospederas (trigo y cebada).
- III. Determinar el efecto de la presencia de los endosimbiontes secundarios sobre el metabolismo del áfidos *S. avenae* en función del la planta hospedera (trigo y cebada).
- IV. Evaluar el desempeño de *S. avenae* con y sin endosimbiontes secundarios sobre dos plantas hospederas (trigo y cebada).

## IV. MATERIALES Y MÉTODOS

### 4.1 Material biológico

En campo, *S. avenae* es una plaga que ataca principalmente a la familia de las Poaceae (Apablaza. 1974), con reproducción exclusivamente por partenogénesis cíclica. Por lo tanto, clones de *S. avenae* pudieron mantenerse en laboratorio bajo condiciones simulando condiciones de verano. Se trabajó con un clon de *S. avenae* donde se estableció como linaje clonal en el laboratorio insecto-planta de la Universidad de Talca.

Este genotipo fue muestreado durante la primavera de 2013 por Francisca Zepeda-Paulo, a partir de campos de trigo ubicados en Valdivia (Región de los Ríos), en la cual presentaba de manera natural la presencia y ausencia del endosimbionte facultativo *R. insecticola* (Zepeda-Paulo et al. 2016). Estos genotipos fueron mantenidos en trigo (*Triticum aestivum*, cv. Pantera-INIA) y en cebada (*hordeum vulgare*, cv. Sebastian-INIA) como plantas hospederas, ya que se ha descrito un efecto diferencial en el desempeño en clones de la misma especie (Moya-Hernández. datos no publicados; Mahieu. datos no publicados). Se mantuvieron en jaulas de crianza (50 x 40 x 30 cm), las condiciones usadas para la mantención en laboratorio fueron 16 L: 8 N, 20°C ± 1, 65% humedad. Como especie depredador se ocupó al coccinélido depredador *Hippodamia variegata* el cual fue adquirido por la empresa Xilema s.a, mantenidos en condiciones de laboratorio.

## 4.2 Detección de endosimbionte

El ADN fue extraído de cada áfido, seleccionado al azar, de manera individual por el método “salting-out”, utilizando proteinasa K y precipitación por etanol (Sunnucks & Hales, 1996). El endosimbionte facultativo fue identificado por amplificación y secuenciación la región específica del ADNr 16s siguiendo un protocolo de PCR modificado y usando al endosimbionte obligado *Buchnera aphidicola* como control positivo para la calidad del ADN (Peccoud et al. 2013; Zepeda-Paulo et al. 2016). Todas las reacciones de PCR fueron realizadas en el termociclador aMyCycler™ (BioRad, Hercules, California, USA), utilizando las siguientes condiciones: una etapa inicial de desnaturalización del ADN a 94 °C durante 5 min, 30 ciclos de 94 °C durante 30 segundos, 58 °C durante 30 segundos, y 72 °C durante 1 min, y una etapa de extensión final a 72 °C durante 5 minutos. Los amplicones se separaron por medio de electroforesis 1,7% en geles de agarosa, utilizando GeneRuler 100 Plus Ladder de ADN (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, EE.UU.). Para determinar el tamaño de cada amplicón, el endosimbionte facultativo fue identificado de acuerdo al tamaño del amplicón en pares de bases (pb) que para *R. insecticola* posee un tamaño de 840 pb obtenido a partir del ADN total de cada áfido (Peccoud et al. 2013).

## 4.3 Conducta Defensiva

Para este experimento se realizaron ensayos de conducta en placas Petri de 5cm de diámetro, donde se colocaron trozos de tejido vegetal (4 cm) infestado aproximadamente de diez áfidos adultos ápteros de *S. avenae*. Luego de ello fueron sometidos al depredador el coccinélido *Hippodamia variegata*, mantenidos en *Vicia faba* con *Acyrtosiphon pisum* como hospedero neutro, el depredador para cada replica fue desprovisto de alimentación por 24

Hrs. Los ensayos de conducta fueron grabados mediante video cámara digital HG Sony HDR-CX 440 Handycam, con el fin de evaluar a nivel de laboratorio la conducta de evasión. Se evaluó el desplazamiento de un áfido afuera del tejido vegetal frente a la depredación de *H. variegata*, esto fue realizado en los cuatro tratamientos *S. avenae*, con y sin la presencia de la bacteria facultativa *R. insecticola* tanto en trigo como en cebada, como también se evaluó el porcentaje de depredación del coccinélido depredador. Para este experimento se realizaron 20 réplicas para cada tratamiento (**Tabla 1**).

#### 4.4 Análisis Constitutivos de E-β-farneseno en áfidos

Para determinar las diferencias de E-β-farneseno en el perfil de volátiles emitido por áfidos infectados y no-infectados con *R. insecticola*, se tomaron seis muestras de diez áfidos de cada tipo (**Tabla 1**) en un tubo eppendorf y fueron extraídos con 100 μL de diclorometano con 5 ng μL<sup>-1</sup> de dodecano como estándar interno 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, Japan) equipado con una columna capilar Restek (Rxi-5ms: 5% diphenyl-95% dimetilpolisiloxano; 30 m × 0.25 mm ID × 1.0 μm; Restek Corporation, Bellefonte, Pennsylvania USA). Se empleó Helio como gas transportador, con un flujo de 0.88 mL min<sup>-1</sup>. 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 200 °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<sup>-1</sup> hasta alcanzar los 300 °C y esta temperatura fue mantenida por cinco min. 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, Missouri, USA). Para cuantificar la cantidad de *E*- $\beta$ -farneseno en cada muestra, se confeccionó una curva de calibración usando cuatro concentraciones 0,5 ng  $\mu\text{L}^{-1}$ ; 3,0 ng  $\mu\text{L}^{-1}$  y 4,0 ng  $\mu\text{L}^{-1}$

#### 4.5 Tasa metabólica estándar o en reposo (SMR)

Para estos experimentos se ocuparon áfidos adulto ápteros provenientes de trigo y cebada con y sin la presencia de la bacteria *R. insecticola*, dando un total de cuatro tratamientos. Cada áfido fue considerado como réplica, utilizando cuarenta áfidos por cada tratamiento (160 áfidos en total) (**Tabla 1**). La tasa metabólica standard o en reposo (SMR) se midió como el volumen de  $\text{CO}_2$  producido por un áfido usando un sistema de flujo descrito por Castañeda et al. (2009, 2010). Cada individuo se depositó en una jeringa de vidrio de 3ml, sellada con parafilm en su extremo y recubierta con vaselina sólida en el embolo para evitar filtraciones de gases. La jeringa fue llenada de aire libre de  $\text{CO}_2$  a una volumen de 2 ml con el áfido en su interior y colocada en una cámara climática oscura a  $20\pm 1^\circ\text{C}$ . Después de 1.5 h en la cámara climática, 0,5ml de aire de cada jeringa se inyectó (Aire ambiental con  $\text{CO}_2$  se filtró pasándolo a través de una columna de hidróxido de bario). Es sistema se mantuvo en  $100 \text{ ml min}^{-1}$  ( $\pm 1\%$ ) con un controlador de flujo másico (Sierra Instruments, Monterey, CA, EE.UU.). La salida hacia el analizador de  $\text{CO}_2$  fue grabada con el programa Expedata (Sistema Internacional de Sable, Las Vegas, NV, EE.UU.). La tasa de producción de  $\text{CO}_2$  (en  $\mu\text{l CO}_2 \text{ h}^{-1}$ ) se calculó mediante la transformación de la concentración de  $\text{CO}_2$  de ppm a fracción y multiplicando por la velocidad de flujo. A partir de cada pick de  $\text{CO}_2$  observado en el registro (correspondiente a cada inyección de aire), se calculó el área bajo la curva (integral de  $\text{CO}_2 \text{ ml min}^{-1}$  vs. min). Esta zona se consideró un indicador del volumen

de CO<sub>2</sub> producido por cada insecto en la jeringa, y este volumen se dividió por el tiempo total de medición (1,5 h), multiplicado por 1.000 para dar micro litros de CO<sub>2</sub> por hora. Cuarenta jeringas fueron completadas sólo de aire libre de CO<sub>2</sub> y manipulados como se describe anteriormente, utilizándose como blanco para las concentraciones de CO<sub>2</sub>.

#### 4.6 Tasa de Crecimiento Poblacional (PGR)

Con el fin de estudiar el efecto del endosimbionte *R. insecticola* como de la planta hospedera sobre el crecimiento poblacional en un clon de *S. avenae*, se tomaron aproximadamente 200 áfidos adultos de jaulas de crianza (Trigo con y sin la bacteria, Cebada con y sin la bacteria) colocando a los individuos de los cuatro tratamientos en plantas hospederas respectivas de forma separada. Después de 24 horas, todos los áfidos adultos fueron eliminados, y sólo las ninfas recién nacidas se mantuvieron con un diferencial de  $\pm$  24hrs de edad. Para este ensayo se realizaron once réplicas totalmente aleatorias (**Tabla 1**), cada repetición estaba compuesta por tres plántulas de trigo y cebada en la cual se depositaron cuatro ninfas como población inicial, las plántulas crecieron en una maceta (650 cc) que contenía un sustrato compuesto por 1: 1 (vermiculita: perlita), cada maceta se protegió usando un tubo de plástico transparente ventoso con aberturas cubiertas de malla de nylon.

El recuento de áfidos fue a los catorce días, permitieron evaluar la variación temporal de la abundancia de áfidos como así también poder diferenciar la proporción de áfidos alados, y como estimador de un rasgo dispersivo en todos los tratamientos. La tasa de crecimiento poblacional (PGR) se estimó como  $\ln(N_f + 0,001) - \ln(N_i) / (t_f - t_i)$ , donde  $N_f$  y  $N_i$  se refieren al número final e inicial de áfidos, respectivamente. Por otro lado,  $(t_f - t_i)$  correspondió al número de días del experimento (14 d) (Thomas et al. 2011).

## 4.7 Análisis de datos

Todos los datos fueron realizados con el paquete estadístico R 3.3.0 (R Core Team, 2012). Las variables respuesta porcentajes de evasión, depredación, porcentaje de áfidos alados fueron analizados utilizando un modelo lineal generalizado (GLM), usando una distribución del tipo binomial y una función de enlace del tipo logit, PGR y número total de áfidos fueron analizados con un GLM usando una distribución del tipo gaussiana y una función de enlace idéntico al de los datos, para todos estos análisis se corrigió la sobre dispersión de los datos en el caso de requerirlo, como también se realizaron comparaciones múltiples utilizando el test de Tukey ( $p < 0,05$ ), con el fin de verificar si entre que tratamientos existían diferencias significativas. Para la comparación de los niveles constitutivos de  $\beta$ -farneseno se realizó un test de comparación de medias independientes.

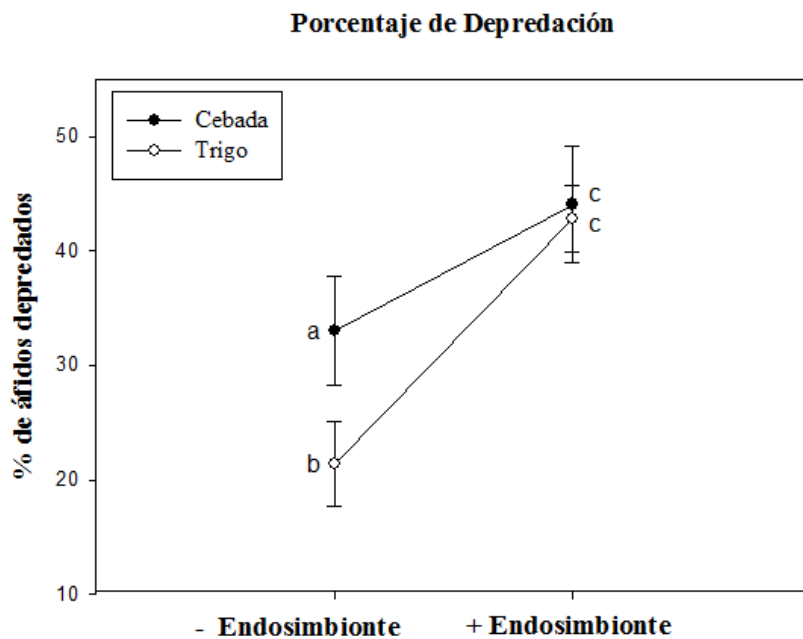
**Tabla 1.** Tratamientos ensayados por experimento *S. avenae* con y sin la bacteria facultativa *R. insecticola* con las respectivas replicas.

Clon	Hospedero	Tamaño muestra conducta defensiva	SMR	Tamaño muestra analisis de $\beta$ -farneseno	PGR
Con endosimbionte	Trigo	20	32	6	11
Con endosimbionte	Cebada	20	32	6	11
Sin endosimbionte	Trigo	20	37	6	11
Sin endosimbionte	Cebada	20	39	6	11

## V. Resultados

### 5.1 Susceptibilidad a la depredación

Se observó que áfidos que portan la bacteria *R. insecticola* son más depredados por el coccinélido depredador *H. variegata* independientemente de la planta hospedera (**Figura 1**). A su vez se observó que áfidos sin la bacteria *R. insecticola* fueron más depredados sobre cebada que sobre trigo (**Figura 1; Tabla 2**).



**Figura 1.** Porcentaje de depredación del áfido *S. avenae* frente al depredador *H. variegata* sin y con la presencia de la bacteria facultativa *R. insecticola* en trigo (círculos blancos) y cebada (círculos negros). Letras junto a los círculos indican diferencias significativas ( $P < 0.05$ ).

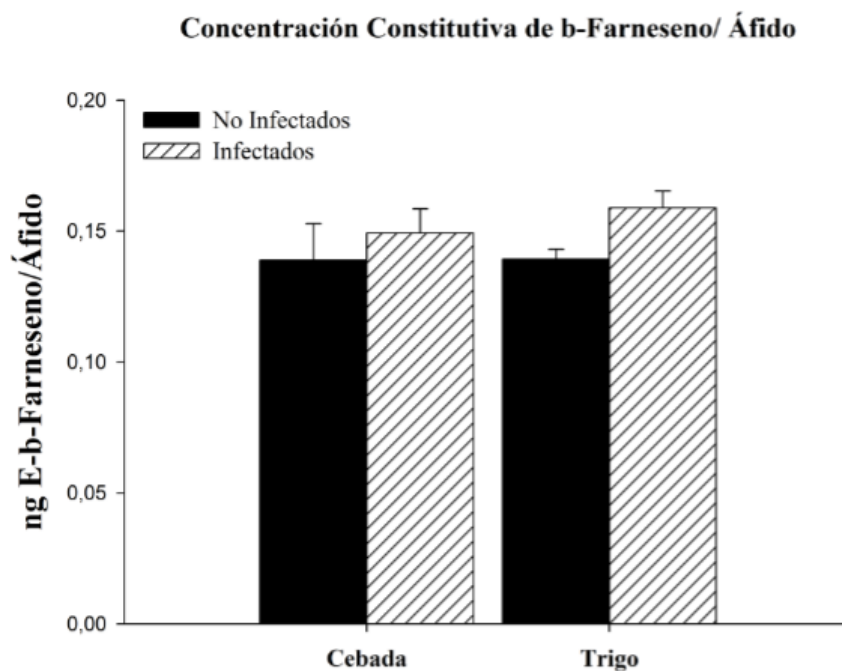


**Tabla 2.** Modelo lineal generalizado del tipo binomial para la variable de porcentaje de evasión.

Factores	X <sup>2</sup>	df	P
Endosimbionte	223.04	1	3 x 10 <sup>-4</sup> ***
Hospedero	38.72	1	0.126
Endosimbionte x Hospedero	31.05	1	0.170

## 5.2 Niveles constitutivos de E-β-farneseno

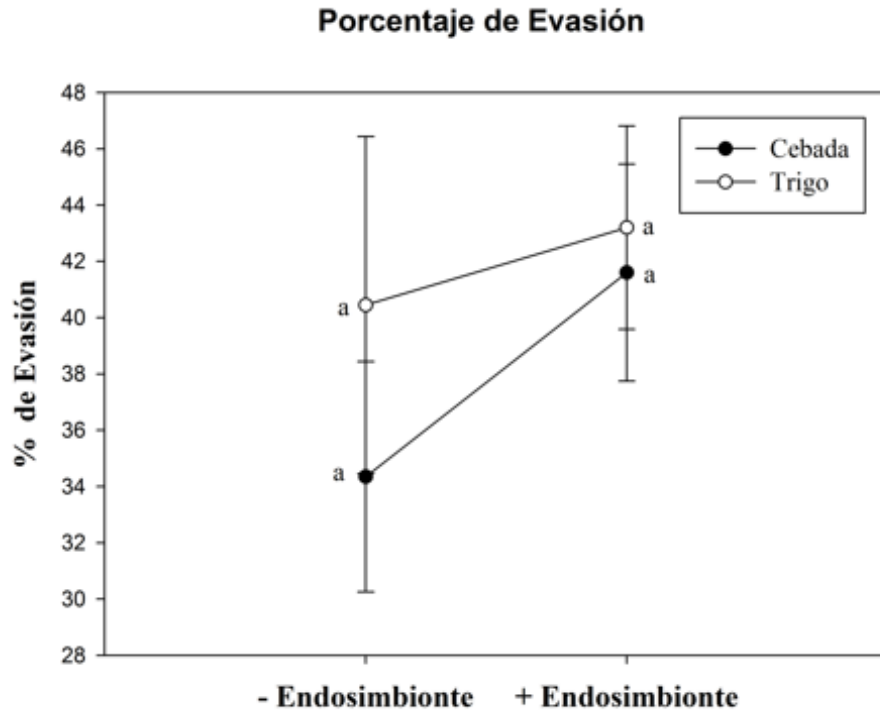
Se observaron mayores niveles constitutivos de la feromona de alarma E-β-farneseno en áfidos con la presencia de *R insecticola* que se desarrollaron en plantas de trigo. Esta situación no se observó en cebada (**Figura 2**).



**Figura 2.** Comparación de las concentraciones de  $\beta$ -farneseno entre tratamientos del áfido *S. avenae* infectado (barras blancas achuradas) y no infectado (barras negras) con la bacteria *R. insecticola*, en cebada y trigo como plantas hospederas. Asterisco sobre barras indica diferencias significativas ( $P < 0.05$ ).

### 5.3 Conducta defensiva

En relación a la conducta defensiva de evasión frente al depredador *H. variegata*, no se encontraron diferencias significativas en áfidos con la presencia o ausencia de la bacteria *R. insecticola* (**Figura 3**). La conducta tampoco varió en función de la planta hospedera (trigo y cebada), tampoco mostró interacción entre la presencia de endosimbiontes y hospedero (**Tabla 3**).



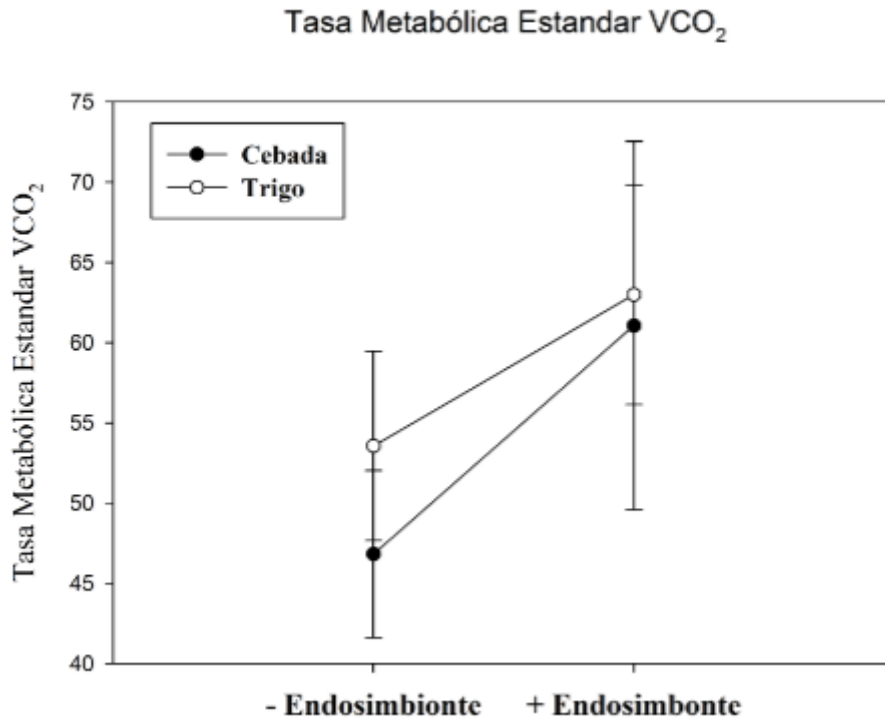
**Figura 3.** Porcentaje de evasión del áfido *S. avenae* representado en el eje Y sin y con la presencia de la bacteria facultativa *R. insecticola* representado en el eje X en trigo (círculos blancos) y cebada (círculos negros).

**Tabla 3.** Modelo lineal generalizado del tipo binomial para la variable de porcentaje de evasión

Factores	X <sup>2</sup>	g.l	P
Endosimbionte	20.89	1	0.269
Hospedero	12.40	1	0.394
Endosimbionte x Hospedero	4.56	1	0.604

#### 5.4 Tasa Metabólica Estándar VCO<sub>2</sub>

No se observaron diferencias significativas en la emisión de CO<sub>2</sub>, entre los tratamientos de áfidos con y sin la bacteria *R. insecticola*, tampoco dependiendo de la planta hospedera ni de su interacción con el endosimbionte (**Figura 4**) (**Tabla 4**).



**Figura 4.** Tasa metabólica estándar del áfido *S. avenae* representado en el eje Y sin y con la presencia de la bacteria facultativa *R. insecticola* representado en el eje X en trigo (círculos blancos) y cebada (Círculos negros).

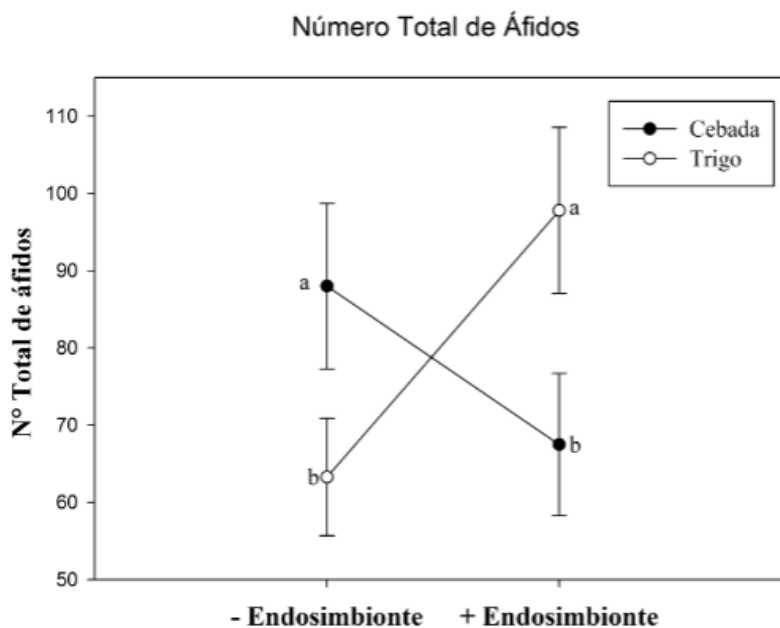
**Tabla 4.** Modelo lineal generalizado del tipo quasipoisson para la variable Tasa metabólica estándar.

Factores	X <sup>2</sup>	g.l.	P
Endosimbionte	55.53	2.723	0.102
Hospedero	10.68	0.524	0.471
Endosimbionte x Hospedero	3.44	0.168	0.682

## 5.5 Efecto en el número de áfidos

Se detectaron diferencias significativas en el número final de áfidos por efecto de la planta hospedera como en la interacción entre la planta hospedera con la bacteria *R. insecticola* (**Tabla 5**). En particular se observa que la presencia de la bacteria *R. insecticola* ejerce un efecto positivo en el número total de áfidos en el tratamiento de trigo, que se caracteriza por un mayor número de áfidos a los 14 días en comparación con el mismo tratamiento sin la bacteria- El efecto opuesto se detectó sobre cebada, donde se observa que la presencia de *R. insecticola* ejerce un efecto negativo en el número total de áfidos, observando un número menor de áfidos en relación al mismo tratamiento sin la bacteria

**Figura 5.**



**Figura 5.** Número total de áfidos a los catorce días del áfido *S. avenae* representado en el eje Y sin y con la presencia de la bacteria facultativa *R. insecticola* representado en el eje X, en

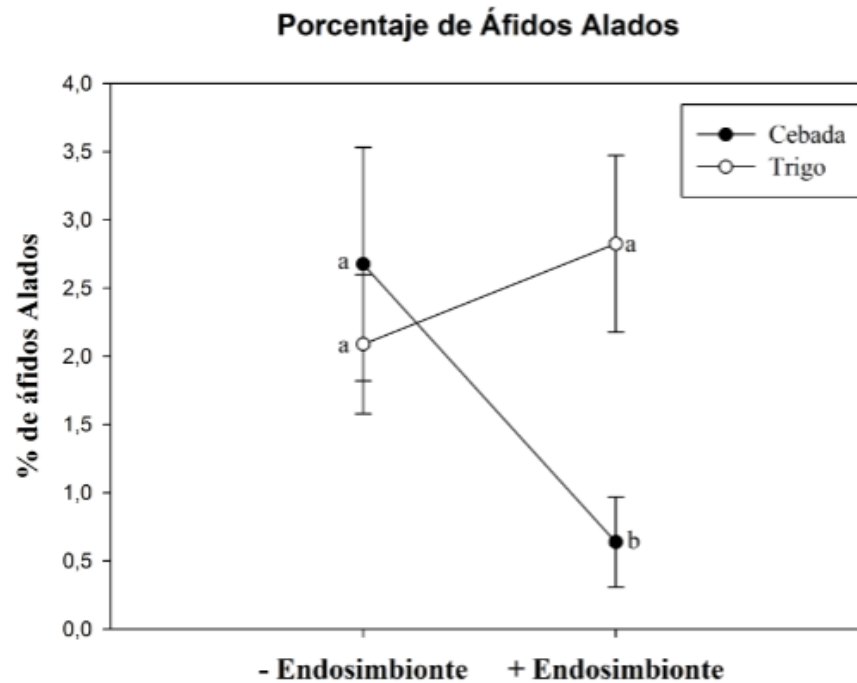
trigo (círculos blancos) y cebada (Círculos negros). Letras junto a los círculos indican diferencias significativas ( $P < 0.05$ ).

**Tabla 5.** Modelo lineal generalizado del tipo gaussiana para la variable número total de áfidos.

Factores	$X^2$	g.l.	P
Endosimbionte	4.497	1	0.165
Hospedero	1.920	1	$3 \times 10^{-2}$ *
Endosimbionte x Hospedero	68.075	1	$1 \times 10^{-5}$ ***

## 5.6 Producción de alados

Se detectaron diferencias significativas en el factor endosimbionte sobre el número de alados (**Tabla 6**), en donde áfidos con la presencia de *R. insecticola* mostraron un menor proporción de alados sobre plantas de cebada que en trigo. Estas diferencias no se observaron en ausencia de la bacteria facultativa, mostrando proporciones de alados similares a las observadas en trigo con endosimbiontes (**Figura 6**).



**Figura 6.** Proporción de áfidos alados a los catorce días del áfido *S. avenae* representado en el eje Y sin y con la presencia de la bacteria facultativa *R. insecticola* representado en el eje X, en trigo (círculos blancos) y cebada (Círculos negros). Letras junto a los círculos indican diferencias significativas ( $P < 0,05$ ).

**Tabla 6.** Modelo lineal generalizado del tipo binomial para la variable proporción de áfidos alados.

Factores	$X^2$	g.l.	Valor-P
Endosimbionte	8.2434	1	$4 \times 10^{-4**}$
Hospedero	0.0533	1	0.817
Endosimbionte x Hospedero	1.0161	1	0.313

## VI. Discusión

Este estudio se centró en cómo la presencia de la bacteria endosimbiótica *Regiella insecticola* afecta ciertos rasgos de desempeño como defensivos del áfido del grano *Sitobion avenae*. Se determinó su presencia, ya sea en áfidos criados en plantas de trigo o cebada. Frente a nuestros resultados, un hallazgo novedoso de los experimentos realizados tiene que ver con el porcentaje de susceptibilidad de depredación por parte del coccinélido *H. variegata*. Encontramos que independiente del hospedero en que se encuentre *S. avenae*, portar al endosimbionte secundario *R. insecticola* genera una mayor susceptibilidad a la depredación por parte del depredador *H. variegata*. Se determinó áfidos que no portan la bacteria son más susceptibles al coccineldo en el hospedero de cebada. Un caso similar se ha reportado el áfido del guisante *A. pisum* infectado con *H. defensa*, en donde se demostró que áfidos infectados mostraron una mayor tasa de depredación en comparación con el control (Polin et al. 2014). Otro caso interesante es el reportado es el áfido *Acyrtosiphon pisum*, en donde la infección con *Rickettsiella viridis* se asocia con coloración verde en el pulgón, menor depredación y mayor sobrevivencia frente al depredador *C. Septempunctata* (Polin et al. 2015). Esto no se observa cuando hubo infección doble con *H. defensa*, en donde áfidos más expuestos a la depredación presentaron un costo ecológico asociado principalmente a las infecciones múltiples (Polin et al., 2015). En el caso de nuestros resultados, no se observó un cambio fenotípico en el color de *S. avenae* asociado con *R. insecticola*.

Una posible explicación al resultado anterior, viene de la mano con lo observado respecto de concentración constitutiva de la fenomona de alarma,  $\beta$ -farneseno, asociada a la presencia de *R. insecticola* en función de la planta hospedera. Se determinó que en áfidos asociados con la bacteria facultativa *R. insecticola*, en el hospedero de trigo, presentan



concentraciones (ng) de  $\beta$ -farneseno significativamente mayores que áfidos sin esta asociación. No fue este en el caso de los áfidos criados sobre plantas de cebada, donde no se encontraron diferencias significativas en los niveles de  $\beta$ -farneseno entre áfidos con y sin *R. insecticola*. En este caso, la evidencia en la literatura apunta a lo contrario, en donde el áfido del guisante *Acyrtosiphon pisum* infectados con la bacteria endosimbiótica *Hamiltonella defensa*, mostraron una menor concentración de  $\beta$ -farneseno que en áfidos infectados (Oliver et al. 2012). Estos antecedentes sugieren que los depredadores y avispas parasitoides podrían discriminar estas diferencias de concentración evaluando sobre el hospedero que no posea *H. defensa*, lo que en un contexto ecológico indicaría que esta feromona de alarma podría tener propiedades de kairomona (Vosteen et al. 2016). Al respecto, Vosteen et al. (2016) reporta una treintena de publicaciones sobre la capacidad del  $\beta$ -farneseno para atraer enemigos naturales de áfidos. Sin embargo, Vosteen et al. (2016) sostiene que dada la baja cantidad de  $\beta$ -farneseno emitida por un áfido y que las plantas atacadas también liberan  $\beta$ -farneseno, este compuesto actuaría más como una sinomona más que como una kairomona. Por otro lado, teniendo en cuenta que 1) se ha descrito que coccinélidos pueden percibir concentraciones entre 1 a 1000 ng de  $\beta$ -farneseno (Vosteen et al. 2016), 2) que la mayor emisión del áfido del guisante *A. pisum* registrado es de 50 ng (Schwartzberg et al. 2008), 3) que en nuestro estudio las mayores emisiones de la feromona bordean un poco más de 0,15 ng por áfido, y que 4) en el experimento de la respuesta defensiva donde se dispusieron diez áfidos adultos aproximadamente la cantidad emitida pudo estar por sobre 1 ng, y por tanto percibidas por un coccinélido depredador como lo es *H. variegata*, la emisión de  $\beta$ -farneseno pudo ser relevante como señal para *H. variegata*. Al mismo tiempo, la planta hospedera jugaría un rol

importante en la posible modulación en la concentración constitutiva de la feromona de alarma.

En relación a la conducta defensiva nosotros no encontramos efectos sobre el comportamiento evasivo de *S. avenae* frente a la depredación del coccinélido *Hippodamia variegata*. Estos resultados son coincidentes con los obtenidos en otros estudios realizados con *S. avenae*. La presencia de bacterias facultativas en *S. avenae* no confiere efectos positivos en los mecanismos defensivos frente a varios tipos de avispas parasitoides (Lukasik et al. 2013), lo que potencialmente podría extrapolarse a otros tipos de depredadores como los coccinélidos. Igualmente, Zepeda-Paulo et al. (2016), sobre la base de muestreos a nivel de campo en cultivos de trigo y estudios experimentales, detectaron ausencia de asociación entre el genotipos infectados los endosimbiontes *H. defensa* y *R. insecticola* y parasitismo por parte de la principal avispa parasitoide *A. ervi*. Cabe destacar que en aquel trabajo se detectó que el mismo clon de *S. avenae* usado en el presente estudio (G2), una alta proporción de insectos colectados no presentó infección con endosimbiontes. Esta evidencia apunta a que la bacteria facultativa *R. insecticola* es poco frecuente en el áfido del grano *S. avenae*, y que no existiría asociación con rasgos de protección frente a depredadores. Sin embargo, resultados distintos se han reportado en la literatura para otras especies de áfidos. Por ejemplo, en el áfido del guisante *Acyrtosiphon pisum* se realizaron ensayos de comportamiento defensivo asociado a infecciones con bacterias endosimbióticas facultativas como *Hamiltonella defensa* y PAXS, frente a eventos de depredación del coccinélido depredador *Adalia bipunctata*, observándose costos conductuales defensivos asociados al número de áfidos que evadían frente al ataque del depredador en función de la presencia de *H. defensa* como en la asociación entre *H. defensa* y PAXS, demostrando costos defensivos

del áfidos al estar asociado a una bacteria endosimbiótica facultativa como a la infección múltiple de ellas (Polin et al. 2014). Así también existe evidencia de costos conductuales defensivos asociados al áfido *A. pisum* cuando en presencia de la bacteria facultativa *H. defensa* frente a la avispa parasitoide *Aphidius ervi*, observando una menor proporción en mecanismos defensivos tales como el salto de la planta hospedera y el rechazo frente al intento de oviposición por parte del parasitoide. A lo que nuestros resultados sugieren, si bien no se observaron diferencias significativas se observan ciertas tendencias que dan cuenta de cierta interacción, lo que presumiblemente la asociación entre áfido-bacteria podría tener potencialmente implicancias en otro tipo de conductas defensivas como dropping, pateo, los cuales en esta tesis no se abordaron.

Respecto de la tasa metabólica estándar (SMR), solo se observó una tendencia a una mayor SMR en *S. avenae* cuando se encuentra asociado a *R. insecticola* sobre plantas de trigo. A la fecha no se ha reportado en la literatura otros estudios metabólicos de áfidos en función de la presencia de bacterias endosimbióticas, siendo este el primer reporte de un genotipo del áfido del cereal *S. avenae* asociado a dos tipos de plantas hospederas con la presencia y ausencia de *R. insecticola*. Una posible interpretación de nuestros resultados, podría vincularse sobre la relación con las frecuencias de infección de este mismo clon con *R. insecticola* en campos de trigo encontrados por Zepeda-Paulo et al. (2016). Sin embargo, hay evidencias de cambios en el metabolismo de áfidos dependiendo de la planta hospedera. Un ejemplo de ello es en la misma especie *S. avenae*, donde se evaluaron los efectos del polifenismo entre morfos alados y ápteros asociados a las defensas químicas de la planta hospedera (ácidos hidroxámicos), demostrando una relación de plasticidad fenotípica de los morfos alados de *S. avenae* en su tasa metabólica estándar cuando estos interactuaban con su

hospedero variando en sus niveles de ácidos hidroxámicos, en comparación a los morfos ápteros que exhibieron una respuesta más bien rígida frente a los mismo tratamientos (Castañeda et al. 2010). Así también otro ejemplo es el caso de la especie *Rhopalosiphum padi*, donde se evaluó el costo de la reproducción entre genotipos sexuales y asexuales en esta especie de áfido, demostrando una correlación positiva en genotipos asexuales entre la masa del cuerpo y la tasa metabólica en la producción de individuos ápteros, por lo que aparentemente en genotipos asexuales la energía esta en gran medida asignada a la producción partenogenética (Carter et al. 2012).

Nuestros resultados sobre la tasa de crecimiento poblacional arroja claramente una interacción entre la presencia de bacteria facultativa *R. insecticola* y la planta hospedera, lo que nos podría indicar el contexto de dependencia sobre el nivel de interacción que podría tener *R. insecticola* en el crecimiento poblacional de un clon de *S. avenae* en Chile. En la literatura existe una controversia al respecto, ya que en el modelo de estudio *S. avenae* asociado a *R. insecticola*, contrariamente tiene un efecto de merma en el tiempo de desarrollo de *S. avenae*, específicamente la tasa de crecimiento finito (Luo et al. 2017), lo que al realizar mediciones poblaciones en una unidad de tiempo biológicamente razonable, se traduciría en una menor descendencia. Estudios realizados previamente con dos clones distribuidos a lo largo de la zona centro-sur de Chile hospedados en trigo, se observó el mismo patrón observado en nuestros resultados (Mahieu et al. Datos no publicados), por lo que es se vuelve interesante evaluar los reales efectos en rasgos de historia de vida que se podría estar vinculando entre *S. avenae* en Chile y *R. insecticola*, teniendo en cuenta que las frecuencias de infección en campos de trigo son relativamente bajas (Zepeda-Paulo et al. 2016).

Un hallazgo interesante de la presente investigación es el efecto que posee *R. insecticola* sobre la producción de morfos alados en la población. Los áfidos que se desarrollaron sobre cebada presentaron una menor proporción de áfidos alados que el tratamiento sin bacteria. Esto podría deberse principalmente a que este clon, como se ilustra en la Figura 5, presenta un mejor desempeño en el hospedero de cebada no asociado al endosimbionte facultativo, conllevando a un mayor número de áfidos entre adulto, ninfas potencialmente morfos alados, producto del hacinamiento durante el transcurso del experimento. Esto no ocurre cuando este clon se encuentra interactuando con *R. insecticola* sobre cebada, de modo que podría esperarse un menor desempeño y una menor proporción de morfos alados. De este modo, *R. insecticola* aparte de tener un efecto en el desempeño de los áfidos sobre una planta hospedera, pueda tener efectos indirectos sobre rasgos fisiológicos como la producción de morfos alados producto del hacinamiento.

En conclusión, nuestros resultados apuntan a que efectivamente *R. insecticola* estaría generando en el áfido del grano *S. avenae* cierta variación en rasgos defensivos de características más bien fisiológicas que conductuales, como así también efectos a nivel poblacional dependiendo de la planta hospedera. Este trabajo sugiere que bajo un escenario hipotético de un clon con amplia distribución (rango geográfico Talca-Temuco) asociado con *R. insecticola*, debería ser más predominante en los campos de trigo más que en cebada, principalmente debido a los compromisos ecológicos expresado entre el desarrollo poblacional y la depredación, lo que a su vez estarían expresándose diferencialmente entre plantas de trigo o cebada, La presencia del endosimbionte facultativo y los eventos de depredación asociados, estarían generando un rol modulador en la abundancia y distribución en sus respectivos hospederos.

## VII. Bibliografía

- Perkins, T., Phillips, B. L., Baskett, M. L., & Hastings, A. (2013). Evolution of dispersal and life history interact to drive accelerating spread of an invasive species. *Ecology Letters*, 16(8), 1079-1087.
- Apablaza, J. U. (1974). Presencia de *Macrosiphum Sitobium avenae* (Fabricius)(Homoptera, Aphididae) en sementeras de trigo en Chile. *Ciencia e Investigación Agraria*, 1(1), 69-70.
- Blackman, R. L., & Eastop, V. F. (1984). *Aphids on the world's crops. An identification and information guide*. John Wiley.
- Bonario R, et al. (2010) Genomic comparison of the ants *Camponotus floridanus* and *Harpegnathos saltator*. *Science* 329, 1068–1071.
- Carter, M. J., Simon, J. C., & Nespolo, R. F. (2012). The effects of reproductive specialization on energy costs and fitness genetic variances in cyclical and obligate parthenogenetic aphids. *Ecology and Evolution*, 2(7), 1414-1425
- Castañeda, L. E., Sandrock, C., & Vorburger, C. (2010). Variation and covariation of life history traits in aphids are related to infection with the facultative bacterial endosymbiont *Hamiltonella defensa*. *Biological Journal of the Linnean Society*, 100(1), 237-247.
- Castañeda, L. E., Figueroa, C. C., & Nespolo, R. F. (2010). Do insect pests perform better on highly defended plants? Costs and benefits of induced detoxification defences in the aphid *Sitobion avenae*. *Journal of Evolutionary Biology*, 23(11), 2474-2483.
- Castañeda, L. E., Figueroa, C. C., Bacigalupe, L. D., & Nespolo, R. F. (2010). Effects of wing polyphenism, aphid genotype and host plant chemistry on energy metabolism of the grain aphid, *Sitobion avenae*. *Journal of insect physiology*, 56(12), 1920-1924.

- Degnan, P. H., & Moran, N. A. (2008). Evolutionary genetics of a defensive facultative symbiont of insects: exchange of toxin-encoding bacteriophage. *Molecular Ecology* 17, 916-929.
- Dion, E., Polin, S. E., Simon, J. C., & Outreman, Y. (2011). Symbiont infection affects aphid defensive behaviours. *Biology Letters* 7, 743-746.
- Ehler, L. E. (1998). Invasion Biology and Biological Control 1. *Biological Control*, 13(2), 127-133.
- Figuroa, C. C., Simon, J. C., Le Gallic, J. F., Prunier-Leterme, N., Briones, L. M., Dedryver, C. A., & Niemeyer, H. M. (2005). Genetic structure and clonal diversity of an introduced pest in Chile, the cereal aphid *Sitobion avenae*. *Heredity* 95,24-33.
- Francis, F., Vandermoten, S., Verheggen, F., Lognay, G., & Haubruge, E. (2005). Is the (E)- $\beta$ -farnesene only volatile terpenoid in aphids?. *Journal of Applied Entomology* 129: 6-11.
- Frazer, B. D. 1988. Predators, p. 217-230. *En*: A. K Minks. & P. Harrewijn. (Eds). Aphids, their biology, natural enemies and control. Amsterdam, Elsevier, Vol. 2B, 364p.
- Fuentes-Contreras E, Muñoz R, Niemeyer HM (1997). Diversidad de áfidos (Hemiptera: Aphidoidea) en Chile. *Revista Chilena de Historia Natural* 70, 531–542.
- Gerding, M., Zúñiga, E., Quiroz, C.E., Norambuena, H., Vargas, R., 1989. Abundancia relativa de los parasitoides de *Sitobion avenae* (F) y *Metopolophium dirhodum* (WLK) (Homoptera: Aphididae) en diferentes áreas geográficas de Chile. *Agricultura Técnica* 42, 105-114.
- Gil, R., Silva, F. J., Zientz, E., Delmotte, F., González-Candelas, F., Latorre, A., & van Ham, R. C. (2003). The genome sequence of *Blochmannia floridanus*: comparative analysis of reduced genomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100, 9388-9393.

- González, R. H., & Pizarro, S. R. (1966). *Estudio analítico del control biológico de plagas agrícolas en Chile*. Ed. Universitaria.
- Grez, A. A. (1997). Effect of habitat subdivision on the population dynamics of herbivorous and predatory insects in central Chile. *Revista Chilena de Historia Natural* 70, 481-490.
- Honěk, A., & Hodek, I. (1996). Distribution in habitats. In *Ecology of Coccinellidae* (pp. 95-141). Springer Netherlands.
- Husnik F, et al. (2013) Horizontal gene transfer from diverse bacteria to an insect genome enables a tripartite nested mealybug symbiosis. *Cell* 153,1567–1578.
- Kirkness, E. F., Haas, B. J., Sun, W., Braig, H. R., Perotti, M. A., Clark, J. M., ... & Gerlach, D. (2010). Genome sequences of the human body louse and its primary endosymbiont provide insights into the permanent parasitic lifestyle. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107, 12168-12173.
- Leonardo, T. E., & Mondor, E. B. (2006). Symbiont modifies host life-history traits that affect gene flow. *Proceeding of the Royal Society of London B: Biological Sciences* 273, 1079-1084.
- Lodge, D. M. (1993). Biological invasions: lessons for ecology. *Trends in Ecology & Evolution*, 8(4), 133-137.
- Łukasik, P., Dawid, M. A., Ferrari, J., & Godfray, H. C. J. (2013). The diversity and fitness effects of infection with facultative endosymbionts in the grain aphid, *Sitobion avenae*. *Oecologia*, 173, 985-996.
- Luo, C., Luo, K., Meng, L., Wan, B., Zhao, H., & Hu, Z. (2017). Ecological impact of a secondary bacterial symbiont on the clones of *Sitobion avenae* (Fabricius)(Hemiptera: Aphididae). *Scientific Reports*, 7.



- Martinez, A. J., Weldon, S. R., & Oliver, K. M. (2014). Effects of parasitism on aphid nutritional and protective symbioses. *Molecular Ecology* 23, 1594-1607.
- McLean, A. H. C., Van Asch, M., Ferrari, J., & Godfray, H. C. J. (2011). Effects of bacterial secondary symbionts on host plant use in pea aphids. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences* 278, 760-766.
- Morán, N. A., & Mira, A. (2001). The process of genome shrinkage in the obligate symbiont *Buchnera aphidicola*. *Genome Biology*, 2: 1-54.
- Morán, 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, 3302-3310.
- Obrycki, J. J., Harwood, J. D., Kring, T. J., & O'Neil, R. J. (2009). Aphidophagy by Coccinellidae: application of biological control in agroecosystems. *Biological Control* 51, 244-254.
- 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, 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:,11.
- Perkins, A., Boettiger, C., & Phillips, B. (2016). After the games are over: life-history trade-offs drive dispersal attenuation following range expansion. *bioRxiv*, 014852.

- Phillips, B. L., Brown, G. P., Travis, J. M., & Shine, R. (2008). Reid's paradox revisited: the evolution of dispersal kernels during range expansion. *The American Naturalist*, 172(S1), S34-S48.
- Phillips, B. L., Brown, G. P., & Shine, R. (2010). Life-history evolution in range-shifting populations. *Ecology*, 91(6), 1617-1627.
- Polin, S., Simon, J. C., & Outreman, Y. (2014). An ecological cost associated with protective symbionts of aphids. *Ecology and evolution*, 4(6), 836-840.
- Polin, S., Le Gallic, J. F., Simon, J. C., Tsuchida, T., & Outreman, Y. (2015). Conditional reduction of predation risk associated with a facultative symbiont in an insect. *PLoS one*, 10(11), e0143728.
- R Core Team (2012) R: a language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna
- Raymond, L., Ortiz-Martínez, S. A., & Lavandero, B. (2015). Temporal variability of aphid biological control in contrasting landscape contexts. *Biological Control* 90, 148-156.
- Relman DA (2008) 'Til death do us part': coming to terms with symbiotic relationships. *Nature Reviews Microbiology* 6, 721-724.
- Remaudière, G., Starý, P., Gerding, M. (1993). *Sitobion fragariae* (Walker) and *Metopolophium festucae* cerealium Stroyan, two new cereal aphids in Chile. *Agricultura Técnica* 53, 91-92.
- Richardson DM, Pyšek P, Rejmánek M, Barbour MG, Panetta FD, West CJ. 2000. Naturalization and invasion of alien plants: concepts and definitions. *Diversity and Distributions* 6, 93-107.

- Robert, D., John, J., & Gruber, F. (1986). Control biológico de los áfidos (Homoptera: Aphididae) de los cereales en Chile. 2. Obtención, introducción y cuarentena de depredadores y parasitoides. *Agricultura Técnica* 46, 479-487.
- Russell, J. A., & Moran, N. A. (2006). Costs and benefits of symbiont infection in aphids: variation among symbionts and across temperatures. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences* 273, 603-610.
- Schwartzberg, E. G., Kunert, G., Stephan, C., David, A., Röse, U. S., Gershenzon, J., & Weisser, W. W. (2008). Real-time analysis of alarm pheromone emission by the pea aphid (*Acyrtosiphon pisum*) under predation. *Journal of chemical ecology*, 34(1), 76-81.
- Sandström, J. P., Russell, J. A., White, J. P., & Moran, N. A. (2001). Independent origins and horizontal transfer of bacterial symbionts of aphids. *Molecular Ecology* 10, 217-228.
- Sax, D. F., Stachowicz, J. J., Brown, J. H., Bruno, J. F., Dawson, M. N., Gaines, S. D., & O'Connor, M. I. (2007). Ecological and evolutionary insights from species invasions. *Trends in Ecology & Evolution*, 22(9), 465-471.
- Sepúlveda, D. A., Zepeda- Paulo, F., Ramírez, C. C., Lavandero, B., & Figueroa, C. C. (2016). Diversity, frequency, and geographic distribution of facultative bacterial endosymbionts in introduced aphid pests. *Insect science*.
- Shigenobu S, Watanabe H, Hattori M, Sakaki Y, Ishikawa H (2000) Genome sequence of the endocellular bacterial symbiont of aphids Buchnera sp. APS. *Nature* 407, 81–86.
- Starý P, Rodríguez F, Gerding M, Norambuena H, Remaudière G (1994). Distribution, frequency, host range and parasitism of two new cereal aphid pests, *Sitobion fragariae* (Walker) and *Metopolophium festucae cerealium* Stroyan (Homoptera, Aphididae), in Chile. *Agricultura Técnica* 54, 54–59.

- Thomas, S., Dogimont, C., & Boissot, N. (2011). Association between *Aphis gossypii* genotype and phenotype on melon accessions. *Arthropod-Plant Interactions*, 6(1), 93–101.
- Tsuchida, T., Koga, R., & Fukatsu, T. (2004). Host plant specialization governed by facultative symbiont. *Science*, 303, 1989-1989.
- Von Burg S, Álvarez-Alfageme F, Romeis J (2012) Indirect effect of a transgenic wheat on aphids through enhanced powdery mildew resistance. *PloS one* 7, e46333.
- 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. (1997). Biology of wolbachia. *Annual Review of Entomology* 42, 587-609.
- Wilson, A. C., & Duncan, R. P. (2015). Signatures of host/symbiont genome coevolution in insect nutritional endosymbioses. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112, 10255–10261.
- Yoshida, T., Goka, K., Ishihama, F., Ishihara, M., & Kudo, S. I. (2007). Biological invasion as a natural experiment of the evolutionary processes: introduction of the special feature. *Ecological Research*, 22(6), 849-854.
- 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; 983–999.

Zúñiga, E. (1985). Histórica y Evaluación de los Proyectos Desarrollados (1903-1983)'.  
*Agricultura Técnica (Chile)* 45, 75-183.

Zuñiga, S., Enrique, V. D. B., Robert, D., John, J., & Gruber, F. (1986). Control biológico de los áfidos (Homoptera: Aphididae) de los cereales en Chile. 2. Obtención, introducción y cuarentena de depredadores y parasitoides. *Agricultura Técnica. v, 46(4)*, 479-487.

## VIII. Anexos

- XXXVII Congreso Nacional de Entomología & II Congreso Sudamericano de Entomología. 25-27 de Noviembre, Temuco, Chile. Universidad de la Frontera. Guillermo E. Ramírez-Cáceres, Christian Gonzales, Luis Flores, Darko Cotoras & Cristian Villagra. Tema: “ESTUDIOS DE BIODIVERSIDAD EN ISLA DE PASCUA: ABUNDANCIA Y DISTRIBUCIÓN DE DIPTEROS EN RAPA NUI”.

Teniendo en consideración que el último catastro de la entomofauna en Isla de Pascua fue realizado en 1974. Este trabajo se enfoca fundamentalmente en estudiar el grupo Díptera con el fin de poder desarrollar aproximaciones del grado de Biodiversidad que presenta Isla de Pascua en la actualidad, tomando en consideración la falta de información respecto a la situación de Rapa Nui en términos de Biodiversidad. Entender los efectos del uso del suelo en la Biodiversidad de insectos, utilizando a los dípteros como modelo de estudio. Para la realización del estudio se utilizó un muestreo de 16 puntos, los cuales fueron clasificados en dos categorías. Ellas se definieron de acuerdo a las características geográficas que presentan. Sitios poco accesibles para el ganado y restringido en algún grado a la intervención humana se les denominó sitios Relictos. A su vez los sitios que si están intervenidos en algún grado por el ser humano, como la agricultura, forestación o la presencia de ganado, se les llamó sitios Antropizado. Se ocupó al grupo Díptera como modelo de estudio colectando a través de trampas pegajosas, donde se identificaron a nivel de familia. Se encontró un total de 13 familias de dípteros. Siendo significativa la relación entre el índice de Biodiversidad y el tipo de sitio (antropizado/relictos)  $P= 0.009$ , a su vez no se encontraron diferencias significativas, entre el rol ecológico y el tipo de sitio (parasito, herbívoro, descomponedores),  $P= 0.572$ . Esto sugiere que propiedades ecológicas del suelo que no han sido intervenidas severamente

por el hombre puedan servir como refugios para la biodiversidad, pero la distribución aparentemente del grupo Díptera no adquiere ningún patrón de acuerdo a sus roles ecológicos.

Palabras clave: entomofauna, refugios, shannon weaver, rol ecológico.

**Financiamiento:** Iniciativa Científica Milenio (ICM) NC120027.

- Tercer Simposio de Control Biológico 30 septiembre al 01 agosto, Chillán, Chile.  
Inia. Daniela E. Sepúlveda, Guillermo E. Ramírez-Cáceres & Christian C. Figueroa.  
Tema: “Las condiciones de crecimiento pueden modificar la adecuación biológica y la fidelidad al hospedero en el parasitoide de áfidos *Aphidius ervi* (Hymenoptera: Braconidae)”

La avispa *Aphidius ervi* es uno de los parasitoides más usados en programas de control biológico de áfidos. Estos insectos son frecuentemente importados y mantenidos por varias generaciones confinados para su multiplicación antes de ser liberados. Poco se conoce acerca del impacto que la endogamia podría tener sobre rasgos agronómicamente relevantes como la elección y fidelidad al hospedero, los cuales determinarán la especificidad y eficiencia del control biológico. El objetivo de este trabajo fue estudiar la adecuación biológica y la fidelidad al hospedero en el parasitoide *A. ervi*, comparando poblaciones experimentales generadas a partir de individuos colectados en campo, con poblaciones endogámicas (generadas a partir de una pareja) multiplicadas por aproximadamente 100 generaciones. Cada población fue establecida separadamente a partir de parasitoides colectados en campo mientras aún se desarrollaban dentro del pulgón *Acyrtosiphon pisum*. Fueron ensayados

tanto sobre su hospedero natal como no-natal (*Sitobion avenae*) midiéndose infectividad y virulencia como descriptores de fidelidad al hospedero y adecuación biológica. Resultados preliminares muestran diferencias significativas ( $P < 0,005$ ) donde la población endogámica exhibe un incremento hacia la producción de machos, entre un 60-80%, en comparación a la población exogámica, tanto para hospederos natales y no-natales, como también pérdida en fidelidad hacia su hospedero natal. Este tipo de estudios parecen importantes de realizar antes de la liberación de parasitoides en el campo con el fin de aumentar la eficiencia y eficacia del control biológico.

Financiamiento: FONDECYT 1130483

- X Reunión anual de la Sociedad Chilena de Evolución del 8 al 10 de noviembre, Concón, Chile. Guillermo E. Ramírez-Cáceres, Mario Moya-Hernández, Manuel Quilodrán, Roberto Nespolo & Claudio C. Ramírez. Tema: “Relación simbiótica entre insecto-bacteria: Efecto de la presencia del endosimbionte facultativo *Regiella insecticola* en la respuesta defensiva del áfido del cereal *Sitobion avenae* (HEMIPTERA: APHIDIDADE)”

Los áfidos presentan asociaciones facultativos con endosimbiontes (EF), una de ellas es *Regiella insecticola*, el cual confiere ventajas ecológicas como defensa contra enemigos naturales. El objetivo del trabajo fue evaluar las respuestas defensivas del áfido *Sitobion avenae*, frente al ataque del enemigo natural *Hippodamia variegata*, en función de la presencia y ausencia del EF *R. insecticola*. En cada caso se evaluó el porcentaje de evasión. También se evaluó el porcentaje de individuos consumidos. Por otro lado, se evaluó la tasa



metabólica en reposo de los insectos con y sin endosimbiontes. Se detectó que áfidos que albergan EF fueron más consumidos que aquellos que carecían del EF. También se determinó que los insectos con EF evaden en mayor proporción el ataque de *H. variegata*. Respecto a la tasa metabólica, se determinó que áfidos que portan el EF poseen una tasa metabólica menor en comparación a áfidos que no lo poseen, a su vez áfidos con el EF poseen una masa mayor. Estos resultados sugieren que la presencia del EF posee ciertos costos ecológicos en la asociación áfido-bacteria. Por último, la interacción *R. insecticola*-áfido, pueda depender de la presión de selección de la depredación, favoreciendo selectivamente ciertas frecuencias en algunos entornos como en otros no.

**Financiamiento:** Iniciativa Científica Milenio (ICM) NC120027.

XXXVII Reunión anual de la Sociedad Botánica de Chile del 8 al 10 de noviembre, Concón, Chile. Pereira I, Errázuriz I, Sandoval C, Faúndez V, Ramírez-Cáceres G E, Peñailillo P. Tema: Líquenes asociados a ecosistemas frutales en la región de Maule.

Los huertos agrícolas constituyen un buen ejemplo para estudiar cómo las comunidades de líquenes pueden colonizar estos ambientes y cómo varía la composición de líquenes durante la vida de un cultivo, dependiendo de factores antropogénicos (poda, aplicación de plaguicidas y fertilizantes). Se sabe que ciertos líquenes en estos ecosistemas, se ven beneficiados por la llegada de luz y la humedad ambiental debido a podas. También es conocido que ciertas comunidades, se adaptan a la aplicación de plaguicidas y fertilizantes. Dado que ni en el país ni en la región, se cuenta con registros de líquenes en estos ambientes, se propone en este estudio, a) conocer la riqueza de líquenes asociadas a dos cultivos frutales

y b) relacionar el pH de las cortezas con la riqueza asociada a éstos. Para ello, se registrará, la riqueza de líquenes asociada a dos cultivos: manzano y vid, en dos huertos localizados en distintos puntos, para cada especie. En cada huerto, en 15 ejemplares, se registrará la diversidad teniendo en cuenta su posición en éstos. 2 gr de cortezas de cada ejemplar, serán obtenidos para la determinación del pH. Entre los resultados preliminares, en huertos de manzano, destaca la presencia de líquenes frutícolas: *Ramalina ecklonii*, *Teloschistes chrysophthalmus*, entre los foliosos, *Xanthoria polycarpa*, *Parmelia* sp., y entre los crustáceos destaca *Haematomma* sp. y *Lecanora expallens*, en cambio, en huertos de vid destacan formas frutícolas: *Teloschistes chrysophthalmus*, *Usnea* sp., entre las foliosas *Hypogymnia* sp., *Physcia* sp. y entre las formas crustáceas *Caloplaca* sp., *Candelariella* sp., entre otras.

**Financiamiento:** Química y Bio-orgánica en Recursos Naturales e Instituto de Ciencias Biológicas

- XXXVIII Congreso Nacional de Entomología del 30 de noviembre al 2 de diciembre, Talca, Chile. Guillermo E. Ramírez-Cáceres, Mario G. Moya-Hernández, Manuel Quilodrán, Ricardo Ceballos, Cristian A. Villagra, Roberto F. Nespolo, María Eugenia Rubio-Meléndez & Claudio C. Ramírez. Tema: “COSTOS ENERGÉTICOS Y RESPUESTAS DEFENSIVAS DEL ÁFIDO DEL CEREAL *Sitobion avenae* (HEMIPTERA: APHIDIDAE) EN PRESENCIA DEL ENDOSIMBIONTE *REGIELLA INSECTICOLA*”

Los insectos presentan diversas asociaciones mutualistas con endosimbiontes obligatorios y facultativos, las cuales definen diversas dinámicas eco-evolutivas. En este

sentido, los áfidos son un excelente modelo de estudio pues presentan las dos tipos de asociaciones. El endosimbionte facultativo *Regiella insecticola* confiere protección contra enemigos naturales y hongos, pero se desconoce si representa un costo energético. El objetivo de este trabajo fue: 1) evaluar la respuesta defensiva y 2) estudiar las consecuencias fenotípicas de la presencia y ausencia de *R. insecticola* en *S. avenae*. Se realizaron experimentos de laboratorio en los que diversos individuos fueron expuestos al ataque del enemigo natural *Hippodamia variegata* (COLEOPTERA: COCCINELIDAE). Adicionalmente, como medida del costo energético determinamos la tasa metabólica en reposo (producción de CO<sub>2</sub>). Los experimentos mostraron que los áfidos que albergan *R. insecticola* fueron más consumidos que aquellos que carecían de *R. insecticola*, y además tienden a evadir mayormente el ataque de *H. variegata*. Esta conducta fue independiente de la planta hospedera de crianza (trigo y cebada). Por otro lado, detectamos que el desempeño de *S. avenae* cambia según el hospedero y la presencia de *R. insecticola* (mayor en trigo con *R. insecticola*). Las mediciones de metabolismo sugieren que los insectos con *R. insecticola* valores mayores que sin *R. insecticola*, independientemente del hospedero. Finalmente, áfidos criados en trigo que albergaron *R. insecticola*, mostraron mayores niveles de feromona de alarma (b-farneseno) en comparación a áfidos sin *R. insecticola*. Estos resultados sugieren que la presencia de *R. insecticola* genera compromisos ecológicos en los áfidos, (desarrollo vs depredación) los que se expresarían diferencialmente dependiendo de la planta hospedera.

**Agradecimientos:** Centro de Ecología Molecular (CEM) NC120027.