

UNIVERSIDAD DE COSTA RICA  
FACULTAD DE CIENCIAS BÁSICAS  
ESCUELA DE BIOLOGÍA

Trabajo final de graduación para optar por el grado de Licenciatura en Biología  
Molecular y Biotecnología

**Estandarización de técnicas moleculares en áfidos (Aphididae) para  
determinar su respuesta biológica ante variaciones en la  
temperatura ambiental y detección de sus endosimbiontes**

Izayana Sandoval Carvajal

A76075

Ciudad Universitaria Rodrigo Facio

Junio, 2017

## MIEMBROS DEL TRIBUNAL

---

Mauricio Montero Astúa, Ph.D.  
Director de tesis

---

Lisela Moreira Carmona, M.Sc.  
Lectora de tesis

---

Federico Albertazzi Castro, Ph.D.  
Lector de tesis

---

Gabriela Chavarría Soley, Ph.D.  
Miembro del tribunal

---

Daniel Briceño Lobo, M.Sc.  
Presidente del tribunal

---

Izayana Sandoval Carvajal  
Postulante

*A mis padres*

## **AGRADECIMIENTOS**

A mi familia y a todos los me han impulsado a seguir adelante. En especial a mis padres Fressy Carvajal y Oscar Sandoval, por darme su apoyo incondicional a lo largo de todos mis años de estudio, no habría podido llegar hasta aquí sin ustedes.

Quiero agradecer a mi comité de tesis: a Mauricio por proponerme este tema, por toda su ayuda, compromiso y paciencia con mi proyecto de graduación, a Lisela por sus sugerencias y disposición de ayudarme siempre que lo necesité y a Federico por ayudarme con el análisis de resultados. Muchas gracias por haber sido parte de mi proyecto y por todos sus aportes, no pude haber elegido un mejor comité que ustedes.

A William Villalobos por ayudarme con el muestreo e identificación morfológica de los áfidos.

A Alfonso García Piñeres, a Paul Esker y Shirley Rojas por toda su colaboración y paciencia con mis dudas del análisis estadístico de los resultados.

Y muchas gracias a todo el personal del CIBCM, en especial a mis compañeros del laboratorio 7 por sus consejos, sugerencias y por brindarme su amistad durante estos años.

¡Muchas gracias!

## ÍNDICE GENERAL

1. INTRODUCCIÓN .....	1
2. ANTECEDENTES .....	2
3. JUSTIFICACIÓN .....	7
4. HIPÓTESIS Y PREDICCIONES.....	8
5. OBJETIVOS.....	9
5.1. Objetivos generales .....	9
Estandarizar y validar protocolos que permitan la identificación de bacterias endosimbiontes y la detección de variaciones en la metilación del ADN de áfidos con el fin de emplearlos como biosensores de cambios de temperatura.....	9
5.2. Objetivos específicos .....	9
6. MATERIALES Y MÉTODOS.....	10
6.1 Obtención de colonia de áfidos monoclonales.....	10
6.2 Bioensayos con temperatura variable .....	11
6.3 Extracción de ácido desoxirribonucleíco (ADN) genómico total.....	13
6.4 Detección de bacterias endosimbiontes de áfidos .....	13
6.4.1 Determinación de bacterias endosimbiontes presentes en diferentes especies de áfidos.....	13
6.4.2 Barcoding de especies de áfidos utilizando la región C de la Citocromo Oxidasa I.....	15
6.4.3 Barcoding de especies de bacterias endosimbiontes utilizando la región 16S del ARN ribosomal.....	16
6.4.4 Análisis filogenético con las regiones de la citocromo oxidasa I de áfidos y la región 16S del ARN ribosomal de bacterias endosimbiontes. ....	16
6.5 Preparación de láminas fijadas con las especies de áfidos estudiadas.....	17
6.6 Amplificación aleatoria de ADN polimórfico sensible a metilación (MS-RAPD) 17	
6.6.1 Estandarización de la técnica MS-RAPD.....	17

6.6.2 MS-RAPD para comparar el estado de metilación entre áfidos de diferentes estadios. ....	20
6.7 Análisis de los resultados.....	21
6.7.1 Análisis estadístico de resultados obtenidos en bioensayos. ....	21
6.7.2 Análisis de los resultados de MS-RAPD. ....	22
<b>7. RESULTADOS.....</b>	<b>23</b>
7.1 Bioensayos con temperatura variable .....	23
7.2 Detección de Endosimbiontes.....	28
7.3 Estandarización de Protocolo de MS-RAPD .....	42
7.4 Comparación del nivel de metilación y endosimbiontes de áfidos de diferentes estadios.....	45
7.5 Comparación del nivel de metilación y endosimbiontes de áfidos colectados en diferentes semanas.....	48
<b>8. DISCUSIÓN .....</b>	<b>51</b>
8.1 Bioensayos .....	51
8.2. Detección de Endosimbiontes.....	53
8.3. MS-RAPD .....	59
8.3.1 Estandarización de la técnica. ....	59
8.3.2 Comparación de estado de metilación global y endosimbiontes de áfidos.	61
<b>9. CONCLUSIONES .....</b>	<b>65</b>
<b>10. RECOMENDACIONES .....</b>	<b>67</b>
<b>11. LITERATURA CITADA .....</b>	<b>70</b>
<b>12. ANEXOS .....</b>	<b>82</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Mantenimiento de colonias monoclonales de áfidos de las especies <i>T. citricidus</i> y <i>M. luteum</i> dentro de los invernaderos del CIBCM. ....	10
<b>Figura 2.</b> Colonias monoclonales de <i>M. luteum</i> (A) y <i>T. citricidus</i> (B) respectivamente. ....	12
<b>Figura 3.</b> Preparación de cajas para tratamientos de bioensayos con temperatura variable. ....	12
<b>Figura 4.</b> Promedio de individuos vivos de la especie <i>T. citricidus</i> registrados durante cada día de bioensayo a tres temperaturas. ....	25
<b>Figura 5.</b> Mortalidad observada en cada réplica de los bioensayos de temperatura variable realizados con la especie <i>T. citricidus</i> . ....	25
<b>Figura 6.</b> Promedio de individuos vivos de la especie <i>M. luteum</i> registrados durante cada día de bioensayo a tres temperaturas. ....	27
<b>Figura 7.</b> Mortalidad observada en cada replica de los bioensayos realizados con temperatura variable utilizando la especie <i>M. luteum</i> . ....	27
<b>Figura 8.</b> Variación de la mortalidad observado en los tratamientos de temperatura (4°C y 28°C) de <i>M. luteum</i> y <i>T. citricidus</i> con respecto al grupo control control después de realizar la corrección de Abbott. ....	28
<b>Figura 9.</b> Electroforesis en gel de agarosa para visualizar los productos de la región 16S del ARN ribosomal de bacterias endosimbiontes amplificados mediante PCR multiplex en muestras de diferentes especies de áfidos ....	31
<b>Figura 10.</b> Árbol filogenético realizado con secuencias de ADN de la región citocromo oxidasa I mitocondrial (658 pb) obtenidas de las especies de áfidos a las que se les realizó la detección de endosimbiontes. ....	37
<b>Figura 11.</b> Filogenia realizada con secuencias de ADN de la región 16S del ARN ribosomal de bacterias endosimbiontes de diferentes especies. ....	39

<b>Figura 12.</b> Especímenes adultos de diferentes especies de áfidos preservados en láminas fijas para la identificación morfológica.....	41
<b>Figura 13.</b> Dos réplicas del análisis de MS-RAPD realizado con tres muestras de un individuo y tres muestras de 20 individuos de la especie <i>M. luteum</i> utilizando el iniciador OPA 08. ....	44
<b>Figura 14.</b> Dos réplicas del análisis de MS-RAPD realizado con tres muestras de un individuo y tres muestras de 20 individuos de la especie <i>T. citricidus</i> utilizando el iniciador OPA 01. ....	45
<b>Figura 15.</b> Total de individuos de <i>T. citricidus</i> de distintos estadios en los que se detectó la presencia de diferentes especies de bacterias endosimbiontes.. ....	47
<b>Figura 16.</b> Total de individuos de <i>M. luteum</i> de distintos estadios en los que se determinó la presencia de diferentes especies de bacterias endosimbiontes. ....	48
<b>Figura 17.</b> Total de individuos de <i>T. citricidus</i> (colectados en tres semanas distintas) en los que se determinó la presencia de diferentes especies de bacterias endosimbiontes. ....	50
<b>Figura 18.</b> Total de individuos de <i>M. luteum</i> (colectados en tres semanas distintas) en los que se determinó la presencia de diferentes especies de bacterias endosimbiontes. Cada color representa una especie de simbiote. ....	51



## ÍNDICE DE CUADROS

<b>Cuadro 1.</b> Iniciadores empleados para detectar bacterias endosimbiontes en áfidos .....	15
<b>Cuadro 2.</b> Total de iniciadores de la serie A probados con las especie <i>T. citricidus</i> y <i>M. luteum</i> .....	20
<b>Cuadro 3.</b> Probabilidad asociada a las comparaciones pareadas (Wilcoxon) realizadas entre los resultados de mortalidad obtenidos en cada uno de los tratamientos de temperatura realizados con la especie <i>T. citricidus</i> . .....	24
<b>Cuadro 4.</b> Probabilidad asociada a las comparaciones pareadas (Wilcoxon) realizadas con los resultados de mortalidad obtenidos en cada uno de los tratamientos de temperatura realizados con la especie <i>M. luteum</i> .....	26
<b>Cuadro 5.</b> Muestras de áfidos colectadas para la detección molecular de bacterias endosimbiontes .....	30
<b>Cuadro 6.</b> Especies de endosimbiontes detectados en las diferentes especies de áfidos analizadas.....	32
<b>Cuadro 7.</b> Bacterias endosimbiontes encontradas por especie de áfidos .....	33
<b>Cuadro 8.</b> Comparación de la identificación morfológica y de la identificación molecular de especies de áfidos utilizando la región de la Citocromo Oxidasa I. ....	34
<b>Cuadro 9.</b> Comparación de la identificación de bacterias endosimbiontes realizada mediante el PCR multiplex y la comprobación realizada por Megablast utilizando la región 16S del ARN ribosomal. ....	35
<b>Cuadro 10.</b> Iniciadores Operon de la serie A (OPA) probados y la cantidad total de bandas amplificadas con cada iniciador en las dos especies de áfidos utilizadas. ...	42
<b>Cuadro 11.</b> Estimación del estado de metilación global de individuos adultos de las especies de áfidos <i>M. luteum</i> y <i>T. citricidus</i> .....	43

<b>Cuadro 12.</b> Comparación de la metilación estimada entre estadios de las especies <i>Toxoptera citricidus</i> y <i>M. luteum</i> .....	46
<b>Cuadro 13.</b> Comparación del estado de metilación de individuos de <i>T. citricidus</i> y <i>M. luteum</i> colectados en tres diferentes fechas con diferentes condiciones climáticas.	49
<b>Cuadro 14.</b> Probabilidad asociada a las comparaciones pareadas (Wilcoxon) del estado de metilación de individuos de <i>T. citricidus</i> y <i>M. luteum</i> colectados en semanas diferentes. ....	49

## ÍNDICE DE ANEXOS

<b>Anexo 1.</b> Concentración de ADN de cada una de las muestras obtenidas a partir de 20 áfidos a las cuales se les realizó la detección de sus bacterias endosimbiontes.	82
<b>Anexo 2.</b> Especies de bacterias endosimbiontes detectadas en ADN genómico total extraído a partir de muestras de áfidos de 20 individuos. ....	83
<b>Anexo 3.</b> Bacterias endosimbiontes detectadas en muestras de diferentes especies de áfidos.....	84
<b>Anexo 4.</b> Electroforesis en gel de agarosa al 1% para visualizar los fragmentos amplificados con el OPA-07 utilizando muestras de ADN genómico total de 1 y 20 individuos de la especie <i>T. citricidus</i> .. ....	84
<b>Anexo 5.</b> Total de bandas obtenidas con MS-RAPDs en muestras de ADN de 1 y 20 individuos de las especies <i>T. citricidus</i> y <i>M. luteum</i> . ....	85
<b>Anexo 6.</b> Resumen de los principales resultados obtenidos al realizar comparaciones de metilación y endosimbiontes según el estadio y semana de colecta de áfidos de la especie <i>T. citricidus</i> .....	86
<b>Anexo 7.</b> Resumen de los principales resultados obtenidos al realizar comparaciones de metilación y endosimbiontes según el estadio y semana de colecta de áfidos de la especie <i>M. luteum</i> . ....	86

## ÍNDICE DE ABREVIATURAS

ADN	Ácido desoxirribonucleico
AFLP	Por sus siglas en inglés, “Amplified fragment length polymorphism”
AMOVA	Análisis molecular de varianza
ANOVA	Análisis de varianza
ARN	Ácido ribonucleico
BLAST	Por sus siglas en inglés, “Basic Local Alignment Search Tool”
CIBCM	Centro de Investigación en Biología Celular y Molecular
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
ITCR	Instituto Tecnológico de Costa Rica
MSAP	Por sus siglas en inglés, “Methylation-Sensitive Amplification Polymorphism”
MS-RAPD	Por sus siglas en inglés, “Methylation-Sensitive Random Amplified Polymorphic DNA”
PAXS	Simbionte del áfido del guisante tipo X
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
RAPD	Amplificación aleatoria de ADN polimórfico
TA	Temperatura ambiente
TAE	Tris - Acetato - EDTA
TRIS	Tris (hidroximetil) aminometano
UNA	Universidad Nacional de Costa Rica

## RESUMEN

Los áfidos (Aphididae), además de ser plagas de cultivos de importancia económica también tienen un gran potencial como biosensores. Estos insectos podrían ser empleados para medir el efecto de cambios en las condiciones ambientales a través del tiempo, debido a que responden a éstos con modificaciones epigenéticas, como cambios en los patrones de metilación de su ADN.

Se realizaron bioensayos con temperaturas de 4, 25 y 28°C empleando individuos de las especies *Toxoptera citricidus* y *Macrosiphum luteum* con el objetivo de determinar su supervivencia a condiciones ambientales variables. Se encontró que la especie *T. citricidus* presenta una mortalidad del 100 % con un incremento de 3°C en la temperatura ambiental, mientras que la especie *M. luteum* presenta una mortalidad del 60 % ante dicha variación, lo cual sugiere que tolera mejor los incrementos en la temperatura ambiental en comparación con *T. citricidus*. Además, se encontró que en ambas especies una temperatura cercana a los 4°C, tiende a disminuir la mortalidad.

Se realizó una detección de las bacterias endosimbiontes presentes en muestras de áfidos colectadas en diferentes regiones del país. Se analizaron un total de 51 muestras pertenecientes a 20 especies diferentes de áfidos. Cuarenta y un muestras (80,4 %) poseían simbiosis con la bacteria *Buchnera*, 14 con *Wolbachia* (27,4 %), nueve con *Serratia symbiotica* (17,6 %), cinco con *Rickettsia* (10,0 %), dos con *Hamiltonella defensa* (3,9 %) y dos con *Regiella insecticola* (3,9 %). De estas muestras mencionadas, un total de 21 especies (41,2 %) presentaron infecciones con varias especies de bacterias endosimbiontes. En ninguna de las muestras analizadas se encontró la presencia de las bacterias *Spiroplasma*, *Rickettsiella* o PAXS.

Se estudió el nivel de metilación del ADN en las especies *T. citricidus* y *M. luteum* empleando la técnica de MS-RAPD. Se comparó el nivel de metilación entre individuos de una misma especie pertenecientes a un mismo estadio, también se realizaron comparaciones entre individuos pertenecientes a diferentes estadios y

comparaciones entre organismos colectados en diferentes fechas. No se encontraron diferencias en el nivel de metilación entre individuos del mismo estadio, ni tampoco entre individuos de estadios diferentes colectados en el mismo momento, sin embargo, sí se encontraron diferencias entre individuos colectados en diferente fecha.

**Palabras clave:** áfidos, bacterias endosimbiontes, *Buchnera*, *Hamiltonella defensa*, *Macrosiphum luteum*, modificaciones epigenéticas, mortalidad, MS-RAPD, patrones de metilación de ADN, PAXS, *Regiella insecticola*, *Rickettsia*, *Rickettsiella*, *Serratia symbiotica*, *Spiroplasma*, *Toxoptera citricidus*, *Wolbachia*

# 1. INTRODUCCIÓN

Los áfidos o pulgones (Aphididae: Hemiptera) son insectos de cuerpo suave, chupadores del floema de gran variedad de plantas, que se caracterizan por poseer dos sifúnculos en el extremo posterior de su cuerpo (Voegtlin *et al.*, 2003). Los sifúnculos son su principal característica diagnóstica y permiten excretar la savia que se absorbió pero no fue aprovechada (Kennedy & Mittler, 1953; Miller & Footitt, 2009). Estos insectos tienen la capacidad de reproducirse tanto sexual como asexualmente (Gaoa *et al.*, 2014). En zonas templadas presentan ambos tipos de reproducción, mientras que en zonas tropicales normalmente sólo se reproducen por la vía asexual mediante partenogénesis, originando individuos clonales en un tiempo muy corto (Gaoa *et al.*, 2014). Por lo tanto, el tamaño de sus poblaciones incrementa rápidamente (Hales *et al.*, 1997; Gaoa *et al.*, 2014).

Al igual que otros insectos, los áfidos son muy sensibles a cambios en la temperatura y otras variables climáticas (Kindlmann *et al.* 2010). Estas variaciones en las condiciones ambientales, afectan tanto el desarrollo como la reproducción de los áfidos (Hasan *et al.* 2009; Kindlmann *et al.* 2010). Debido a su sensibilidad ante variaciones de temperatura, los áfidos son considerados excelentes biosensores que permiten medir los cambios ocurridos en las condiciones ambientales del ecosistema (Hodkinson & Bird, 1998).

Los áfidos, como cualquier otro ser vivo, pueden responder mediante una serie de modificaciones epigenéticas al estrés ocasionado por cambios en las condiciones de su entorno (Srinivasan & Brisson, 2012). En estos organismos la principal modificación epigenética es la metilación de ADN, ya que se ha visto que su genoma se encuentra altamente metilado (Srinivasan & Brisson, 2012; Flores *et al.*, 2013). La metilación de “novo” del ADN permite que ocurra variabilidad entre individuos genéticamente idénticos (Hunt *et al.*, 2010). Ésta juega un papel muy importante en la regulación de la expresión de genes en gran variedad de animales (Moczek & Snell-Rood, 2008; Hunt *et al.*, 2010). Se cree que además de cumplir un rol en la respuesta a factores ambientales, también interviene en el desarrollo y

comportamiento de los áfidos (Dombrovsky *et al.*, 2009; Hunt *et al.*, 2010; Flores *et al.*, 2013).

Otra estrategia que emplean los áfidos para adaptarse al ambiente es la asociación con simbioses bacterianas (Łukasik *et al.*, 2013). Esta asociación ocurre dentro de los tejidos de los áfidos, en donde algunos endosimbiontes se alojan dentro de células especializadas del abdomen llamadas bacteriocitos (Łukasik *et al.*, 2013). Estos endosimbiontes le proporcionan a su hospedero nutrientes esenciales que no son capaces de obtener mediante su dieta, le ayudan a tolerar mejor el estrés causado por patógenos, parasitoides, o por cambios bruscos en las condiciones ambientales (Scarborough *et al.*, 2005; Burke *et al.* 2010; Tsuchida *et al.*, 2010; Wernegreen, 2012; Łukasik *et al.*, 2013). Pueden cohabitar varias especies de endosimbiontes en un mismo hospedero (Łukasik *et al.*, 2013).

Debido a que existen evidencias suficientes de que los factores climáticos influyen en el estado de metilación de los áfidos y en las especies de bacterias endosimbiontes que éstos poseen, se evaluó la mortalidad de los áfidos a diferentes temperaturas, se evaluó un protocolo para detectar la presencia de algunas de las principales especies de bacterias endosimbiontes de áfidos y se estandarizó un protocolo de MS-RAPD que permite estimar la metilación global del ADN. Esto con el fin de emplear estas técnicas como herramientas para caracterizar la respuesta biológica de los áfidos ante cambios de temperatura ambiental.

## **2. ANTECEDENTES**

Los áfidos son insectos de gran importancia agrícola (Eastop, 1977). Debido a que éstos representan una de las plagas vectoras de virus más comunes, ya que se alimentan de la savia de gran variedad de plantas de importancia económica (Eastop, 1977; Miller & Footitt, 2009). Más de 250 especies de áfidos se alimentan de cultivos agrícolas u hortícolas y pese a que esta cifra solo representa el 5% de las especies del mundo, son las causantes de grandes pérdidas económicas a nivel mundial (Miller & Footitt, 2009). Al parasitar las plantas también ocasionan diversas



afecciones como deformaciones, decaimiento y abolladuras en hojas y flores (Miller & Footitt, 2009). Además, debido a la melaza que excretan los áfidos, hacen que se desarrollen hongos en las hojas, los cuales ocasionan una disminución de la tasa fotosintética y retrasan el desarrollo de la planta y sus frutos (Miller & Footitt, 2009).

Se predice que con el paulatino incremento de la temperatura ambiental producto del cambio climático, las plagas de áfidos se verían favorecidas por las nuevas condiciones ambientales (Cannon, 1998; Newton, 2007). En donde las especies nativas cambiarán su distribución geográfica (Hódar *et al.*, 2012). Éstas empezarán a desplazarse hacia zonas en donde antes no se les encontraba, convirtiéndose en especies invasoras (Hódar *et al.*, 2012). Estos cambios en las condiciones ambientales conformarán un escenario favorable para que muchas plagas se incrementen causando desbalances ecológicos en las zonas colonizadas (Hellmann *et al.*, 2008; Hódar *et al.*, 2012).

De los factores ambientales que pueden influir en las poblaciones de áfidos, la temperatura es la más importante (Hasan *et al.*, 2009; Nguyen *et al.*, 2009). Se ha visto que conforme disminuye la temperatura, se reduce la fecundidad de los áfidos y su desarrollo se hace más lento, lo cual hace que sus poblaciones disminuyan (Dixon, 1985; Hasan *et al.*, 2009).

Una de las estrategias que emplean los áfidos para adaptarse a cambios en las condiciones ambientales es la metilación del ADN (Srinivasan & Brisson, 2011). La cual consiste en adicionar un grupo metilo ( $-CH_3$ ) al carbono en posición cinco de las citosinas, usando S-adenosil metionina como donador, para formar 5-metilcitosina y generalmente ocurre en los dinucleótidos CpG (Glastad *et al.*, 2011; Srinivasan & Brisson, 2012). Estas citosinas metiladas son más propensas a sufrir mutación debido a la desaminación espontánea. Además, la metilación de ADN, llevada a cabo por las ADN metiltransferasas (Dnmts) (Srinivasan & Brisson, 2012), incrementa la probabilidad de que surjan mutaciones en las que se sustituyan estas citosinas por timinas (Hunt *et al.*, 2010; Flores *et al.*, 2013).

Para determinar y analizar las variaciones en la metilación de ADN se han desarrollado técnicas basadas en tres principios que son: a) digestión con enzimas sensibles a metilación, b) conversión con bisulfito de sodio y c) enriquecimiento por afinidad (Singh, 2013). Algunos métodos para detectar metilación en los organismos son la secuenciación con bisulfito, inmunoprecipitación de ADN metilado, ensayo de recuperación de las islas CpG metiladas (MIRA) y PCR de ADN polimórfico sensible a metilación (MS-RAPD), entre otros (Singh, 2013).

La técnica para medir metilación relativa de MS-RAPD se basa en la utilización de las enzimas de restricción *Msp* I y *Hpa* II; las cuales son isosquisómeros que reconocen la secuencia 5'-CCGG-3' y varían en su sensibilidad a la metilación en este sitio de restricción (Zilberman & Henikoff, 2007; Salmon *et al.*, 2008). *Hpa* II es sensible a metilación y es inhibida por la presencia de grupos metilo en cualquiera de las citosinas del sitio; mientras que *Msp* I, es insensible a metilación, solamente es bloqueada por la metilación de las citosinas externas (Zilberman & Henikoff, 2007). Después de la digestión con estas enzimas, se realiza una amplificación aleatoria de los fragmentos de restricción mediante RAPD y de esta forma según los patrones de bandas generados, se puede estimar indirectamente el estado de metilación global de la muestra de interés.

Entre las ventajas de este método están que posee un costo muy bajo, solamente requiere de instrumentación básica de laboratorio, requiere poca cantidad de ADN, detecta variaciones en la metilación global del ADN con una alta sensibilidad y tiene muchas aplicaciones tanto en plantas como en animales (Singh, 2013). Pese a que el uso de esta técnica se ha utilizado con menos frecuencia que otras técnicas similares, por ejemplo MS-AFLPs, se ha utilizado para estudiar el nivel de metilación global en diferentes organismos, principalmente plantas. Actualmente se está utilizando para medir variaciones de metilación en respuesta al estrés ocasionado por altas temperaturas ambientales en árboles de *Quercus* (Correia *et al.*, 2013), o por sequías en *Eucalyptus globulus* (Correia *et al.*, 2016); en respuesta al estrés ocasionado por metales pesados en plantas de maíz (Erturk *et al.*, 2015) o por radiación ultravioleta en *Pinus radiata* (Annacondia, 2015), entre otros.

Además de emplear la metilación del ADN para adaptarse a diferentes tipos de estrés ambiental, los áfidos también establecen simbiosis con bacterias que juegan un papel muy importante en su tolerancia y respuesta al estrés (Burke *et al.* 2010; Wernegreen, 2012). Existen dos categorías de asociación, los endosimbiontes primarios u obligatorios y los secundarios o facultativos (Nyholm & Graf, 2012). Los primarios son aquellos indispensables para la supervivencia y reproducción de su hospedero y a su vez no pueden sobrevivir fuera de éste, debido a que su genoma se ha reducido y se han perdido genes indispensables para vivir independientemente (Koga *et al.*, 2003). Un ejemplo de endosimbionte primario es *Buchnera aphidicola*, la cual está presente en la mayoría de especies de áfidos (Nyholm & Graf, 2012). Por el contrario, los simbiosis facultativos o secundarios no son indispensables para su hospedero y se pueden perder o adquirir en el transcurso de su ciclo de vida, entre los que se encuentran las especies *Serratia symbiotica*, *Hamiltonella defensa* y *Regiella insecticola* (Montllor *et al.* 2002; Koga *et al.*, 2003).

Las asociaciones simbióticas entre insectos y bacterias constituyen importantes modelos ecológicos que permiten estudiar la respuesta a fluctuaciones ambientales (Wernegreen, 2012). *S. symbiotica* y *H. defensa* protegen a los áfidos hospederos contra el estrés térmico permitiéndoles colonizar hábitats más cálidos (Burke *et al.* 2010; Wernegreen, 2012). Por ejemplo, se ha visto que la especie *Serratia symbiotica* ayudan a mitigar los efectos negativos en la fecundidad de los áfidos ocasionados por las altas temperaturas ambientales, ya que protegen a los bacteriocitos que son las células especializadas en donde se aloja la bacteria *Buchnera* que es indispensable para el áfido (Montllor *et al.*, 2002; Burke *et al.*, 2010).

Se ha observado que la interacción entre los simbiosis bacterianos y los áfidos es vulnerable a cambios bruscos en las condiciones ambientales (Wernegreen, 2012). Y como consecuencia, después de un choque de calor, la cantidad de bacterias endosimbiontes puede cambiar. Así, la tolerancia térmica del endosimbionte bacteriano limita la tolerancia térmica de su hospedero (Burke *et al.*, 2010; Wernegreen, 2012). Existe evidencia de que muchos de los endosimbiontes

primarios son termosensibles, por lo que sus poblaciones disminuyen al aumentar la temperatura ambiental, lo cual permite que nuevos endosimbiontes secundarios colonicen al hospedero, y éstos van a proteger tanto al endosimbionte primario como al áfido del estrés ocasionado por calor (Burke *et al.* 2010; Wernegreen, 2012).

En Costa Rica se han reportado 87 especies de áfidos, por lo que a nivel de Centroamérica y el Caribe, es el país con el mayor número de especies de áfidos identificadas, ya que posee un 74,6% del total de las especies descritas de esta región (114). Sin embargo, aún no existe información sobre las bacterias endosimbiontes relacionadas con dichas especies de áfidos, ya que hasta el momento solamente se han estudiado sus parasitoides (Zamora, 2009; Villalobos Muller *et al.*, 2010).

En este estudio se emplearán las especies de áfidos *Toxoptera citricidus* y *Macrosiphum luteum*. Ambas especies son comunes en Costa Rica. *T. citricidus* ocurre en plantaciones comerciales de cítricos así como en árboles de traspatio y es vector del virus de la tristeza de los cítricos (CTV) en el país (Lojek & Orlob, 1969; Voegtlin & Villalobos-Müller, 1992). La especie *T. citricidus* está ampliamente distribuida a nivel mundial, con una temperatura óptima de desarrollo cercana a los 21,5 °C, pertenece al 3 % de las especies que se reproducen exclusivamente por partenogénesis y su ciclo de vida tiene una duración entre 6 y 8 días (Komazaki, 1982; Ogawa & Miura, 2014). Por otra parte, *M. luteum* ha sido poco estudiada y aún se desconocen muchos aspectos de su biología y la temperatura óptima a la cual se desarrolla. Se ha visto como plaga estacional en orquídeas en el valle central del país (comunicación personal Mauricio Montero-Astúa y William Villalobos) y se ha reportado en Europa, Hawaii, Australia, India y diversos países de América (Nagrare, 2006).

### 3. JUSTIFICACIÓN

Los áfidos son insectos de gran importancia biológica debido a que son organismos cosmopolitas, portan endosimbiontes, poseen una gran sensibilidad a variaciones en las condiciones climáticas y además presentan regulación epigenética frente a estos cambios (Walsh *et al.* 2010; Amat-García *et al.*, 2011). Debido a esto se busca estandarizar en áfidos un protocolo de MS-RAPD, para medir los cambios de metilación global que surgen como producto de variaciones de temperatura. Este protocolo sería una herramienta útil para diversos estudios ecológicos donde se utilizan a los áfidos como biosensores de cambios en las condiciones climáticas. Así mismo, sería una herramienta adicional para comprender la respuesta de las poblaciones de áfidos a la temperatura y su dinámica dentro de los sistemas productivos. En el campo de la protección de cultivos y epidemiología de enfermedades de plantas es de interés entender cómo afectan los factores ambientales, como la temperatura, en la dinámica poblacional de insectos. Además de utilizar este conocimiento para el desarrollo de modelos de predicción de riesgo como una herramienta de manejo de las plagas de áfidos en cultivos de importancia económica.

Además, es importante conocer las diferentes especies de bacterias endosimbiontes presentes en las poblaciones de áfidos de Costa Rica. La presencia de estas bacterias también es un factor que contribuye a determinar el efecto de la temperatura sobre las poblaciones de áfidos y su respuesta a la misma. Se propone que la manipulación de endosimbiontes como *Wolbachia* en áfidos se puede usar como una estrategia novedosa de manejo de plagas agrícolas. Este tipo de estudio en áfidos es pionero en el país y por tanto, surge la necesidad de estandarizar los protocolos para hacer las primeras identificaciones de endosimbiontes en las poblaciones de áfidos de Costa Rica.

La idea de este proyecto surgió debido a que actualmente en Reino Unido se realizan muestreos de áfidos utilizando trampas de insectos. Cada cierto tiempo éstas succionan muestras de insectos presentes en el aire, con el fin de monitorear a través del tiempo la composición de las poblaciones de áfidos en respuesta al

cambio climático (Bell *et al.*, 2015). Esa investigación representa un ejemplo de como los áfidos pueden ser empleados como biosensores, ya que si se logra determinar cómo se comporta la metilación de estos individuos frente a variaciones en las condiciones ambientales, éstos permitirían realizar inferencias sobre las condiciones climáticas aún cuando no se tengan registros de éstas.

La investigación propuesta para esta tesis buscó llevar un paso adelante ese tipo de estudios, de manera que no solamente se contemple la presencia y número de individuos de diferentes especies de áfidos. Sino, que también incluya variables a nivel molecular, empleando también la técnica de MS-RAPD (por sus siglas en inglés, “Methylation-Sensitive Random Amplified Polymorphic DNA”) que actualmente se realiza en árboles con el objetivo de medir las variaciones de metilación de ADN que ocurren en éstos como respuesta al cambio climático (Bräutigam *et al.*, 2013; Rico *et al.*, 2014). Estas dos ideas sirvieron como fundamento para la iniciativa de estandarizar herramientas moleculares en áfidos, con el fin de poder utilizarlos como biosensores de cambio climático en un futuro cercano.

## 4. HIPÓTESIS Y PREDICCIONES

### **-Bioensayos de temperatura:**

Someter a los áfidos a temperaturas de 4 y 28°C afectará la supervivencia de éstos en comparación con individuos expuestos a la temperatura ambiental del laboratorio (control, *ca.* 25°C). La temperatura ambiental es uno de los principales factores que influye en los organismos ectotermos como los insectos (Kindlmann *et al.*, 2010). Se espera que una temperatura más alta que la ambiental favorezca la sobrevivencia de los áfidos, debido a que se ha observado que disminuciones de temperatura disminuyen el tamaño de las poblaciones de áfidos (Hasan *et al.*, 2009).

### **-Detección de endosimbiontes:**

Se espera detectar al menos una especie de endosimbionte en las especies de áfidos *T. citricidus* y *M. luteum*, así como en las diferentes especies de áfidos que se

colecten en el campo, debido a que la mayoría de áfidos poseen al simbiote obligatorio *Buchnera aphidicola* (Li *et al.* 2011). Además, se ha detectado en otros países la presencia de la bacteria endosimbionte *Wolbachia* en muchas especies de áfidos, entre ellas la especie *T. citricidus* (Wang *et al.*, 2009).

#### **-Nivel de metilación:**

La metilación del ADN será afectada por variaciones en las condiciones ambientales como la temperatura (Flores *et al.*, 2013). Se espera que áfidos que estuvieron sometidos a condiciones de temperatura distintas, posean diferencias en la tasa de metilación global. Se esperaría que temperaturas más altas originen un menor nivel de metilación producto de la desmetilación (activación) de los genes que codifican las proteínas de choque térmico y otros genes involucrados en la respuesta al estrés ocasionado por el incremento en la temperatura (Felicciello *et al.* 2013).

## **5. OBJETIVOS**

### **5.1. Objetivo general**

Estandarizar y validar protocolos que permitan la identificación de bacterias endosimbiontes y la detección de variaciones en la metilación del ADN de áfidos con el fin de emplearlos como biosensores de cambios de temperatura.

### **5.2. Objetivos específicos**

- i. Determinar el efecto en poblaciones monoclonales de las especies de áfidos *T. citricidus* y *M. luteum* de la exposición a temperaturas alta (28°C) y baja (4°C) por periodos de una semana.
- ii. Estandarizar un protocolo de PCR que permita detectar la presencia de distintas especies de bacterias endosimbiontes en diferentes especies de áfidos de Costa Rica.

iii. Evaluar un protocolo de amplificación aleatoria de ADN polimórfico sensible a metilación (MS-RAPD) para la detección de cambios en la metilación relativa global de áfidos sometidos a diferentes condiciones de temperatura.

## 6. MATERIALES Y MÉTODOS

### 6.1 Obtención de colonia de áfidos monoclonales

Se obtuvieron colonias monoclonales de áfidos de las especies *T. citricidus* y *M. luteum*, sobre plantas de *Citrus* sp. y *Epidendrum* sp., respectivamente. Para esto, se desarrolló una colonia entera a partir de un solo individuo por especie. De esta forma, se aseguró que todos los individuos utilizados en el estudio fueran genéticamente idénticos entre sí, debido a que se originaron mediante partenogénesis (clones de su progenitor). Las colonias fueron mantenidas en sus respectivas plantas hospederas dentro de cajas cubiertas con malla antiáfidos dentro del invernadero del CIBCM (Fig. 1).



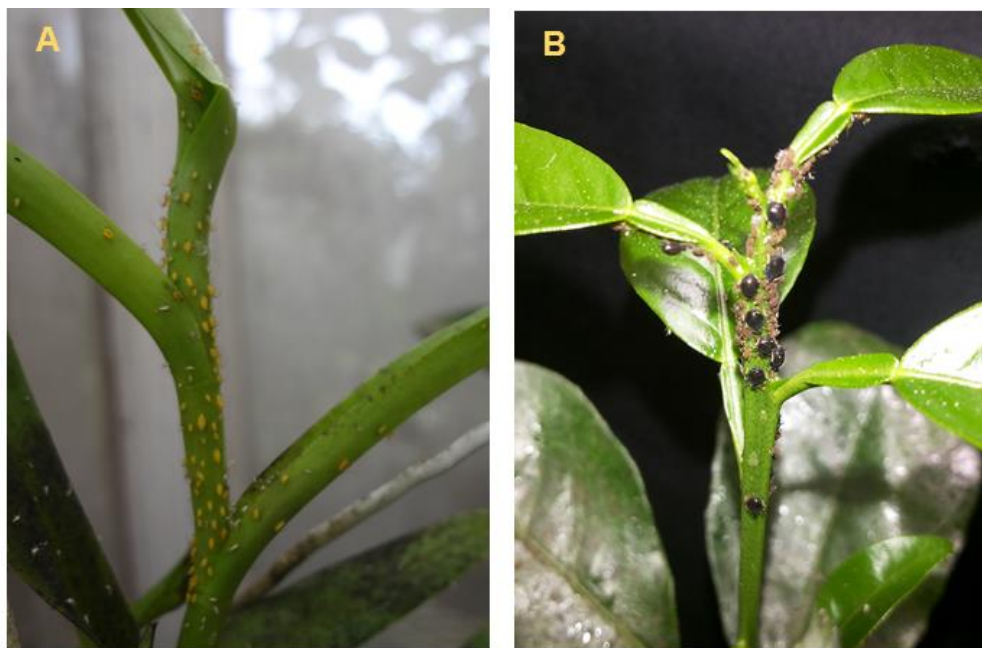
**Figura 1.** Mantenimiento de colonias monoclonales de áfidos de las especies *T. citricidus* y *M. luteum* dentro de los invernaderos del CIBCM.



## 6.2 Bioensayos con temperatura variable

Se emplearon áfidos de las colonias monoclonales establecidas de las especies *T. citricidus* y *M. luteum* (Fig. 2), los cuales fueron sometidos a cuatro bioensayos con tratamientos de temperatura ambiente (grupo control), 4°C y 28°C en condiciones de laboratorio. Se utilizó un grupo de diez áfidos como unidad experimental por cada réplica y un total de tres réplicas por tratamiento. En resumen, para cada réplica del ensayo, se prepararon nueve cajas, en cada una de éstas se colocaron un total de diez ninfas y posteriormente tres cajas se colocaron en la incubadora a 28°C, tres cajas en el cuarto frío del CIBCM a 4°C y las tres restantes se mantuvieron a temperatura ambiente en el laboratorio 5 del CIBCM (Fig. 3).

Se emplearon cajas plásticas de aproximadamente 15 x 15 cm, en donde se colocó un papel filtro húmedo con agua destilada y sobre éste una hoja de la planta hospedera (*Epidendrum* sp. para *M. luteum* y *Citrus* sp. para *T. citricidus*) con su pecíolo envuelto en algodón humedecido, con el propósito de mantener humedad en la caja plástica y evitar la deshidratación de la hoja durante el transcurso del ensayo.



**Figura 2.** Colonias monoclonales de *M. luteum* (A) y *T. citricidus* (B) respectivamente.



**Figura 3.** Preparación de cajas para tratamientos de bioensayos con temperatura variable.

Para cada uno de los tratamientos se utilizó un datalogger RHT10 (EXTECH INSTRUMENTS, Estados Unidos) con el fin de registrar los valores de humedad relativa y temperatura en el transcurso del experimento. Cada datalogger se colocó dentro de una caja plástica bajo las mismas condiciones de las cajas del tratamiento correspondiente. Los dataloggers se programaron para el registro de temperatura y humedad relativa cada 3 horas: 12:00, 3:00, 6:00, 9:00 am, 12:00 md, 3:00, 6:00 y 9:00 pm.

Cada réplica del bioensayo se llevó a cabo durante un periodo de cinco días, en donde diariamente se contó la cantidad de individuos muertos, vivos, ninfas, adultos ápteros y adultos alados. Al final del ensayo los áfidos sobrevivientes se colectaron en tubos de 1,5 mL con etanol al 95% (vol/vol) y se almacenaron a -35°C.

### **6.3 Extracción de ácido desoxirribonucleíco (ADN) genómico total**

Se realizaron extracciones de ADN a partir de diferentes muestras de áfidos utilizando el kit comercial de extracción de ADN NucleoSpin (MACHEREY-NAGEL, Alemania) y siguiendo las recomendaciones del fabricante excepto la elución de una sola vez con 100  $\mu$ L. Con el propósito de recuperar la mayor cantidad de ADN posible de la columna de extracción esta etapa se realizó en dos pasos sucesivos, utilizando 50  $\mu$ L del amortiguador (“buffer”) de elución en cada ocasión.

Una vez extraído el ADN, se cuantificó la concentración (ng/ $\mu$ l) y pureza (A260/A280 y 260/230) de cada muestra en un espectrofotómetro NanoDrop 2000c (ThermoScientific, Estados Unidos), utilizando como blanco el “buffer” de elución del mismo kit de extracción. Los ADN obtenidos fueron empleadas para diferentes análisis moleculares como detección de bacterias endosimbiontes mediante PCR Multiplex y MS-RAPD.

### **6.4 Detección de bacterias endosimbiontes de áfidos**

#### **6.4.1 Determinación de bacterias endosimbiontes presentes en diferentes especies de áfidos.**

Se colectaron muestras de áfidos de 21 especies diferentes, en distintas regiones de Costa Rica (Anexo 1). De cada especie, se analizaron de 2 a 4 muestras de 20 individuos cada una. Primero se realizó la identificación taxonómica morfológica (a cargo de William Villalobos Muller del Centro de Investigación en Biología Celular y Molecular) y posteriormente, fue corroborada molecularmente, mediante “barcoding” empleando la región C de la citocromo oxidasa I (COI) y la herramienta BLAST.

Para cada muestra de ADN se realizaron dos reacciones de PCR Multiplex según el protocolo de Peccoud *et al.*, 2014, con el objetivo de amplificar la región 16S del ARN ribosomal de diferentes especies de bacterias endosimbiontes a partir

del ADN genómico total extraído de las muestras de áfidos colectadas. Con este protocolo se utiliza un iniciador “forward” universal (16SA1) y diferentes iniciadores “reverse” que son específicos para diferentes bacterias y dependiendo del tamaño del amplicón que generan, permite detectar las especies de bacterias: *Spiroplasma* sp., *Regiella insecticola*, *Hamiltonella defensa*, *Rickettsiella* sp., *Buchnera* sp., *Serratia symbiotica*, *Rickettsia* sp. y el simbiote del áfido del guisante tipo X (PAXS), según el tamaño de los fragmentos amplificados (Peccoud *et al.*, 2014) (Cuadro 1).

Cada reacción de PCR multiplex consistió de 1,8 µL de agua libre de nucleasas, 5 µL de Dream Taq PCR Master Mix (2 X) (Thermo Scientific, Lituania), 0,2 µL de cada iniciador a una concentración de 10 µM (excepto el iniciador PAUS16SR en la PCR multiplex 1 que se emplearon 0,1 µL) y 2 µL de ADN, para un volumen final de reacción de 10 µL. El perfil térmico utilizado para esta reacción fue 94 °C por cinco minutos, 30 ciclos de 94 °C por 30 s, 58 °C por 30 s y 72 °C por un minuto, con un ciclo de extensión final a 72°C por 5 min (Peccoud *et al.*, 2014).

Se realizó también una PCR convencional para amplificar la región 16S del ARNr del endosimbionte *Wolbachia* sp. empleando los iniciadores W-Specf y W-Specr (Werren & Windsor, 2000). Adicionalmente, para amplificar esa región de la bacteria *Buchnera* sp. se emplearon los iniciadores Buch16S1F y Buch16S1R (Tsuchida *et al.* 2002). Para ambas reacciones, se emplearon 5,5 µL de agua libre de nucleasas, 12,5 µL de Dream Taq PCR Master Mix (2 X), 1 µL de cada iniciador a 10 µM y 5 µL de ADN. El perfil térmico empleado para la amplificación de la región 16S de *Wolbachia* sp. fué: 2 min a 95°C, dos ciclos de: 2 min a 95° C, 1 min a 60° C y 1 min a 72° C, seguido de 35 ciclos de: 30 s a 95° C, 1 min a 60° C y 45 s a 72° C y un ciclo de extensión final de 5 min a 72°C (Werren & Windsor, 2000). Para *Buchnera* sp. el perfil térmico empleado fue de 10 min a 95° C seguido de 35 ciclos de: 30 s a 95° C, 30 s a 55 °C y 1 min a 72 °C y finalmente una extensión final de 10 min a 72 °C (Tsuchida *et al.* 2002). Todas las reacciones descritas anteriormente fueron realizadas en un termociclador MJ Mini (BioRad, Estados Unidos).

Los fragmentos amplificados mediante las diferentes reacciones de PCR fueron visualizados mediante electroforesis en gel de agarosa al 1,5 % y teñidos en una

disolución de GelRed® al 0,0003% y finalmente se visualizaron en un transiluminador de luz ultravioleta.

**Cuadro 1.** Iniciadores empleados para detectar bacterias endosimbiontes en áfidos

Iniciador	Secuencia (5'–3')	Especificidad	Tamaño del amplicón (pb)
16SA1 <sup>1,2</sup>	AGAGTTTGATCMTGGCTCAG	General	-
Spi1500R <sup>1</sup>	ATCATCAACCCTGCCTTTGG	<i>Spiroplasma</i> sp.	1500
PAUS16SR <sup>1</sup>	TCGGACGCCATAACACTAGG	<i>Regiella insecticola</i>	840
PABS480R <sup>1</sup>	GGTATTCGCATTTATCGCTTC	<i>Hamiltonella defensa</i>	480
P136Ric-470R <sup>1</sup>	TGGGTACCGTCACAGTAATCGA	<i>Rickettsiella</i> sp.	300
P136F <sup>1</sup>	GGGCCTTGCCTCTAGGT		
PAXS F <sup>2</sup>	AGTTTGATCATGGCTCAGATTG	PAXS	500
PAXS R <sup>2</sup>	GCAACACTCTTTGCATTGCT		
Buch270R <sup>2</sup>	TGCCTTGGTAGGCTATTACTC	<i>Buchnera</i> sp.	270
PASS1140R <sup>2</sup>	TTTGAGTTCCCGACTTTATCG	<i>Serratia symbiotica</i>	1140
Ric600R <sup>2</sup>	TTTGAAAGCAATTCCGAGGT	<i>Rickettsia</i> sp.	600
Buch16S1F <sup>3</sup>	GAGCTTGCTCTCTTTGTCGGCAA	<i>Buchnera</i> sp.	432
Buch16S1R <sup>3</sup>	CTTCTGCGGGTAACGTCACGAA		
W-Specf <sup>4</sup>	CATACCTATTCGAAGGGATAG	<i>Wolbachia</i> sp.	438
W-Specr <sup>4</sup>	AGCTTCGAGTGAAACCAATTC		

<sup>1</sup> Iniciadores de la PCR Multiplex 1 (Peccoud *et al.*, 2014)

<sup>2</sup> Iniciadores de la PCR Multiplex 2 (Peccoud *et al.*, 2014)

<sup>3</sup> Iniciadores específicos para detectar Buchnera (Tsuchida *et al.* 2002)

<sup>4</sup> Iniciadores específicos para detectar Wolbachia (Werren & Windsor, 2000).

#### 6.4.2 Barcoding de especies de áfidos utilizando la región C de la Citocromo Oxidasa I.

Para corroborar la identificación morfológica de cada una de las especies de áfidos a las que se les realizó la detección de endosimbiontes, se amplificó la región c de la Citocromo oxidasa I. Cada una de las reacciones de PCR se llevó a cabo en tubos de 0.2 mL en un volumen final de reacción de 25 µL. Cada mezcla consistió de 0,4 µL de cada uno de los iniciadores con una concentración inicial de 10 µM (“forward” y “reverse”), 12,5 µL de la solución de Dream Taq PCR Master Mix (2 X), 5 µL de ADN y 6,7 µL de agua libre de nucleasas. Se emplearon los iniciadores LCO1490 y HCO2198 descritos por Vrijenhoek (1994). En las mezclas de los controles negativos se sustituyó el volumen del ADN con agua libre de nucleasas. Cada una de estas reacciones se realizó en un termociclador PTC-200 (MJ Research, Canadá).

Posteriormente, se secuenciaron los productos de PCR obtenidos mediante el servicio de secuenciación de Macrogen, Korea. Las secuencias de la región de interés fueron editadas en el programa BioEdit (versión 7.0; Hall 2004) y comparadas con secuencias disponibles en el GenBank utilizando la herramienta BLAST del Centro Nacional para la Información en Biotecnología (NCBI, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

#### **6.4.3 Barcoding de especies de bacterias endosimbiontes utilizando la región 16S del ARN ribosomal.**

Se realizó una comprobación de las especies de bacterias endosimbiontes que se detectaron con el PCR Multiplex. Para esto se utilizaron algunas de las muestras de ADN que resultaron positivas para una determinada especie de bacteria y se realizó un PCR empleando solamente el imprimador general del PCR Multiplex (16SA1) junto con el imprimador específico para dicha especie de endosimbionte por reacción.

Se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1,5 % en TAE para visualizar los fragmentos amplificados. Posteriormente, aquellos productos de PCR que amplificaron correctamente se enviaron a secuenciar mediante el servicio de secuenciación de Macrogen, Korea. Las secuencias obtenidas fueron editadas utilizando el programa BioEdit (versión 7.0; Hall 2004) y posteriormente se utilizó la herramienta BLAST para compararlas con secuencias disponibles en la base de datos del GeneBank.

#### **6.4.4 Análisis filogenético con las regiones de la citocromo oxidasa I de áfidos y la región 16S del ARN ribosomal de bacterias endosimbiontes.**

Se realizaron dos filogenias, una de ellas empleando las secuencias de ADN obtenidas al amplificar la región de la citocromo oxidasa I de diferentes especies de áfidos y la otra se realizó empleando secuencias de la región 16S del ARN ribosomal

de bacterias endosimbiontes de áfidos. Se utilizó el método estadístico de máxima similitud y el modelo de Neighbor-joining con 1000 de iteraciones de “Bootstrap” en ambos casos, debido a que fué el modelo que más se ajustaba a los datos. Para esto se empleó el programa MEGA 6 (Tamura *et al.*, 2013). Se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1,5 % en TAE para visualizar los fragmentos amplificados. Posteriormente, los productos de PCR que amplificaron de acuerdo al tamaño de banda esperado se enviaron a secuenciar directamente empleando los servicios de Macrogen (Korea). Las secuencias obtenidas fueron editadas utilizando el programa BioEdit (versión 7.0; Hall 2004) y posteriormente se utilizó la herramienta BLAST para compararlas con secuencias disponibles en la base de datos del GenBank.

## **6.5 Preparación de láminas fijas con las especies de áfidos estudiadas**

Utilizando individuos preservados en etanol al 70 % (vol/vol) pertenecientes a las 20 especies de áfidos a las cuales se les realizó la detección de endosimbiontes, se procesaron para preparar láminas fijas que se visualizaron por microscopía de luz para reconocer las características morfológicas de cada especie. En total se elaboraron 69 láminas fijas de individuos adultos ápteros y alados de las diferentes especies de áfidos, las cuales se realizaron según el protocolo de clarificación y montaje de Voegtlin *et al.* (2003).

## **6.6 Amplificación aleatoria de ADN polimórfico sensible a metilación (MS-RAPD)**

### **6.6.1 Estandarización de la técnica MS-RAPD.**

Para determinar los cambios epigenéticos ocurridos en el ADN de los áfidos se utilizó MS-RAPD, la cual es una modificación de la técnica de amplificación aleatoria de ADN polimórfico, RAPD (por sus siglas en inglés), que permite estimar indirectamente el nivel de metilación global del ADN. Sin embargo, esta técnica no

había sido utilizada previamente en áfidos, por lo tanto inicialmente se realizó una estandarización del método.

Se probó un total de 20 iniciadores de la serie A (OPA - 01 al OPA - 20) de la casa comercial Operon® (Operon Technologies, Estados Unidos), empleando seis muestras de ADN genómico obtenidas cada una a partir de un individuo adulto y seis muestras obtenidas a partir de grupos de 20 áfidos, para un total de 12 muestras de cada una de las especies, *M. luteum* y *T. citricidus*. Para la reacción de PCR se utilizaron 7,6 µL de agua libre de nucleasas, 10 µL de Dream Taq PCR Master Mix (2 X), 0,4 µL del iniciador OPA (10 µM) y 2 µL de ADN. La amplificación de los fragmentos de ADN se realizó utilizando el siguiente perfil térmico: 94°C por cinco minutos, seguido de 40 ciclos a 94°C por 45 segundos, 36°C por 45 segundos y 72°C por un minuto, por último, un ciclo de elongación final a 72°C por cinco minutos, en un termociclador PTC-200 (MJ Research, Canadá).

Finalmente, 5 µL de cada uno de los productos de PCR, se visualizaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 1,5 % en amortiguador TAE 1 X (Tris-acetato-EDTA; Tris-Base 40 mM; ácido acético 20 mM; EDTA 1 mM) durante un periodo aproximado de 45 - 60 minutos a 95 V, empleando marcador molecular de 1 Kb (SM0312; ThermoScientific, Estados Unidos). Al finalizar la electroforesis, se tiñeron los fragmentos de ADN amplificados en una disolución de GelRed® al 0,0003% en agitación constante, durante un periodo de 30 minutos. Al finalizar la tinción, se visualizaron los fragmentos de ADN bajo luz ultravioleta en un transiluminador.

Tras evaluar los 20 iniciadores (Cuadro 2) con ambas especies de áfidos, se seleccionaron los tres iniciadores que originaron la mayor cantidad de bandas consistentes para cada una de las especies. Se eligieron OPA 08, 11 y 13 para *M. luteum* y OPA 01, 07 y 09 para *T. citricidus*. Utilizando estos tres iniciadores se realizó la primera prueba de la técnica de MS-RAPD empleando muestras de ADN de uno y 20 áfidos adultos de cada especie. Se eligieron las muestras con las que se obtuvieron bandas de mejor calidad de las muestras que previamente fueron utilizadas en la prueba de todos los iniciadores OPA. Se seleccionaron tres muestras



de uno y tres muestras de 20 individuos para cada especie de áfido en estudio. De cada trío de muestras seleccionadas se procuró elegir una con baja concentración de ADN (~10 ng/  $\mu$ L), otra con concentración intermedia (~50 ng/  $\mu$ L) y una con una alta concentración (~100 ng/  $\mu$ L). El objetivo fue determinar cuál concentración de ADN y cuantos individuos eran necesarios para poder obtener un patrón de bandas.

Las muestras de ADN seleccionadas fueron digeridas con el kit para análisis de metilación de ADN EpiJet (Thermo Fisher Scientific, Estados Unidos), el cual contiene las enzimas de restricción *Msp* I y *Hpa* II. Para la digestión, se tomaron 10  $\mu$ L de cada muestra de ADN, con 1  $\mu$ L de cada una de las enzimas de restricción (*Msp* I y *Hpa* II), 7  $\mu$ L de agua libre de nucleasas y 2  $\mu$ L de buffer 10 X, para un volumen final de 20  $\mu$ L. Las muestras fueron incubadas a 37°C durante un periodo de una hora y para finalizar la reacción se incubaron a 90°C durante 10 minutos, según el protocolo del fabricante.

Posteriormente, se procedió a amplificar los fragmentos de restricción. Para ésto se realizó un procedimiento convencional de RAPDs, empleando los 3 iniciadores más informativos seleccionados previamente para cada una de las dos especies de áfidos y utilizando las mismas condiciones de amplificación. La visualización de los fragmentos amplificados se realizó mediante electroforesis en gel de agarosa con las mismas condiciones descritas previamente.

Se realizaron dos réplicas con el fin de determinar si los resultados de los MS-RAPDs eran consistentes. Sin embargo, para el análisis de los patrones de bandas obtenidos en las dos réplicas realizadas, solamente se eligieron aquellas bandas que fueron consistentes en ambas réplicas, con el propósito de realizar un análisis más parsimonioso y evitar sobre- o subestimación del grado de metilación.

Con el objetivo de corroborar ausencia de inhibidores o degradación de los ADN, se realizaron amplificaciones de la región de la Citocromo Oxidasa I a todas las muestras empleadas para el análisis de MS-RAPD, como un control positivo.

**Cuadro 2.** Total de iniciadores (Operon technologies, USA) de la serie A probados con las especie *T. citricidus* y *M. luteum*

<b>Iniciador</b>	<b>Secuencia de ADN</b>
OPA-01	5'-CAGGCCCTTC-3'
OPA-02	5'-TGCCGAGCTG-3'
OPA-03	5'-AGTCAGCCAC-3'
OPA-04	5'-AATCGGGCTG-3'
OPA-05	5'-AGGGGTCTTG-3'
OPA-06	5'-GGTCCCTGAC-3'
OPA-07	5'-GAAACGGGTG-3'
OPA-08	5'-GTGACGTAGG-3'
OPA-09	5'-GGGTAACGCC-3'
OPA-10	5'-GTGATCGCAG-3'
OPA-11	5'-CAATCGCCGT-3'
OPA-12	5'-TCGGCGATAG-3'
OPA-13	5'-CAGCACCCAC-3'
OPA-14	5'-TCTGTGCTGG-3'
OPA-15	5'-TTCCGAACCC-3'
OPA-16	5'-AGCCAGCGAA-3'
OPA-17	5'-GACCGCTTGT-3'
OPA-18	5'-AGGTGACCGT-3'
OPA-19	5'-CAGGCCCTTC-3'
OPA-20	5'-GTTGCGATCC-3'

### **6.6.2 MS-RAPD para comparar el estado de metilación entre áfidos de diferentes estadios.**

Se colectaron tres ninfas, tres adultos ápteros y tres adultos alados de las especies *M. luteum* y *T. citricidus* en tres fechas diferentes (04/12/2015, 07/01/2016 y el 01/04/2016 para *T. citricidus* y 07/01/2016, 03/03/2016 y 01/04/2016 para *M. luteum*). Se obtuvieron registros de las condiciones ambientales (temperatura y humedad) durante las semanas en las que se realizó la colecta de especímenes utilizando un datalogger colocado dentro de una caja en el invernadero (mismas condiciones a las que están expuestas las colonias). Posteriormente, se realizó extracción del ADN a cada uno de los individuos colectados, según el protocolo mencionado anteriormente.

Seguidamente, alícuotas independientes de cada muestra de ADN aislada, fueron digeridas con una de las dos enzimas de restricción sensibles a metilación. Se utilizó el par de enzimas *Msp* I (insensible a metilación) y *Hpa* II (sensible a metilación). La digestión con ambas enzimas se realizó de la forma descrita anteriormente utilizando 10 µL de cada muestra de ADN siguiendo las especificaciones del fabricante.

Posteriormente, se eligió uno de los tres iniciadores para RAPD seleccionados previamente para cada una de las especies. En el caso de *T. citricidus* se seleccionó el OPA-09, mientras que para la especie *M. luteum* se seleccionó el iniciador OPA-13. Con dichos iniciadores se realizó un RAPD según protocolo anteriormente mencionado, con cada una de las muestras de ADN previamente habían sido digeridas con las enzimas de restricción. Finalmente, se realizaron electroforesis en gel de agarosa al 1,5 % utilizando amortiguador TAE para algunas de las muestras, mientras que para otras se utilizó el analizador de fragmentos QIAxcel (QIAGEN, Estados Unidos). En ambos casos, los patrones de bandas fueron digitalizados en una matriz de datos binomial de presencia y ausencia para su posterior análisis estadístico.

Adicionalmente, se realizó la detección de bacterias endosimbiontes a todas las muestras analizadas en esta etapa, de la manera descrita previamente en el apartado 6.4.1. Los resultados de metilación y diversidad de endosimbiontes fueron utilizados para realizar comparaciones según el estadio del individuo y según la fecha en la que se colectaron.

## **6.7 Análisis de los resultados**

### **6.7.1 Análisis estadístico de resultados obtenidos en bioensayos.**

Con los conteos de mortalidad registrados diariamente para cada uno de los tratamientos de temperatura durante los bioensayos, se comprobó que no se cumplen los supuestos de homocedasticidad y normalidad por lo que se realizó una

prueba de Kruskal-Wallis con el objetivo de comparar la mortalidad observada en cada uno de los tratamientos. Seguidamente se realizaron comparaciones pareadas utilizando la prueba no paramétrica de Wilcoxon con el fin de determinar cuáles tratamientos fueron diferentes entre sí. Ambas pruebas se realizaron en el programa estadístico JMP 13 (SAS Institute Inc., Cary, N. C., USA). Por último, se realizó una corrección de los datos utilizando la fórmula de Abbott (Abbott, 1925). Dicha fórmula permite corregir la mortalidad de cada tratamiento con base en la mortalidad registrada en el grupo control.

### **6.7.2 Análisis de los resultados de MS-RAPD.**

Con el patrón de bandas de los diferentes fragmentos de ADN obtenidos del análisis de MS-RAPD, se realizó una matriz binomial de presencia / ausencia que se analizó utilizando el paquete *msap* del programa R 3.2.2 (R Core Team, 2015). Este paquete está diseñado para analizar los resultados de la técnica MSAP, en la cual se utilizan las mismas enzimas de restricción sensibles a metilación empleadas en la técnica MS-RAPD, pero en lugar de amplificar los fragmentos de restricción con RAPDs, se realiza mediante polimorfismos en la longitud de fragmentos amplificados (AFLP). Debido a esto la interpretación de los resultados obtenidos con este paquete debe realizarse de manera diferente.

En el caso de la técnica MSAP solamente se obtiene una banda cuando ocurre un corte por parte de alguna de las dos enzimas, debido a que se utilizan adaptadores que se unen a las puntas pegajosas de los fragmentos de restricción y posteriormente los imprimadores se pegan a estos adaptadores, por lo tanto la presencia de una banda implica que existió un corte en el sitio de restricción. Por el contrario, en la técnica MS-RAPD la presencia de una banda significa que no un hubo corte por parte de las enzimas y en este caso como el ADN no fue digerido fue posible la unión del iniciador y fue posible la amplificación del fragmento.

Debido lo anterior los resultados que se obtienen con el paquete *msap* deben ser interpretados de manera inversa. Por ejemplo, en MSAP si se obtuvo una banda

con ambas enzimas (*Msp* I y *Hpa* II) significa que el sitio de restricción se encuentra sin metilar, mientras que ese mismo patrón en MS-RAPD significa que ese sitio se encuentra completamente metilado.

Utilizando el paquete *msap* se evaluó la diferenciación en el nivel de metilación entre muestras del mismo estadio y de la misma especie. Con este paquete, también se comparó el estado de metilación de áfidos de diferentes estadios, en donde se realizaron comparaciones estadísticas (AMOVA e Índice de Shannon) para determinar si existían diferencias en el estado de metilación de ninfas, adultos ápteros y adultos alados. Posteriormente, se realizó el mismo análisis utilizando los mismos datos, pero ordenándolos según su fecha de colecta (sin importar su estadio) para evaluar diferencias en el estado de metilación en respuesta a la fecha en la que los individuos fueron colectados.

Seguidamente con los datos de temperatura y humedad correspondientes a las semanas en las que se realizó la colecta de individuos, se hizo un análisis de varianza (ANOVA) para determinar si existían diferencias significativas entre la temperatura y humedad promedio registradas durante estas fechas.

Adicionalmente se realizaron comparaciones pareadas de cada una de las categorías de metilación por semana utilizando una prueba HSD (honestly significant difference) de Tukey (Abdi & Williams, 2010) con un  $\alpha = 0,05$  en el programa estadístico JMP 13 (SAS Institute Inc., Cary, N. C., USA).

## 7. RESULTADOS

### 7.1 Bioensayos con temperatura variable

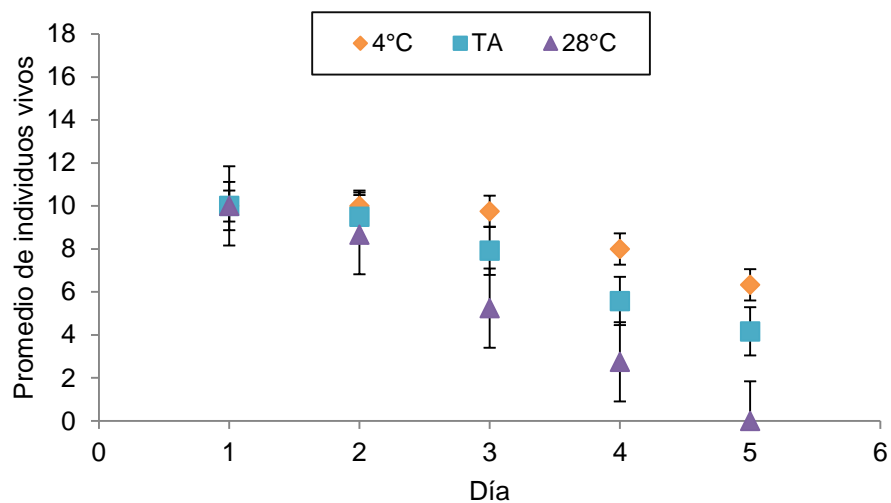
En el caso de la especie *T. citricidus* se encontraron diferencias en la mortalidad observada entre los tratamientos de temperatura ( $J = 19,86$ ;  $gl = 2$ ;  $P < 0,001$ ). Los tratamientos 28°C y 4°C fueron significativamente distintos ( $P < 0,0001$ ) entre sí y el tratamiento de 28°C fue significativamente distinto del grupo control ( $P = 0,0004$ ) (Cuadro 3). Se observó que el número total de individuos vivos, es decir, los

sobrevivientes a los tratamientos más las ninfas nacidas durante el bioensayo , en el caso de la especie *T. citricidus*, disminuyó al cabo de los cinco días de la prueba en los dos tratamientos y en el grupo control (Fig. 4). El tratamiento a 28°C fue el que mostró una mayor disminución en la cantidad de individuos, ya que al final del bioensayo presentó un 100% de mortalidad, lo cual fue consistente en las cuatro réplicas del bioensayo (Figs. 4 y 5). En esta especie, en ninguno de los tratamientos se observó reproducción.

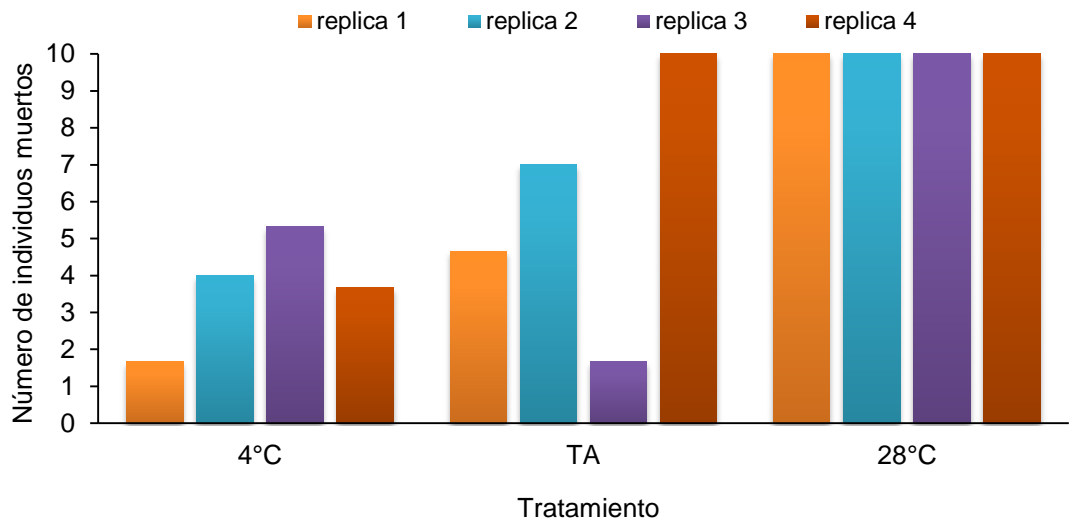
**Cuadro 3.** Probabilidad asociada a las comparaciones pareadas (Wilcoxon) realizadas entre los resultados de mortalidad obtenidos en cada uno de los tratamientos de temperatura realizados con la especie *T. citricidus*.

Comparación entre tratamientos	Probabilidad
TA y 4°C	0,097
TA y 28°C	0,0004*
4°C y 28°C	< 0,0001*

\* Probabilidades significativas según un criterio de  $P \leq 0.05$ .



**Figura 4.** Promedio (cuatro repeticiones) de individuos vivos (ninfas + sobrevivientes) de la especie *T. citricidus* registrados durante cada día de bioensayo a tres temperaturas. Barras indican el error estándar. TA: Temperatura ambiente.



**Figura 5.** Mortalidad observada en cada réplica de los bioensayos de temperatura variable realizados con la especie *T. citricidus*. TA: Temperatura ambiente.

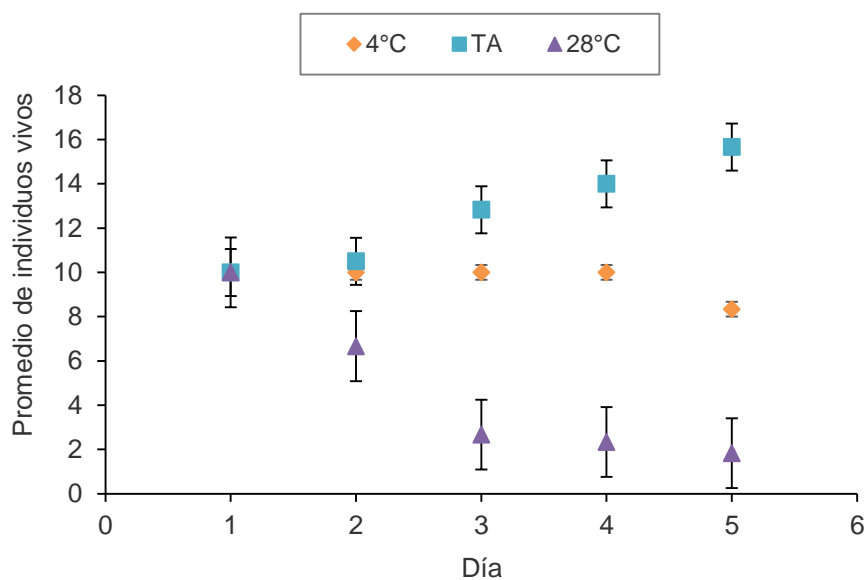
También se encontraron diferencias en la mortalidad de los tratamientos con la especie *M. luteum* ( $J = 15,58$ ;  $gl = 2$ ;  $P = 0,0004$ ) y con las comparaciones pareadas se comprobó que todos los tratamientos fueron diferentes entre sí (Cuadro 4). Se observó que el número total de individuos en el grupo control tendió a incrementar a través de los días, lo que indica que existió reproducción en este grupo. Mientras que en el tratamiento a 4°C la cantidad de individuos se mantuvo constante. En las cuatro réplicas del bioensayo realizado con la especie *M. luteum*, el tratamiento a 4°C fue el que presentó la menor mortalidad (Fig. 7). Por el contrario, en el tratamiento a 28°C la cantidad total de individuos disminuyó a través de los días. Esta tendencia en el

tratamiento de 28°C fue igual a lo observado en la especie *T. citricidus*; sin embargo, en *M. luteum* la mortalidad no llegó al 100 % como en el caso de *T. citricidus* (Fig. 6).

**Cuadro 4.** Probabilidad asociada a las comparaciones pareadas (Wilcoxon) realizadas con los resultados de mortalidad obtenidos en cada uno de los tratamientos de temperatura realizados con la especie *M. luteum*.

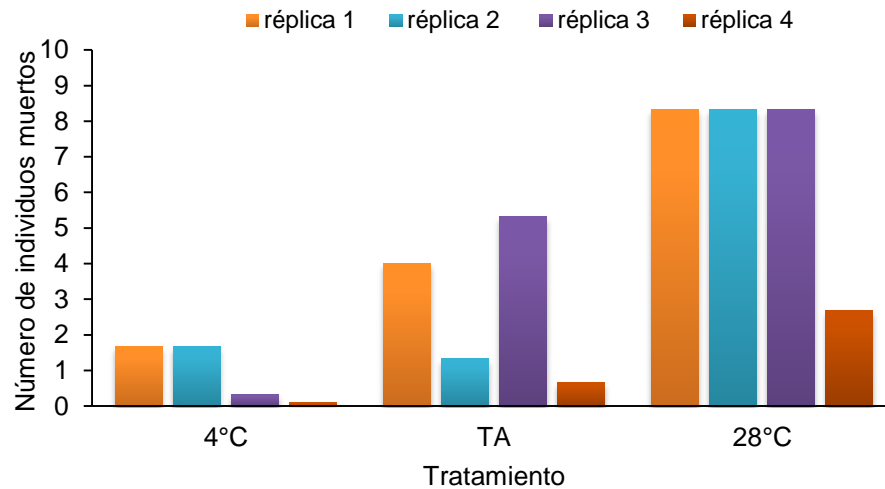
Comparación entre tratamientos	Probabilidad
TA y 4°C	0,0441*
TA y 28°C	0,0096*
4°C y 28°C	0,0004*

\* Probabilidades significativas según un criterio de  $P \leq 0.05$ .



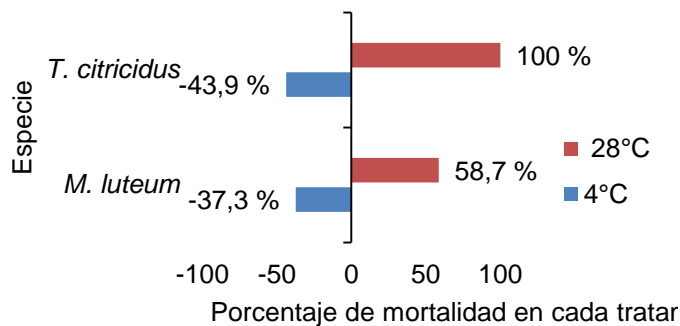


**Figura 6.** Promedio (cuatro repeticiones) de individuos vivos (ninfas + sobrevivientes) de la especie *M. luteum* registrados durante cada día de bioensayo a tres temperaturas. Barras indican el error estándar. TA: Temperatura ambiente.



**Figura 7.** Mortalidad observada en cada replica de los bioensayos realizados con temperatura variable utilizando la especie *M. luteum*. TA: Temperatura ambiente.

Al corregir los datos empleando la fórmula de Abbott, se comprobó que en el tratamiento a 4°C disminuye el porcentaje de mortalidad en ambas especies. Para el caso de la especie *T. citricidus* en el tratamiento a 4°C la mortalidad disminuyó un 43,89 % con respecto a la mortalidad registrada en el grupo control, mientras que para el caso de *M. luteum* esta disminución en la mortalidad fue de un 37,33 %. Por el contrario, el porcentaje de mortalidad aumenta en el tratamiento a 28°C, en donde en la especie *T. citricidus* alcanza el 100 %, mientras que en *M. luteum* mostró un 58,71 % con respecto a la observada en el grupo control (Fig. 8).



**Figura 8.** Variación de la mortalidad observado en los tratamientos de temperatura (4°C y 28°C) de *M. luteum* y *T. citricidus* con respecto al grupo control control (temperatura ambiente) después de realizar la corrección de Abbott.

## 7.2 Detección de Endosimbiontes

Se colectaron 49 muestras correspondientes a un total de 20 especies de áfidos pertenecientes a 12 géneros (Cuadro 5 y Anexo 1). La figura 9 muestra un ejemplo de una electroforesis en gel de agarosa para visualizar los productos del PCR multiplex. De las muestras analizadas se detectó que, 41 (83,7 %) poseían simbiosis con la bacteria *Buchnera*, 14 con *Wolbachia* (28,6 %), nueve con *Serratia symbiotica* (18,4 %), cinco con *Rickettsia* (10,2 %), dos con *Hamiltonella defensa* (4,1 %) y dos con *Regiella insecticola* (4,1 %). En ninguna de las muestras analizadas se logró detectar la presencia de las bacterias *Spiroplasma*, *Rickettsiella*, ni PAXS (Cuadro 6).

Se observaron infecciones únicas (14 %) así como infecciones múltiples con diferentes especies de bacterias endosimbiontes. La muestra en la que se detectó el mayor número de endosimbiontes fue *T. citricidus* (TC26) con cuatro especies. Seguidamente, se encontraron tres especies de bacterias en las especies *Picturaphis pojarii* (PC4 y PC11), *Macrosiphum rosae* (A8 y A10), *Aphis gossypii* (365 A y B) y *Aphis craccivora* (363 A y B). Por el contrario, no se detectó ningún endosimbionte en las muestras de las especies *Cerataphis lataniae* (39 y 40), *Aphis nerii* (AN28 y

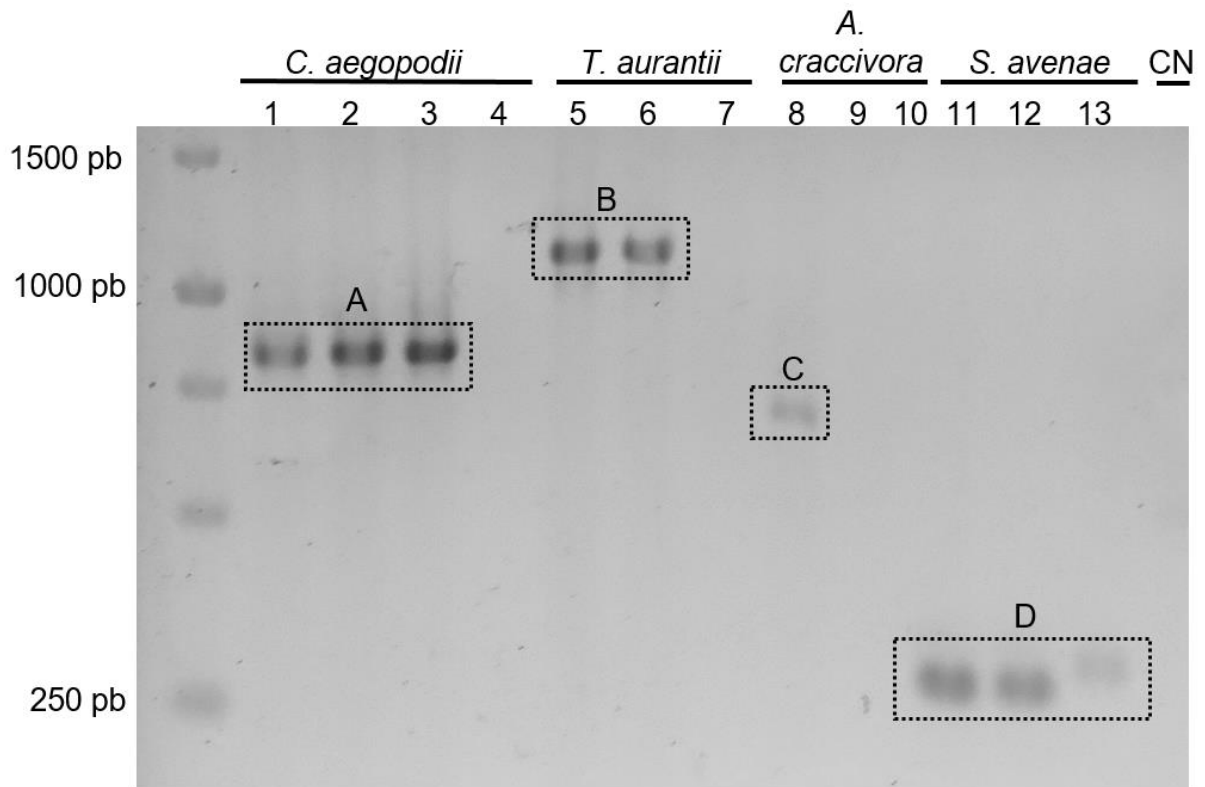
AN30), *Neophylaphis varicolor* (NV18) y *Tinocallis kahawaluokani* (382 A y 382 B) (Cuadro 6). Se detectaron nuevas asociaciones simbióticas que no habían sido reportadas previamente, entre éstas están la asociación de *A. sambuci*, *M. salviae*, *N. varicolor* y *P. pojani* con *Wolbachia*, *G. psidii* con *S. symbiotica*, *P. pojani* con *H. defensa* y *C. aegopodii* con *R. insecticola*.

**Cuadro 5.** Muestras<sup>1</sup> de áfidos colectadas para la detección molecular de bacterias endosimbiontes

<b>Especie de áfido</b>	<b>N<sup>2</sup></b>	<b>Códigos</b>	<b>Localidad</b>	<b>Planta hospedera</b>
<i>Aphis craccivora</i>	2	363 (A), 363 (B)	Guácima, Alajuela	<i>Gliricidia sepium</i>
<i>Aphis gossypii</i>	5	AG1, AG21 370 365 (A), 365 (B)	Cartago Moravia, San José Los Angeles, Cartago	<i>Citrus</i> sp. <i>Epidendrum radicans</i> <i>Citrus sinensis</i>
<i>Aphis helianthi</i>	2	AH35, AH36	Alajuela	<i>Helianthus annuus</i>
<i>Aphis nerii</i>	2	AN28, AN30	Sabanilla, San José	Sin identificar
<i>Aphis sambuci</i>	2	AS6, AS7	Ujarrás, Alajuela	<i>Sambucus</i> sp.
<i>Aphis spiraecola</i>	2	AS14, AS20	Cartago	Sin identificar
<i>Brevicoryne brassicae</i>	2	375 (A), 375 (B)	Alajuela	<i>Cucumis sativus</i>
<i>Cavariella aegopodii</i>	2	CA15, CA16	Coronado, San José	<i>Pimpinella anisum</i>
<i>Cerataphis lataniae</i>	2	39, 40	Heredia	<i>Vainilla</i> sp.
<i>Greenidea psidii</i>	2	GP22, GP23	San Pedro, San José	<i>Psidium</i> sp.
<i>Macrosiphum luteum</i>	3	ML21, MLA, MLB	Sabanilla, San José	<i>Epidendrum</i> sp.
<i>Macrosiphum rosae</i>	2	A8, A10	Coronado, San José	<i>Rosa</i> sp.
<i>Macrosiphum salviae</i>	2	376 (A), 376 (B)	Tres Ríos, San José	<i>Tetradenia riparia</i>
<i>Macrosiphum</i> sp.	2	369 (A), 369 (B)	Moravia, San José	<i>Rosa</i> sp.
<i>Melanaphis sacchari</i>	2	381 (A), 381 (B)	Santa Cruz, Guanacaste	<i>Sorghum bicolor</i>
<i>Neophylaphis varicolor</i>	4	NV18, NV19, 364(A), 364(B)	San Pedro, San José	<i>Podocarpus</i> sp.
<i>Picturaphis pojanii</i>	2	PC4, PC11	Coronado, San José	<i>Phlebodium pseudoaureum</i>
<i>Sitobion avenae</i>	3	362 (A), 362 (B) SA26	Sabanilla, San José Cerro Buena Vista, San José	<i>Pennisetum purpureum</i> Poaceae
<i>Tinocallis kahawaluokani</i>	2	382 (A), 382 (B)	San Francisco de Dos Ríos, San José	<i>Lagerstroemia indica</i>
<i>Toxoptera aurantii</i>	2	TA24, TA27	Coronado, San José	<i>Origanum vulgare</i>
<i>Toxoptera citricidus</i>	2	TC26, TC37	Sabanilla, San José	<i>Citrus</i> sp.

<sup>1</sup> Cada muestra corresponde a la extracción de ADN de un grupo de 20 individuos de la colonia respectiva.

<sup>2</sup> Total de muestras por especie de áfido



**Figura 9.** Electroforesis en gel de agarosa para visualizar los productos de la región 16S del ARN ribosomal de bacterias endosimbiontes amplificadas mediante PCR multiplex en muestras de diferentes especies de áfidos. Se utilizó marcador molecular de 1 Kb Fermentas SM 0313. A: *Regiella insecticola*, B: *Serratia symbiotica*, C: *Rickettsia* sp., D: *Buchnera* sp., CN: Control negativo.

**Cuadro 6.** Especies de endosimbiontes detectados<sup>1</sup> en las diferentes especies de áfidos analizadas.

Especie	<i>Wolbachia</i>	<i>Buchnera</i>	<i>Serratia symbiotica</i>	<i>Rickettsia</i>	<i>Hamiltonella defensa</i>	<i>Regiella insecticola</i>	Total EE <sup>2</sup>
<i>A. craccivora</i>	X	X		X			3/6
<i>A. gossypii</i>		X	X	X			3/6
<i>A. helianthi</i>		X					1/6
<i>A. nerii</i>							0/6
<i>A. sambuci</i>	X	X					2/6
<i>A. spiraecola</i>		X					1/6
<i>B. brassicae</i>		X					1/6
<i>C. aegopodii</i>		X				X	2/6
<i>C. lataniae</i>							0/6
<i>G. psidii</i>		X	X				2/6
<i>M. luteum</i>		X					1/6
<i>M. rosae</i>	X	X	X				3/6
<i>M. salviae</i>	X	X					2/6
<i>Macrosiphum sp.</i>		X					1/6
<i>M. sacchari</i>		X					1/6
<i>N. varicolor</i>	X	X					2/6
<i>P. pojarii</i>	X	X			X		3/6
<i>S. avenae</i>	X	X	X				3/6
<i>T. kahawaluokalani</i>							0/6
<i>T. aurantii</i>		X	X				2/6
<i>T. citricidus</i>	X	X	X	X			4/6
<b>Total EA<sup>3</sup></b>	8 / 21	18 / 21	6 / 21	3 / 21	1 / 21	1 / 21	

\*En negrita se resaltan las asociaciones simbióticas que no habían sido descritas hasta el momento.

<sup>1</sup> X: Detección de bacterias endosimbiontes en una determinada especie de áfido.

<sup>2</sup> EE : Número de especies de endosimbiontes totales por cada especie de áfido.

<sup>3</sup> EA : Número de especies de áfidos en que se detectó una especie de endosimbionte en particular.

Como se resume en el Cuadro 7, la mayoría de las especies de áfidos (60% aproximadamente), poseen solo uno o dos endosimbiontes. En tres especies no se logró detectar ninguna bacteria endosimbionte y por el contrario, en una especie de áfido (*Toxoptera citricidus*) se detectó un total de cuatro especies de bacterias endosimbiontes (Anexos 2 y 3).

**Cuadro 7.** Bacterias endosimbiontes encontradas por especie de áfidos

Total de endosimbiontes encontrados	Número de especies de áfidos (%)	Número de muestras <sup>1</sup> (%)
0	3 (14)	8 (16,3)
1	6 (28,5)	19 (38,9)
2	6 (28,5)	13 (26,5)
3	5 (24)	8 (16,3)
4	1 (5)	1 (2)

<sup>1</sup> Cada muestra corresponde a la extracción de ADN de un grupo de 20 individuos de la colonia respectiva

Se observó que la detección de la bacteria *Buchnera* no fue consistente entre el PCR multiplex (Peccoud *et al.*, 2014) y PCR tradicional realizado con iniciadores específicos (Tsuchida *et al.* 2002) para amplificar la región 16S de esta especie. En el caso del PCR multiplex, se detectó al endosimbionte *Buchnera* en 23 (47 %) de las 49 muestras evaluadas. Mientras que con el PCR realizado con iniciadores específicos para *Buchnera* (Tsuchida *et al.* 2002) se determinó que 37 (75,5 %) de las 49 muestras poseían la bacteria.

Al realizar la comprobación mediante “Barcoding” de indentificación de las especies de áfidos incluidas en este estudio, en el 80 % de las muestras (19 / 24) concordó la identificación morfológica con la identificación molecular. Sin embargo, se encontraron discrepancias entre ambos métodos en el 20 % (5 / 24) de las especies a las que se les realizó esta comprobación (Cuadro 8). Esto se observó en las especies identificadas morfológicamente como: *Picturaphis pojanii*, *Toxoptera aurantii*, *Aphis gossypii*, *Aphis craccivora* y *Macrosiphum salviae*.

También se encontraron discrepancias en la identidad de los endosimbiontes presentes en los áfidos entre la detección de endosimbiontes específicos mediante PCR multiplex y la secuenciación de algunos de esos productos (Cuadro 9). En este caso se encontró que un 30 % (7 / 23) de los casos analizados adicionalmente por secuenciación, los resultados de ambos métodos no concordaron. Se observó que las especies de bacterias endosimbiontes identificadas mediante el PCR Multiplex

como *Serratia symbiotica* y *Rickettsia* sp. al realizar el BLAST poseían un mayor porcentaje de similitud (98-99%) con el simbiote *Arsenophonus* sp.

**Cuadro 8.** Comparación<sup>1</sup> de la identificación morfológica y de la identificación molecular de especies de áfidos utilizando la región de la Citocromo Oxidasa I.

Código de muestra	Identificación morfológica	Identificación molecular	Número de acceso	% de similitud	% de cobertura
AG1	<i>Aphis gossypii</i>	<i>Aphis gossypii</i>	gb EU930156.1	100	100
PC4	<b><i>Picturaphis pojanii</i></b>	<b><i>Brachycaudus spiraeae</i></b>	gb EU189672.1	<b>95</b>	<b>100</b>
AS6	<i>Aphis sambuci</i>	<i>Aphis sambuci</i>	gb KR043542.1	100	100
A8	<i>Macrosiphum rosae</i>	<i>Macrosiphum rosae</i>	gb DQ499035.1	99	100
A9	<i>Macrosiphum rosae</i>	<i>Macrosiphum rosae</i>	gb KJ502205.1	99	100
AS14	<i>Aphis spiraecola</i>	<i>Aphis spiraecola</i>	dbj AB506735.1	99	100
CA16	<i>Cavariella aegopodii</i>	<i>Cavariella aegopodii</i>	gb KR041595.1	99	100
NV18	<i>Neophyllaphis varicolor</i>	<i>Neophyllaphis</i> sp.	gb KF199852.1	99	100
M21	<i>Aphis gossypii</i>	<i>Aphis gossypii</i>	gb EU930156.1	99	100
GP22	<i>Greenidea psidii</i>	<i>Greenidea psidii</i>	gb EU701673.1	100	97
TA25	<b><i>Toxoptera aurantii</i></b>	<b><i>Scymnus</i> sp</b>	gb KJ168024.1	<b>92</b>	<b>100</b>
SA26	<i>Sitobion avenae</i>	<i>Sitobion avenae</i>	gb KJ742384.1	96	100
AN28	<i>Aphis nerii</i>	<i>Aphis nerii</i>	dbj AB506733.1	100	100
29	<i>Aphis nerii</i>	<i>Aphis nerii</i>	dbj AB506733.1	100	100
31	<b><i>Aphis gossypii</i></b>	<b><i>Aphis taraxacicola</i></b>	gb KF639079.1	<b>88</b>	<b>92</b>
AG32	<i>Aphis gossypii</i>	<i>Aphis gossypii</i>	gb KJ669654.1	100	99
36	<i>Aphis spiraecola</i>	<i>Aphis spiraecola</i>	AB506735.1	<b>100</b>	<b>98</b>
362	<i>Sitobion avenae</i>	<i>Sitobion avenae</i>	KR038196.1	97	100
363	<b><i>Aphis craccivora</i></b>	<b><i>Aphis rumicis</i></b>	GU324628.1	<b>99</b>	<b>98</b>
364	<i>Neophyllaphis varicolor</i>	<i>Neophyllaphis</i> sp.	KF199852.1	99	100
375	<i>Brevicoryne brassicae</i>	<i>Brevicoryne brassicae</i>	JQ240190.1	99	99
376	<b><i>Macrosiphum salviae</i></b>	<b><i>Illinoia menziesiae</i></b>	KR038570.1	<b>95</b>	<b>100</b>
381	<i>Melanaphis sacchari</i>	<i>Melanaphis sacchari</i>	KJ083111.1	99	99
382	<i>Tinocallis kahawaluokalani</i>	<i>Sarucallis kahawaluokalani</i> *	EU701898.1	100	100

<sup>1</sup>En negrita se muestran las inconsistencias entre la taxonomía morfológica y la molecular

\*Clasificación taxonómica anterior

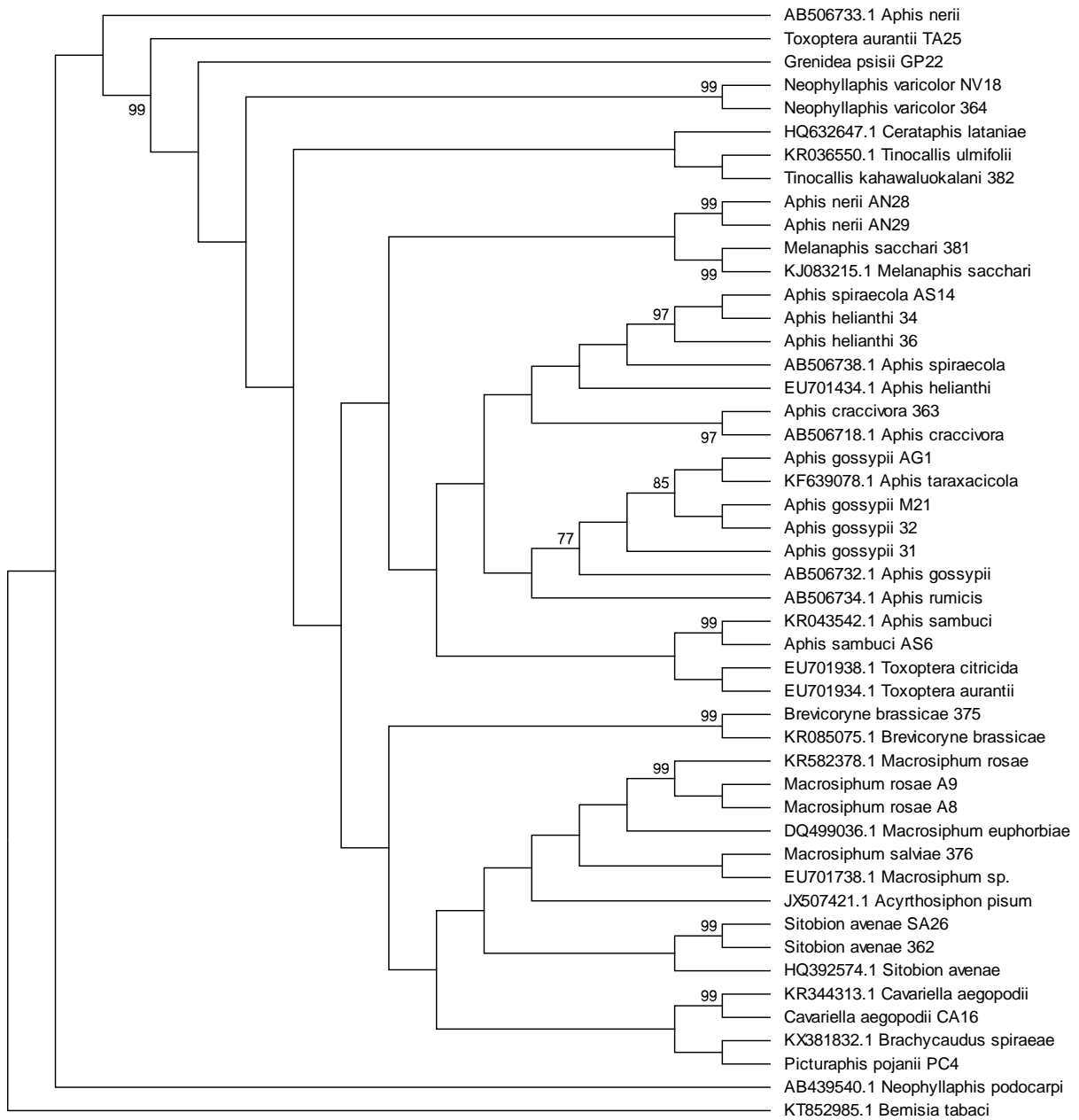


**Cuadro 9.** Comparación<sup>1</sup> de la identificación de bacterias endosimbiontes realizada mediante el PCR multiplex y la comprobación realizada por Megablast utilizando la región 16S del ARN ribosomal.

Código de muestra	Resultado de PCR múltiplex	Resultado del BLAST	Número de acceso	% de similitud	% de cobertura
A8	<i>Serratia symbiotica</i>	<i>Serratia symbiotica</i>	gb KM579593.1	99	95
A9	<i>Serratia symbiotica</i>	<i>Serratia symbiotica</i>	gb KM579593.1	99	100
A10	<i>Serratia symbiotica</i>	<i>Serratia symbiotica</i>	gb KM579593.1	99	100
TC26	<b><i>Serratia symbiotica</i></b>	<b><i>Arsenophonus sp.</i></b>	gb DQ115536.1	<b>99</b>	<b>100</b>
TC28	<b><i>Serratia symbiotica</i></b>	<b><i>Arsenophonus sp.</i></b>	gb AY264673.1	<b>99</b>	<b>100</b>
TC35	<b><i>Serratia symbiotica</i></b>	<b><i>Arsenophonus sp.</i></b>	gb JN990929.1	<b>98</b>	<b>100</b>
PC4	<i>Hamiltonella defensa</i>	<i>Hamiltonella defensa</i>	ref NR_074961.1	99	100
PC5	<i>Hamiltonella defensa</i>	<i>Hamiltonella defensa</i>	ref NR_074961.1	99	100
11	<i>Hamiltonella defensa</i>	<i>Hamiltonella defensa</i>	ref NR_074961.1	99	100
A13	<i>Hamiltonella defensa</i>	<i>Hamiltonella defensa</i>	gb KF835615.1	100	100
TC26	<b><i>Rickettsia sp.</i></b>	<b><i>Arsenophonus sp.</i></b>	gb JN990929.1	<b>99</b>	<b>100</b>
TC28	<b><i>Rickettsia sp.</i></b>	<b><i>Arsenophonus sp.</i></b>	gb JN990929.1	<b>99</b>	<b>100</b>
TC35	<b><i>Rickettsia sp.</i></b>	<b><i>Arsenophonus sp.</i></b>	gb JN990929.1	<b>99</b>	<b>100</b>
PC4	<i>Buchnera sp.</i>	<i>Buchnera aphidicola</i>	gb L81121.1	95	100
AS6	<i>Buchnera sp.</i>	<i>Buchnera aphidicola</i>	gb L81121.1	95	97
CA15	<i>Regiella insecticola</i>	<i>Regiella insecticola</i>	AC192956.2	99	95
CA16	<i>Regiella insecticola</i>	<i>Regiella insecticola</i>	AB780460.1	99	99
CA17	<i>Regiella insecticola</i>	<i>Regiella insecticola</i>	AB780460.1	99	100
9	<i>Serratia symbiotica</i>	<i>Serratia symbiotica</i>	KT175992.1	99	99
27	<i>Serratia symbiotica</i>	<i>Serratia symbiotica</i>	AY822593.1	99	99
363	<b><i>Rickettsia sp.</i></b>	<b><i>Buchnera aphidicola</i></b>	KT175936.1	<b>95</b>	<b>100</b>
362B	<i>Buchnera sp.</i>	<i>Buchnera aphidicola</i>	CP002302.1	96	100
375A	<i>Buchnera sp.</i>	<i>Buchnera sp.</i>	HE575572.1	99	99

<sup>1</sup>En negrita se muestran las inconsistencias entre la identificación mediante PCR multiplex y el Megablast

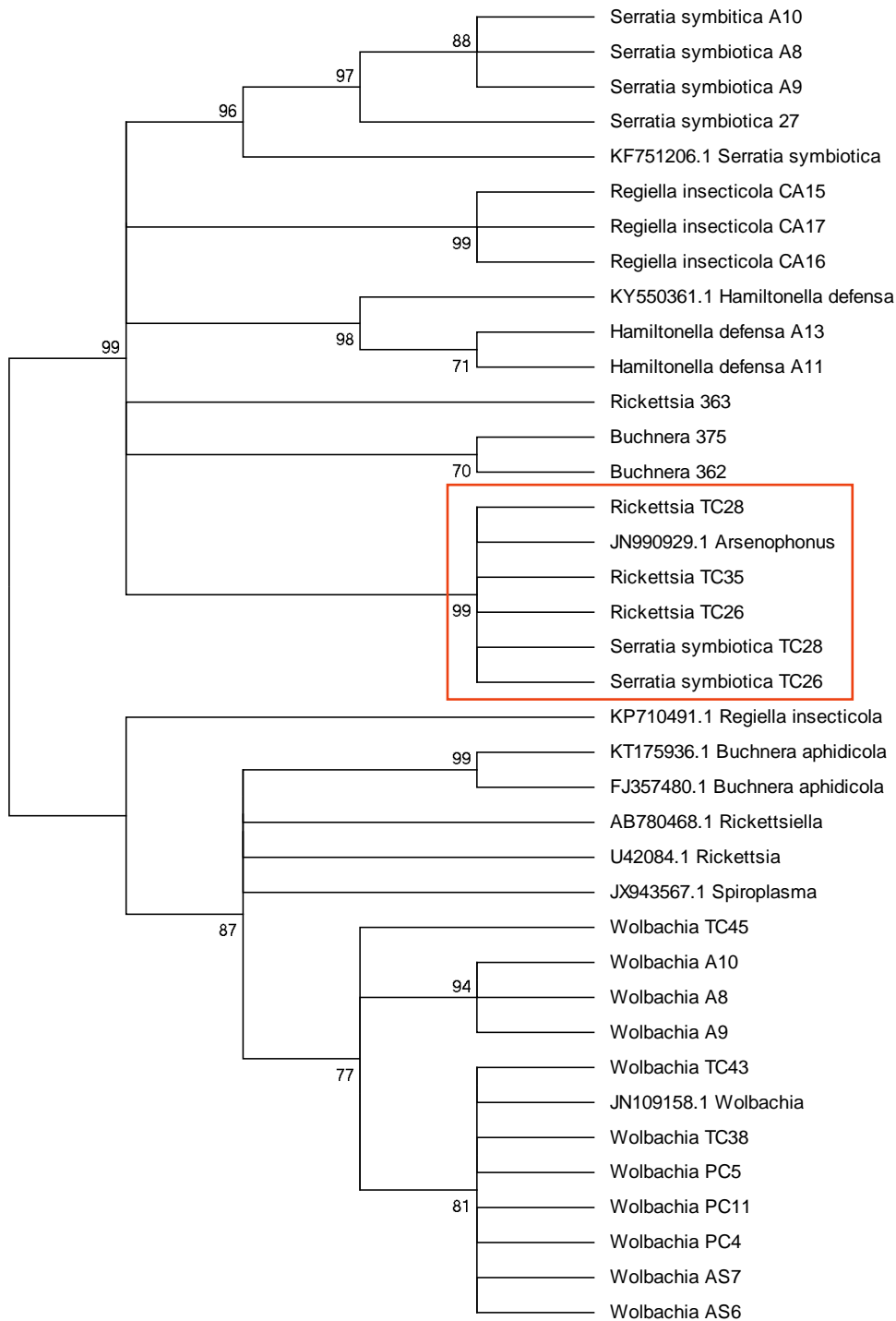
La filogenia realizada para la región de la citocromo oxidasa mitocondrial I (COI) de las diferentes especies de áfidos, muestra que la mayoría de las diferentes especies de áfidos se agruparon dentro del mismo clado que la respectiva secuencia de referencia (obtenida del GenBank) para la misma especie. Lo que confirmó la taxonomía morfológica (Fig. 10). Se observa que muestras de las especies *Aphis nerii* y *Melanaphis sacchari* son similares y se agrupan dentro del mismo subclado. Además, se encontró que la secuencia de *Cerataphis lataniae* (39) en 99% de las veces agrupó en el mismo clado que la especie *Brevicoryne brassicae* y no con la secuencia de *Cerataphis lataniae* de referencia obtenida del GenBank (Fig. 10).



**Figura 10.** Árbol filogenético (Neighbor-joining) realizado con secuencias de ADN de la región citocromo oxidasa I mitocondrial (658 pb) obtenidas de las especies de áfidos a las que se les realizó la detección de endosimbiontes.

En la figura 11 se muestra la filogenia realizada con secuencias de la región 16S del ARN ribosomal de bacterias endosimbiontes. Se observa que las especies identificadas mediante el PCR Multiplex como *Rickettsia* y *Serratia symbiotica* pero identificadas como *Arsenophonus* sp. mediante el BLAST, en la filogenia se agrupan dentro del mismo clado que la secuencia de referencia de *Arsenophonus* obtenida del GenBank (JN990929.1) y a la vez estas secuencias difieren de las identificadas mediante PCR Multiplex y mediante Megablast como *Serratia symbiotica*.

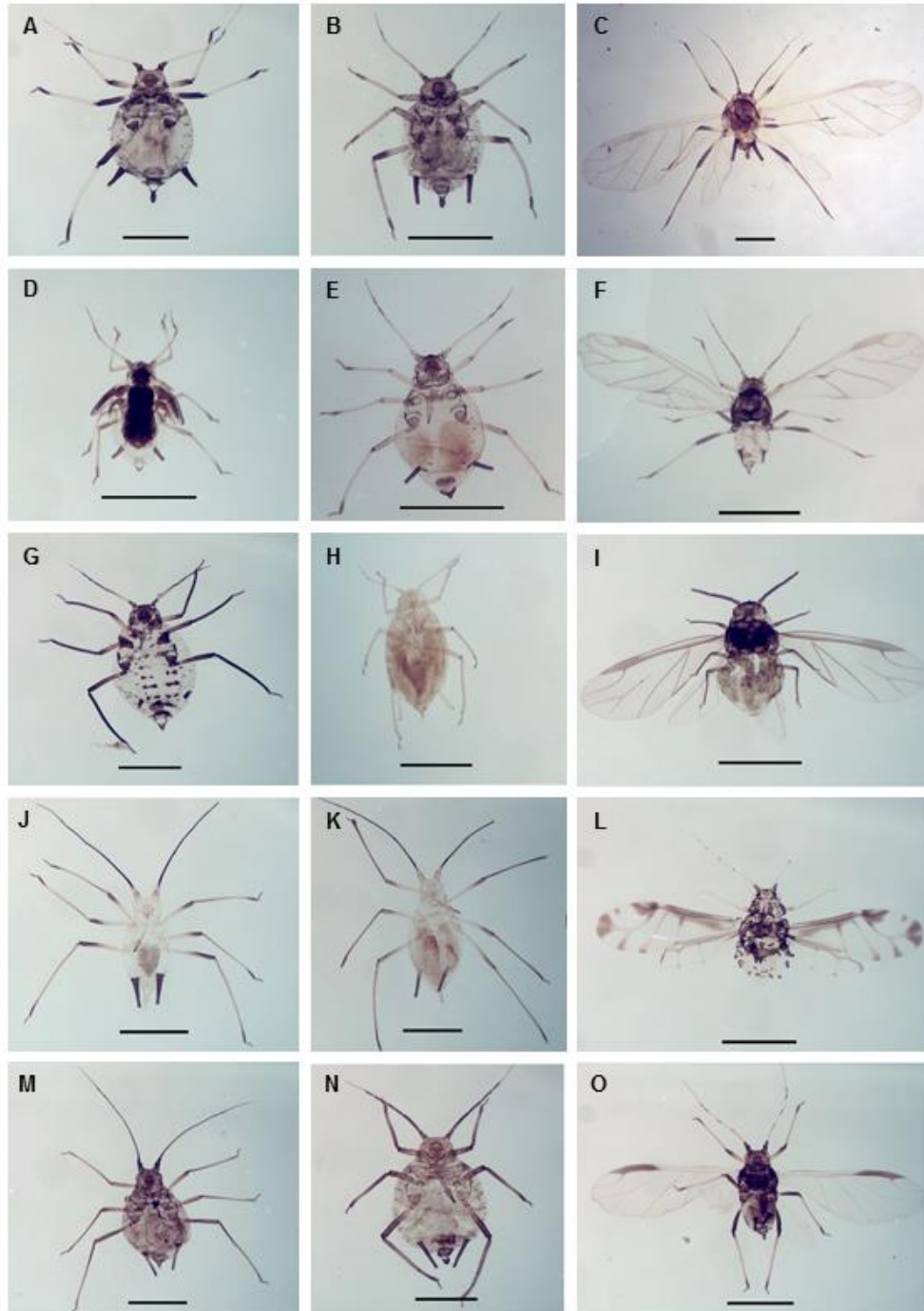
Se observó además que las especies que mediante el PCR Multiplex fueron identificadas como *Buchnera* sp. y mediante el BLAST como *Buchnera aphidicola*, en la filogenia no agrupan dentro del mismo clado con las secuencias de *B. aphidicola* de referencia obtenidas del GenBank (KT175936.1 y FJ357480.1).



**Figura 11.** Filogenia (Neighbor-joining) realizada con secuencias de ADN de la región 16S del ARN ribosomal de bacterias endosimbiontes de diferentes especies. En el recuadro rojo se señalan las secuencias identificadas mediante el PCR

Multiplex como *Serratia simbiótica* y *Rickettsia* pero según el BLAST corresponden a *Arsenophonus* sp.

Las especies de áfidos a las cuales se les realizó la detección de bacterias endosimbiontes y fueron preservadas en láminas fijadas se muestran en la Figura 12. Se prepararon de tres a cinco láminas por cada especie de áfido, para un total de 65. Se observó que el tiempo que tardan las diferentes especies de áfidos en clarificarse es variable; depende de factores como estadio y tamaño del áfido, presencia o ausencia de alas, entre otros factores. Debido a esto, al clarificar un individuo se debe de controlar constantemente su estado y velar por que se conserve integro a través del proceso y no sobreexponerlo al calor o los reactivos empleados en el protocolo para evitar daños en las estructuras más delicadas del organismo y de interés taxonómico como las patas, antenas y sifunculos.



**Figura 12.** Especímenes adultos de diferentes especies de áfidos preservados en láminas fijas para la identificación morfológica. A: *Toxoptera citricidus* (áptero), B: *Aphis craccivora* (áptero), C: *Aphis nerii* (alado), D: *Macrosiphum rosae* (alado), E: *Aphis spiraecola* (áptero), F: *Aphis spiraecola* (alado), G: *Brevicorine brassicae* (áptero), H: *Cavariella aegopodii* (áptero), I: *Cerataphis lataniae* (alado), J: *Macrosiphum luteum* (áptero), K: *Macrosiphum salviae* (áptero), L: *Tinocallis kahawaluokalani* (alado), M: *Picturaphis pojani* (áptero), N: *Aphis sambuci* (áptero), O: *Toxoptera aurantii* (alado), Barra: 1000  $\mu\text{m}$ .

### 7.3 Estandarización de Protocolo de MS-RAPD

En ninguna de las dos especies (*T. citricidus* y *M. luteum*) se observó variabilidad en los patrones de bandas obtenidos con RAPDs en muestras de ADN (no digerido) de áfidos de la misma colonia al probar los 20 iniciadores de la serie A (Operon technologies, Estados Unidos). En este protocolo se seleccionaron los tres iniciadores que presentaron el mayor número de bandas para cada especie y a la vez, que éstas fueran suficientemente intensas y bien definidas. Iniciadores con esas características son los más útiles para realizar el análisis de MS-RAPD, ya que al digerir con las enzimas sensibles a metilación se tendría mayor certeza de que cualquier variación en el patrón de bandas que se observe es producto de diferencias en el nivel de metilación y no a variabilidad genética entre los individuos. En el caso de la especie *T. citricidus*, se seleccionaron los iniciadores OPA 01, 07 y 09, mientras que para la especie *M. luteum* se escogieron los iniciadores OPA 08, 11 y 13. El Cuadro 10 muestra la cantidad de fragmentos de diferente tamaño que fueron amplificados con cada uno de los 20 imprimadores probados en ambas especies de áfidos.

**Cuadro 10.** Iniciadores Operon de la serie A (OPA) probados y la cantidad total de bandas amplificadas con cada iniciador en las dos especies de áfidos utilizadas.

Iniciador	Total de bandas observadas con	
	<i>T. citricidus</i>	<i>M. luteum</i>
OPA-01 <sup>T</sup>	1	3
OPA-02	0	0
OPA-03	2	1
OPA-04	5	7
OPA-05	2	3
OPA-06	0	0
OPA-07 <sup>T</sup>	2	5
OPA-08 <sup>M</sup>	3	2
OPA-09 <sup>T</sup>	4	8
OPA-10	5	5
OPA-11 <sup>M</sup>	1	2
OPA-12	5	3
OPA-13 <sup>M</sup>	2	2
OPA-14	1	0
OPA-15	2	2
OPA-16	1	1
OPA-17	1	2
OPA-18	4	5
OPA-19	0	0
OPA-20	0	0

<sup>T</sup> Iniciadores seleccionados para el análisis de MS-RAPD de la especie *T. citricidus*

<sup>M</sup> Iniciadores seleccionados para el análisis de MS-RAPD de la especie *M. luteum*

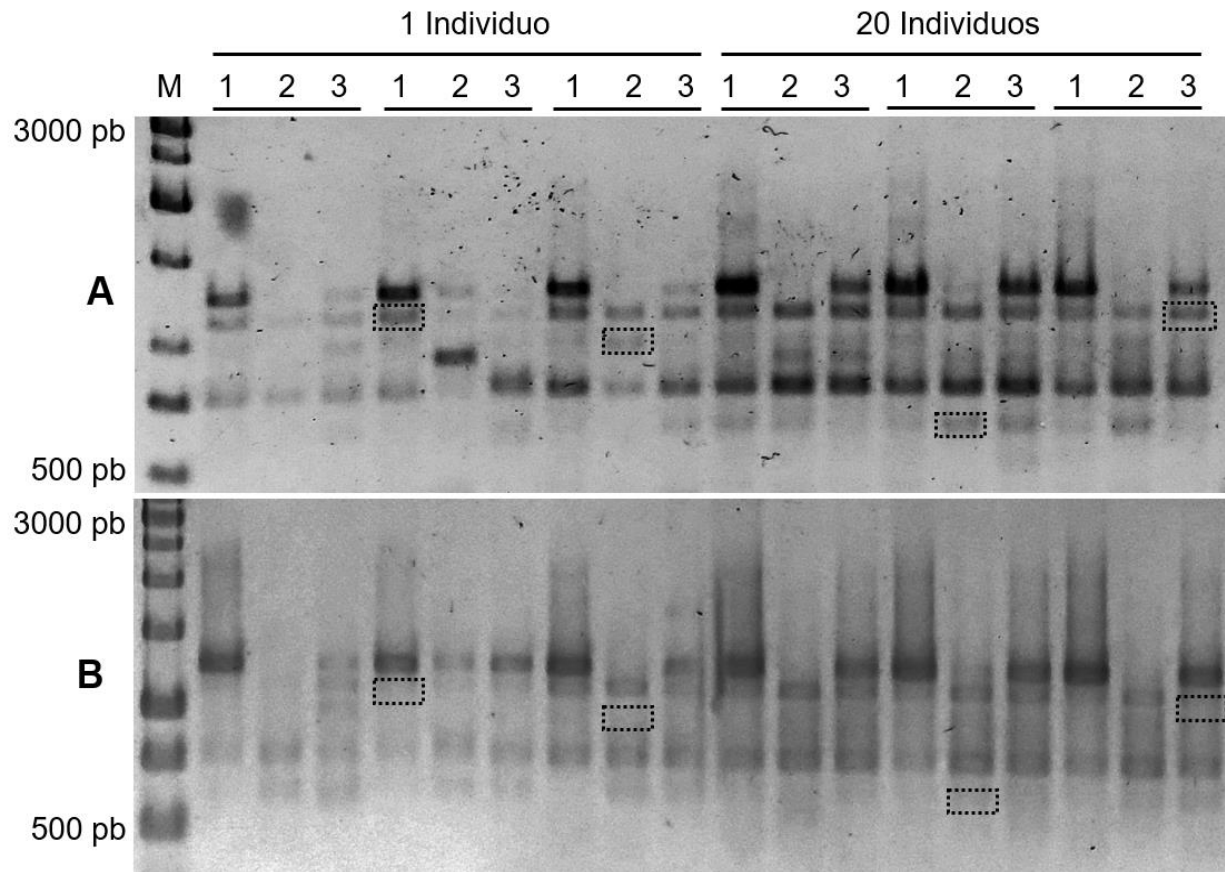


Una vez seleccionados tres iniciadores por especie de áfido, se evaluó la metodología de MS-RAPD en seis muestras por especie, tres de un solo individuo y tres de 20 individuos. Se realizó el procedimiento de MS-RAPD y se estimó la proporción de regiones completamente metiladas, hemimetiladas, con metilación en las citosinas internas y la proporción de regiones sin metilar para la especie *T. citricidus* y para *M. luteum*. Los resultados que se obtuvieron se muestran en el cuadro 11. Al comparar el estado de metilación entre individuos/muestras de la misma especie, no se encontraron diferencias significativas ni en *M. luteum* ( $F = 0,333$ ;  $P = 0,097$ ) ni en *T. citricidus* ( $F = 0,261$ ;  $P = 0,800$ ).

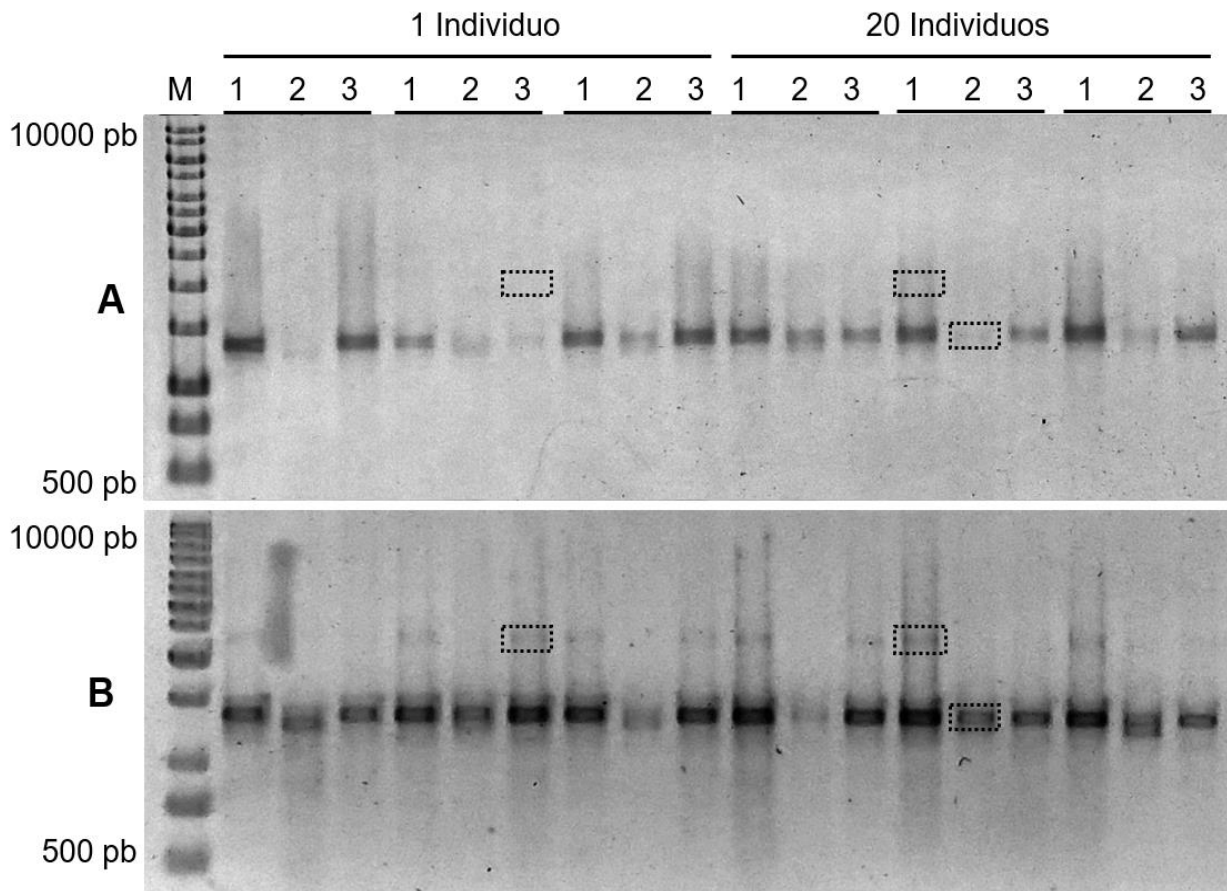
**Cuadro 11.** Estimación del estado de metilación global de individuos adultos de las especies de áfidos *M. luteum* y *T. citricidus*

Espece	Shannon	Sitios de restricción	Completamente metilado HPA+/MSP+	Metilación en citosinas internas HPA+/MSP-	Hemimetilado HPA-/MSP+	Sin metilar HPA-/MSP-
<i>T. citricidus</i>	0,556 (±0,100)	12	0,216	0,168	0,183	0,433
<i>M. luteum</i>	0,580 (±0,110)	12	0,167	0,309	0,048	0,476

Se observó que la concentración de ADN y la cantidad de individuos por muestra no influyen en el resultado del análisis de metilación mediante la técnica de MS-RAPD, ya que tanto en muestras de ADN obtenidas a partir de un individuo, así como las muestras obtenidas a partir de 20 individuos, esta técnica permitió obtener patrones de metilación de dichas muestras. Además, se observaron leves discrepancias entre las dos réplicas de MS-RAPD realizadas, en donde presentaron algunas bandas solamente en una de las dos réplicas (Figs. 13 y 14).



**Figura 13.** Dos réplicas (A y B) del análisis de MS-RAPD realizado con tres muestras de un individuo y tres muestras de 20 individuos de la especie *M. luteum* utilizando el iniciador OPA 08. En cada trio, el carril identificado como 1 corresponde a la muestra sin digerir, los carriles 2 y 3 corresponden a las digestiones con la enzima *Msp* I y *Hpa* II, respectivamente. Los cuadros señalan algunas de las inconsistencias observadas entre ambas réplicas, en A se resaltan todas las bandas presentes en la primera réplica que no se encontraron en la segunda réplica (B). M: Marcador molecular de 1 Kb (SM 0313, Fermentas).



**Figura 14.** Dos réplicas (A y B) del análisis de MS-RAPD realizado con tres muestras de un individuo y tres muestras de 20 individuos de la especie *T. citricidus* utilizando el iniciador OPA 01. En cada trio, el carril identificado como 1 corresponde a la muestra sin digerir, los carriles 2 y 3 corresponden a las digestiones con la enzima *Msp* I y *Hpa* II, respectivamente. Los cuadros señalan algunas de las inconsistencias observadas entre ambas réplicas, en A se resaltan todas las bandas presentes en la primera réplica que no se encontraron en la segunda réplica (B). M: Marcador molecular de 1 Kb (SM 0313, Fermentas).

#### 7.4 Comparación del nivel de metilación y endosimbiontes de áfidos de diferentes estadios

Al comparar el estado de metilación global de individuos pertenecientes a diferentes estadios de la especie *T. citricidus*, se encontró que éstos no poseen diferencias en el nivel de metilación. No se encontraron diferencias en la cantidad de

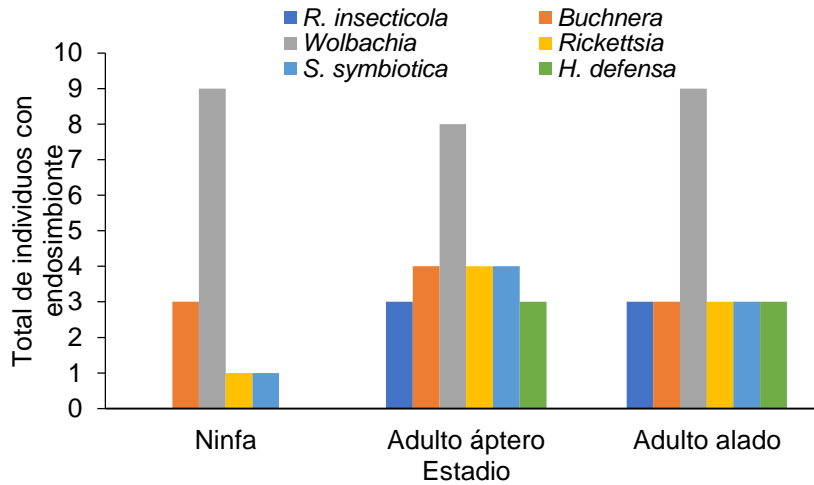
regiones completamente metiladas ( $F = 0,535$ ;  $P = 0,592$ ), en las regiones con metilación en las citosinas internas ( $F = 0,448$ ;  $P = 0,643$ ), en las regiones hemimetiladas ( $F = 0,048$ ;  $P = 0,953$ ), ni en las regiones sin metilar ( $F = 0,933$ ;  $P = 0,407$ ). En el Cuadro 12 se muestra la proporción de regiones en cada una de estas categorías que fueron encontradas en ninfas, adultos ápteros y adultos alados de la especie *T. citricidus*. Al realizar la misma comparación con individuos de distintos estadios de la especie *M. luteum*, al igual que en el caso de *T. citricidus*, no se encontraron diferencias en la cantidad de regiones completamente metiladas ( $F = 0,676$ ;  $P = 0,518$ ), en las regiones con metilación en citosinas internas ( $F = 1,698$ ;  $P = 0,204$ ), en las regiones hemimetiladas ( $F = 1,423$ ;  $P = 0,260$ ) ni en las regiones sin metilar ( $F = 0,459$ ;  $P = 0,637$ ) de individuos de estadios distintos (Cuadro 12).

**Cuadro 12.** Comparación de la metilación estimada entre estadios de las especies *Toxoptera citricidus* y *M. luteum*.

	Estadio	Completamente metilado Hpa+/Msp+	Metilación en citosinas internas Hpa+/Msp-	Hemimetilado Hpa-/Msp+	Sin metilar Hpa-/Msp-
<i>T. citricidus</i>	Ninfas	0,50	0,17	0,11	0,22
	Ápteros	0,42	0,28	0,11	0,19
	Alados	0,56	0,22	0,08	0,14
<i>M. luteum</i>	Ninfas	0,22	0,33	0,04	0,41
	Ápteros	0,33	0,11	0,11	0,45
	Alados	0,26	0,15	0,26	0,33

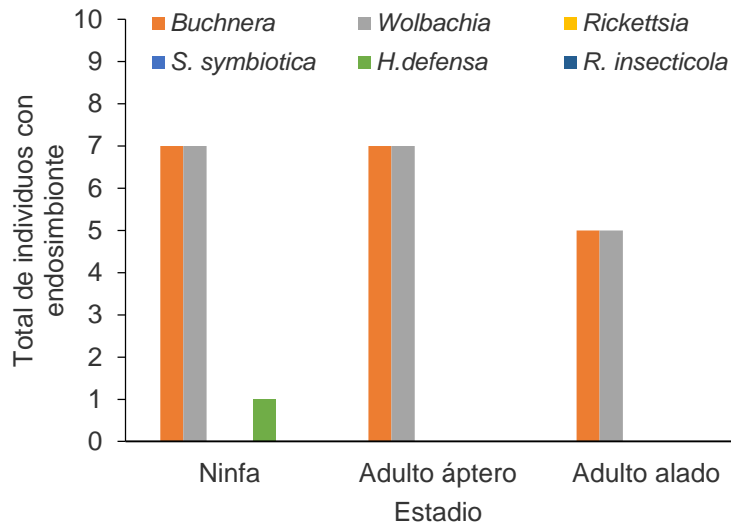
Al realizar la determinación de endosimbiontes en muestras de *T. citricidus*, se encontraron diferencias entre las especies de bacterias endosimbiontes encontradas en muestras de diferentes estadios. Las bacterias *Buchnera*, *Wolbachia*, *Rickettsia* y *Serratia symbiotica* se encontraron en todos los estadios (ninfas, adultos alados y

ápteros), pero por el contrario, las especies *Hamiltonella defensa* y *Regiella insecticola* solamente se encontraron en adultos alados y ápteros (Fig. 15).



**Figura 15.** Total de individuos de *T. citricidus* de distintos estadios en los que se detectó la presencia de diferentes especies de bacterias endosimbiontes. Cada color representa una especie de endosimbionte.

Al realizar esta misma comparación de los simbiositos presentes en individuos de la especie *M. luteum*, las bacterias *Buchnera* y *Wolbachia* se detectaron en individuos de los tres estadios, igual a lo observado en la especie *T. citricidus*. También se detectó la especie *H. defensa* únicamente en una ninfa (Fig. 16) y a diferencia de *T. citricidus* en *M. luteum* no se logró detectar la presencia de *S. symbiotica*, *Rickettsia* sp. ni *R. insecticola*.



**Figura 16.** Total de individuos de *M. luteum* de distintos estadios en los que se determinó la presencia de diferentes especies de bacterias endosimbiontes. Cada color representa una especie de simbiote.

### 7.5 Comparación del nivel de metilación y endosimbiontes de áfidos colectados en diferentes semanas

En ambas especies de áfidos se encontraron diferencias en el grado de metilación que presentaron los individuos colectados en diferentes fechas (Cuadro 13). Al hacer comparaciones pareadas del grado de metilación detectado en individuos colectados en semanas diferentes, en el caso de *T. citricidus*, se encontraron diferencias en la proporción de regiones sin metilar de los individuos colectados en las semanas I<sub>TC</sub> (04/12/2015) y II<sub>TC</sub> (07/01/2016) y entre los individuos colectados en las semanas II<sub>TC</sub> (07/01/2016) y III<sub>TC</sub> (01/04/2016). Además, se encontró que el promedio de temperatura y humedad ambiental registradas durante esas semanas (II y III) de muestreo fueron significativamente distintas (Cuadro 14). En el caso de la especie *M. luteum* también se encontraron diferencias entre el grado de metilación detectado en individuos colectados de las semanas I<sub>ML</sub> (07/01/2016) y II<sub>ML</sub> (03/03/2016) y entre los individuos de las semanas I<sub>ML</sub> (07/01/2016) y III<sub>ML</sub> (01/04/2016). En ambos casos las diferencias se encontraron en la proporción de

regiones completamente metiladas y en la proporción de regiones hemimetiladas. Se encontraron diferencias significativas entre las condiciones de temperatura y humedad promedio registradas durante las semanas I<sub>ML</sub> y III<sub>ML</sub> (Cuadro 14).

**Cuadro 13.** Comparación del estado de metilación de individuos de *T. citricidus* y *M. luteum* colectados en tres diferentes fechas con diferentes condiciones climáticas.

	Semana	Temperatura promedio (°C)	Promedio de Humedad relativa	Completamente metilado Hpa+/Msp+	Metilación en citosinas internas Hpa+/Msp-	Hemimetilado Hpa-/Msp+	Sin metilar Hpa-/Msp-
<i>T. citricidus</i>	I <sub>TC</sub>	21.6 a	81.4 a	0.39 a	0.36 a	0.11 a	0.14 a
	II <sub>TC</sub>	21.5 a	79.6 a	0.56 a	0.14 a	0.03 a	0.28 b
	III <sub>TC</sub>	23.7 b	75.1 b	0.53 a	0.17 a	0.17 a	0.14 a
<i>M. luteum</i>	I <sub>ML</sub>	21.5 a	79.6 a	0.25 a	0.14 a	0.25 a	0.36 a
	II <sub>ML</sub>	21.2 a	76.7 b	0.58 b	0.08 a	0.06 b	0.28 a
	III <sub>ML</sub>	23.7 b	75.1 b	0.50 b	0.22 a	0.02 b	0.25 a

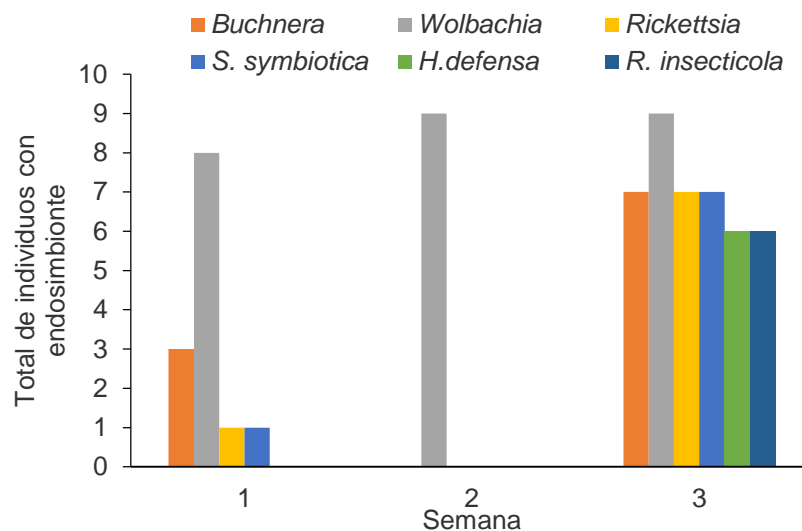
Las letras a y b denotan las similitudes y/o diferencias entre los valores de metilación, temperatura y humedad obtenidas en las diferentes semanas de muestreo

**Cuadro 14.** Probabilidad asociada a las comparaciones pareadas (Wilcoxon) del estado de metilación de individuos de *T. citricidus* y *M. luteum* colectados en semanas diferentes.

	Semanas	Completamente metilado	Metilación en citosinas internas	Hemimetilado	Sin metilar	Temperatura promedio	Humedad promedio
<i>T. citricidus</i>	I vs II	0,9998	0,1236	1,00	<b>0,0497*</b>	0,1493	0,3757
	II vs III	0,4561	0,9647	0,4484	<b>0,0497*</b>	<b>0,0014*</b>	<b>0,0431*</b>
	I vs III	0,4456	0,1950	0,4536	1,00	<b>0,0120*</b>	0,3436
<i>M. luteum</i>	I vs II	<b>0,0001*</b>	0,8432	<b>0,0496*</b>	0,6106	0,4941	0,1559
	II vs III	0,2326	0,3589	0,9322	0,9456	<b>0,0014*</b>	0,7103
	I vs III	<b>0,0012*</b>	0,6839	<b>0,0227*</b>	0,4222	<b>0,0045*</b>	<b>0,0431*</b>

\* En negrita se muestran las probabilidades significativas según un criterio de  $P \leq 0.05$ .

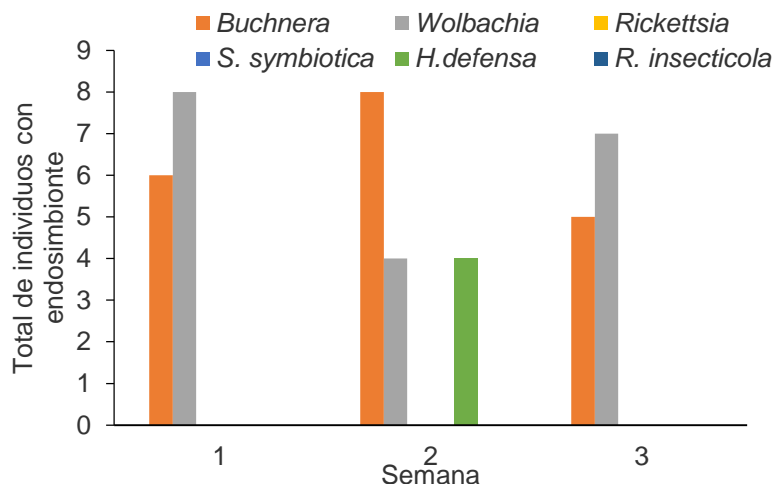
Al comparar los endosimbiontes detectados en las muestras de áfidos según la fecha en la que fueron colectadas, se observó que en la semana II de muestreo *Wolbachia* fue el único endosimbionte detectado y esta especie fue la única que se encontró en las tres semanas de muestreo. Mientras que en la semana III fue en la que se encontró un mayor número de especies endosimbiontes (seis especies) (Fig. 17). Las diferencias en las especies de endosimbiontes detectadas en los áfidos, en este estudio, parecen estar más relacionadas con la fecha de colecta que con el estadio del hospedero en el caso de la especie *T. citricidus*.



**Figura 17.** Total de individuos de *T. citricidus* (colectados en tres semanas distintas) en los que se determinó la presencia de diferentes especies de bacterias endosimbiontes. Cada color representa una especie de endosimbionte.

En la especie *M. luteum*, al agrupar los resultados según la fecha de colecta, se observó el mismo comportamiento para *Buchnera* y *Wolbachia* entre las tres semanas y *H. defensa* solo fue detectada en la semana II (Fig. 18). En el caso de esta especie debido a las pocas detecciones no se puede determinar si existe un patrón asociado a la semana de colecta de los áfidos.





**Figura 18.** Total de individuos de *M. luteum* (colectados en tres semanas distintas) en los que se determinó la presencia de diferentes especies de bacterias endosimbiontes. Cada color representa una especie de simbiote.

## 8. DISCUSIÓN

### 8.1 Bioensayos

Según los resultados obtenidos, tanto en individuos de la especie *M. luteum* así como de la especie *T. citricidus* ocurre un incremento en la mortalidad al someterlos a temperaturas de 28°C (Figs. 4-7). Esto concuerda con resultados obtenidos por Komazaki (1982) y por Díaz & Fereres (2005) quienes encontraron también que la mortalidad más elevada ocurrió a una temperatura de 28° C, según bioensayos realizados con diferentes especies de áfidos, entre ellas *T. citricidus*.

El incremento en la mortalidad que experimentan los áfidos al ser sometidos a cambios en la temperatura ambiental se debe a que éstos no son capaces de regular su temperatura corporal (Wennergren & Landin, 1993; Neven, 2000; Russell & Moran, 2006; Nguyen *et al.*, 2009). El calor les ocasiona perturbaciones mitocondriales, puede ocasionar desnaturalización de las proteínas, afectar el sistema nervioso y endocrino, producir pérdida de bacterias endosimbiontes

primarias, entre otras afectaciones, que pueden llevar finalmente a la muerte del organismo (Nguyen *et al.*, 2009). Se ha documentado también en los áfidos que los incrementos de temperatura ambiental pueden afectar la composición de su cutícula, haciéndolos más propensos a sufrir deshidratación e incrementar su mortalidad (Nguyen *et al.*, 2009). No obstante, los áfidos son capaces de adaptarse y resistir ligeros cambios en las condiciones ambientales (Neven, 2000).

Por el contrario, se observó una disminución de la mortalidad en ambas especies de áfidos al exponerlas a una temperatura de 4° C (Figs. 4-7). Esa misma tendencia fue descrita en estudios previos en la especie *T. citricidus* (Komazaki, 1982; Díaz & Fereres, 2005). A temperaturas más bajas se da una reducción en el metabolismo, un retraso en el ciclo reproductivo y hace que el tiempo de desarrollo de los áfidos sea mayor, ocasionando una disminución en la mortalidad, contrario a lo que se observa a temperaturas ambientales más elevadas (Ebert & Cartwright, 1997).

En este estudio se observó reproducción en la especie *M. luteum* en el grupo control (25°C) y a 28°C (Fig. 4). En el caso de *T. citricidus*, en ningún tratamiento ocurrió reproducción (Fig. 6). Lo cuál difiere de lo observado por estudios previos, que han encontrado que la especie *T. citricidus* alcanza su máxima tasa de reproducción y crecimiento poblacional a una temperatura cercana a los 27°C debido a que es una especie adaptada a temperaturas altas (Komazaki, 1982). Bajo las condiciones de laboratorio en las que fue estudiada esta especie, es probable que la temperatura a la cuál alcanza la tasa máxima de reproducción sea menor a 27 °C, ya que los ámbitos de temperatura reportados en la literatura pueden variar dependiendo de la especie de la planta hospedera (Komazaki, 1982). En el caso mencionado, las observaciones fueron realizadas sobre *Citrus unshiu* y *C. aurantium* (Komazaki, 1982). Este comportamiento en el que la tasa reproductiva disminuye cercano a los 29° C se ha observado también en otras especies de áfidos como *Aphis citricola*, *A. gossypii* y *Macrosiphum euphorbiae* (Komazaki, 1982).

## 8.2. Detección de Endosimbiontes

Se encontró que la mayoría de las muestras analizadas poseían simbiosis con la bacteria *Buchnera aphidicola* (83,7 %) (Cuadro 6), lo que concuerda con lo esperado ya que esta bacteria es el endosimbionte obligatorio y está presente en todas las especies de áfidos proporcionándoles aminoácidos y vitaminas esenciales (Sabater-Munoz *et al.*, 2001; Koga *et al.*, 2003). Sin embargo, en un 16,3% de las muestras analizadas, no se logró detectar la presencia de *Buchnera* (Cuadro 6). La causa más probable de la falta de detección de *Buchnera* en algunas de las muestras, puede deberse a que el método de detección mediante PCR tradicional y Multiplex no sea siempre capaz de determinar la presencia de esta especie. Estudios previos han encontrado que la detección de bacterias mediante PCR Multiplex puede verse afectada por la presencia de otras especies de bacterias que se encuentran en mayor concentración (Mason *et al.*, 2001). Por lo cual es probable que *Buchnera* esté presente en concentraciones tan pequeñas que en algunos casos fue imposible detectarla mediante las técnicas empleadas.

Se encontraron diferencias entre los resultados obtenidos mediante ambos métodos de detección. En el caso del PCR tradicional permitió detectar esta especie en 37 de las 49 muestras analizadas, mientras que con el PCR Multiplex solamente se logró detectar en 23 de las muestras. La detección por ambos métodos solamente fue consistente en 18 muestras (Anexo 2). Estos resultados sugieren que el PCR tradicional fué más eficiente en la detección de esta bacteria, aún cuando sus concentraciones sean bajas ya que es un PCR específico para una sola especie de bacteria, a diferencia del PCR Multiplex en donde se tienen varios iniciadores simultáneamente, lo cuál hace que el porcentaje de éxito de esta técnica sea menor. Sin embargo, las diferencias observadas indican que probablemente aún cuando se empleen ambos métodos para realizar la detección de *Buchnera* sp., se puede estar subestimando su presencia en las muestras analizadas.

Es poco frecuente que *Buchnera* esté ausente en áfidos, sin embargo se ha visto que es posible que la simbiosis se pierda bajo condiciones específicas (Douglas, 1998). Un ejemplo de ello es la competición de ciertas especies de

bacterias facultativas por los recursos del áfido. En dicha competición es probable que los simbioses facultativos lleguen a reemplazar completamente a *Buchnera* (Gómez-Valero *et al.*, 2004). Tal es el caso del endosimbionte facultativo *Rickettsia*, el cual se ha visto que disminuye las poblaciones de *Buchnera* tras competir con esta por los recursos limitados, energía y nicho endocelular (Sakurai *et al.*,2005). Otro ejemplo es la especie *Serratia symbiotica* que es capaz de reemplazar a *Buchnera aphidicola* y PAXS (Sakurai *et al.*,2005; Lamelas *et al.*, 2008). Pese a que ésta es una de las principales causas de la ausencia de *Buchnera*, no fué lo que ocurrió en este caso, ya que en las muestras en las que no se detectó *Buchnera* tampoco se detectó ninguna otra especie de endosimbionte, debido a lo cual no se puede asegurar de que se trate de una competición entre especies de simbioses.

Cuando un áfido pierde el endosimbionte *Buchnera*, puede sufrir un retraso en su crecimiento, esterilidad o muerte. La asociación con endosimbioses facultativas pueden compensar las funciones de *Buchnera* sp. y son capaces de ocupar su nicho simbiótico (Koga *et al.*, 2003). Sin embargo, lo más común es encontrar al endosimbionte *Buchnera* sp. coexistiendo con otras especies de simbioses facultativas (Augustinos *et al.*,2011) como se observó en 45 % de las muestras analizadas (que representan un 57,1 % de todas las especies de áfidos analizadas) en esta investigación (Cuadro 6).

El segundo endosimbionte que se detectó en mayor proporción en las muestras analizadas fue *Wolbachia* sp. Se encontró en el 28,6% de las muestras (Cuadro 6), esto comprende ocho de las 21 especies de áfidos analizadas (*Aphis craccivora*, *A. sambuci*, *Macrosiphum rosae*, *M. salviae* *Neophyllaphis varicolor*, *Picturaphis pojanii*, *Sitobion avenae* y *Toxoptera citricidus*). Existen pocos estudios sobre la presencia de *Wolbachia* en áfidos. El primer reporte de este endosimbionte fue en las especies *T. citricidus* y *A. craccivora* (Augustinos *et al.*, 2011), esto concuerda con lo observado en esta investigación, en donde también se detectó la especie *Wolbachia* sp. en esas dos especies de áfidos (Cuadro 6). Otros estudios han detectado la presencia de *Wolbachia* en *Aphis nerii*, *Toxoptera auranti*, *Cavariella* sp., *Neophyllaphis podocarp*, en *Sitobion avenae* y *S. miscanthi* y han reportado la ausencia de *Wolbachia* en

*Acyrtosiphon pisum* (Tsuchida *et al.*, 2002; Augustinos *et al.*, 2011). Se ha observado que la prevalencia de las infecciones con *Wolbachia* varían mucho entre las diferentes poblaciones de áfidos (Augustinos *et al.*, 2011). Aparentemente, debido a que existen ciertas familias de áfidos que son más propensas que otras a ser infectadas por *Wolbachia* (Augustinos *et al.*, 2011). Esta investigación, pionera en este campo en Costa Rica, evidencia nuevas asociaciones áfido- endosimbionte, previamente no informadas, en el caso de *Wolbachia* con las especies de áfidos *Aphis sambuci*, *M. salviae*, *Neophyllaphis varicolor* y *Picturaphis pojanii*. Además se encontró por primera vez simbiosis entre *Greenidea psidii* y *S. symbiotica*, *Picturaphis pojanii* y *H. defensa* y *Cavariella aegopodii* con *R. isecticola*.

También se detectó al endosimbionte *Serratia symbiotica* entre las muestras analizadas, en seis especies: *A. gossypii*, *G. psidii*, *M. rosae*, *S. avenae*, *T. aurantii* y *T. citricidus*; las cuales comprenden el 30 % del total de especies de áfidos analizadas (Cuadro 6). Sin embargo este simbiote se ha reportado principalmente en las especies *Acyrtosiphon pisum*, *Aphis craccivora*, *A. fabae*, *Cinara cedri* y al igual que en esta investigación, en *Sitobion avenae*, (Tsuchida *et al.*, 2006; Lamelas *et al.* 2008; Chen *et al.*, 2009; Najjar-Rodríguez *et al.*, 2009; Łukasik *et al.*, 2013). Se ha visto que *S. symbiotica* tiene un papel biológico muy importante y es capaz de proteger a los áfidos contra el estrés causado por variaciones de temperatura, incluso se ha sugerido que pueden proteger a sus hospederos de los parasitoides (Montllor *et al.*, 2002; Guay *et al.*, 2009; Brady *et al.*, 2014).

Por otra parte, los endosimbiontes *Hamiltonella defensa*, *Regiella insecticola* y *Rickettsia* sp. se encontraron en una menor frecuencia en las muestras analizadas. Se ha comprobado que tanto *H. defensa* así como *R. insecticola* le confieren a los áfidos resistencia a hongos entomopatógenos y contra parasitismo de avispa. Los áfidos complementan su sistema inmune innato con los mecanismos de defensa de sus bacterias endosimbiontes (Nyholm & Graf, 2012). En el caso de *Rickettsia*, esta se ha visto que influye en el éxito reproductivo, adaptación, el tamaño del cuerpo y la fecundidad de sus áfidos hospederos; efectos que pueden ser incrementados por factores ambientales como la temperatura (Sakurai *et al.*, 2005). También se ha

asociado con protección contra hongos patógenos de sus hospederos (Brady *et al.*, 2014).

En la mayoría de las muestras de especies de áfidos estudiadas solamente se logró la detección de una especie de endosimbionte y solamente a un 2% (una especie de áfido) de las muestras se les detectó cuatro endosimbiontes (Cuadro 7). Sin embargo, como nuestro análisis se realizó como una primera prospección de los endosimbiontes en colonias de cada especie de áfido en estudio (muestra compuesta por 20 individuos) se desconoce si un mismo individuo porta las cuatro especies de endosimbiontes. La tendencia que la mayoría de las muestras analizadas presenten un único endosimbionte concuerda con lo encontrado por estudios previos en donde se ha visto que lo normal es que los áfidos hospeden entre una y dos especies de simbiosis (Zytynska *et al.*, 2016). Tener múltiples infecciones puede beneficiar a los áfidos incrementando su resistencia y adaptación, pero eso implica un mayor costo nutricional y energético para ellos (Oliver *et al.*, 2014). Además, se ha visto que dentro de las poblaciones de endosimbiontes que habitan un mismo hospedero pueden darse interacciones positivas y negativas que determinan el número máximo de posibles endosimbiontes que un hospedero pueda tener (Zytynska *et al.*, 2016).

Las diferencias entre las poblaciones de bacterias endosimbiontes observadas en las muestras de áfidos analizadas pueden deberse a la localización geográfica, a factores ambientales o a la diversidad de plantas de las que se alimenta su hospedero, ya que se ha observado que estas variables pueden influir en las poblaciones de bacterias simbiosis que habitan en los áfidos (Thomas & Blanford, 2003; Zhao *et al.*, 2016; Zytynska *et al.*, 2016). Además, se sabe también que las poblaciones de bacterias asociadas a áfidos pueden variar dependiendo del sexo, del genotipo y de la dieta del áfido hospedero (Zhao *et al.*, 2016).

En general, las comunidades bacterianas de las especies de áfidos todavía han sido muy poco estudiadas (Zhao *et al.*, 2016). Hay especies como, por ejemplo, *Aphis gossypii*, en las que hay reportadas muchas especies de endosimbiontes, esto puede deberse a que esta especie es una de las más estudiadas en comparación

con otras especies en las que no se han reportado endosimbiontes (Brady *et al.*, 2014). Brady *et al.* (2014) sugieren que la cantidad de endosimbiontes que se encuentren en una especie de áfido depende del esfuerzo de muestreo. En este trabajo se analizó de una a tres colonias de cada especie de áfidos (Cuadro 5), por lo tanto, se requiere mayor número de colonias para tener un mejor estimado de las especies de endosimbiontes que podrían asociarse en el país a una especie de áfido en particular.

Se encontraron diferencias entre los endosimbiontes detectados entre las dos muestras de cada especie de áfidos de una misma colonia. Lo cual sugiere que la técnica del PCR multiplex empleada en algunos casos falló en la detección de la totalidad de bacterias endosimbiontes presentes en cada muestra. Al tratarse de muestras de la misma especie de áfido y misma colonia obtenidas en el mismo momento se descarta la posibilidad de que sus endosimbiontes difieran, ya que los simbiontes obligatorios se heredan verticalmente, es decir de la madre a su progenie, mientras que los endosimbiontes facultativos se pueden heredar tanto vertical como horizontalmente de un hospedero a otro. Se esperaría que áfidos de una misma colonia posean las mismas especies de bacterias endosimbiontes (Gómez-Valero *et al.*, 2004; Lamelas *et al.*, 2008; Oliver *et al.*, 2010; Zhao *et al.*, 2016). Se ha determinado que la transmisión maternal de bacterias endosimbiontes en colonias en condiciones de laboratorio es cercana al 100% (Oliver *et al.*, 2010). Además de una posible limitación de la técnica empleada, la diferencia puede ser explicada también por diferencias en las concentraciones de bacterias endosimbiontes entre las dos muestras analizadas. Como se mencionó previamente, es probable que la detección mediante PCR no sea capaz de realizarse con éxito cuando las concentraciones de bacterias son muy bajas (Mason *et al.*, 2001).

Finalmente, las diferencias observadas entre la identificación morfológica y molecular en el caso de *P. pojarii* y *M. salviae* (Cuadro 8), se debe a que no existen secuencias de ADN de estas especies depositadas en el GenBank, lo que hace imposible corroborar la identidad de estas mediante BLAST. En el caso de *Toxoptera aurantii* y *Aphis gossypii* el porcentaje de similitud con la especie asignada por el

BLAST fue de 92 y 88 % respectivamente, por lo cual se puede concluir que esta identificación no es correcta. Esto se debe a que los fragmentos amplificados no tenían la longitud mínima requerida para realizar taxonomía molecular utilizando la región de la citocromo oxidasa I, la cual debe ser de 658 pb para la identificación de animales (Footit *et al.*, 2008). Por lo que el tamaño de los fragmentos amplificados no fue suficiente (~600 pb) para poder identificar correctamente estas dos especies, como se esperaba, ya que de ambas existen secuencias depositadas en el GenBank.

Se encontraron algunas diferencias en la identificación de bacterias endosimbiontes realizada mediante el PCR multiplex y después de realizar la comprobación amplificando con el iniciador general y el iniciador específico del PCR multiplex (se eligió el iniciador de acuerdo a la bacteria de endosimbionte detectada) y secuenciando el amplicón. Este fue el caso de las muestras de la especie *T. citricidus* TC35, TC28 y TC26, las cuales según el tamaño del amplicón del PCR multiplex poseían a los simbiositos *Rickettsia* (600 pb) y *Serratia symbiotica* (1140 pb), pero al realizar el BLAST con la secuencia del amplicón tuvieron una mayor similitud con el simbiosito *Arsenophonus* sp. (99% de similitud). Las secuencias correspondientes al endosimbionte detectado, además agruparon dentro del mismo clado (Fig.11) que la secuencia de referencia *Arsenophonus* (JN990929.1) obtenida del GenBank. Por lo tanto, a pesar de que el protocolo de PCR empleado no permitía amplificar a la especie *Arsenophonus*, parece que realmente corresponden a esta especie y no a *Rickettsia* o a *Serratia symbiotica* como indicaba el PCR multiplex. Esto puede deberse a que ocurrió una amplificación inespecífica con los iniciadores utilizados.

La región 16S del ARN ribosomal es una de las más utilizadas en la taxonomía molecular de bacterias, sin embargo tiene ciertas limitaciones, ya que estudios previos han encontrado que el uso de la región 16S del ARNr está sometido a un margen de error, debido a la presencia de múltiples copias de esta región en el genoma y esto incrementa la probabilidad de que el molde para la amplificación del ADN durante una PCR sea heterogéneo. Cuando el fragmento se amplifica a partir



de un molde heterogéneo, se aumenta la probabilidad de obtener secuencias con quimeras o artefactos de la técnica (Schloss *et al.*, 2011). Por esto surge la necesidad de emplear otras regiones para complementar este tipo de análisis como la región rpoB, 23S y 18S del ARNr bacteriano (Dahllöf *et al.*, 2000; Arneodo & Ortego, 2014).

### **8.3. MS-RAPD**

#### **8.3.1 Estandarización de la técnica.**

No se encontraron diferencias genéticas entre los individuos de la misma colonia para las dos especies de áfidos en estudio usando la técnica MS-RAPD (Cuadro 11), tal como es de esperar, debido a que son colonias clonales establecidas a partir de un único individuo. Esto se determinó ya que no se observaron diferencias en los patrones de bandas obtenidos con la amplificación aleatoria (RAPD) utilizando ADN genómico (sin digerir) de muestras de una misma colonia y especie (Anexo 4). Con esta comprobación, se redujo la posibilidad de que en las secuencias de ADN de estos individuos existieran mutaciones que ocasionaran variabilidad genética entre las muestras de una misma especie. Pese a que erróneamente se cree que los áfidos de una misma colonia son genéticamente muy homogéneos, existe evidencia de que en los áfidos originados mediante reproducción asexual, frecuentemente ocurren inserciones, repeticiones o transposiciones que introducen variabilidad adaptativa a su genoma (Delmotte *et al.*, 2003; Lushai *et al.*, 2003; Wilson *et al.*, 2003; Loxdale, 2008).

Es indispensable comprobar que no se detecte variación genética entre las muestras que se utilizan con la técnica de MS-RAPD, ya que estudios previos han reportado que la presencia de mutaciones puede modificar los sitios de restricción e impedir la amplificación, ocasionando variaciones en la cantidad y el tamaño de los fragmentos obtenidos con este tipo de análisis (Salmón *et al.*, 2008). Además, al comprobar que no detecte variación genética entre muestras de una misma especie se garantiza que cualquier variación en el patrón de amplicones obtenidos sea

producto de diferencias en el estado de metilación de las muestras y no a variaciones en la secuencia de ADN.

Con el análisis de MS-RAPD, no se encontraron diferencias en el grado de metilación entre individuos de una misma especie y estadio (Cuadro 12). La metilación del ADN les permite a los áfidos adaptarse a cambios en el fotoperiodo, hospederos, pesticidas y sobrevivir a cambios climáticos (Loxdale & Lushai, 2003; Lushai *et al.*, 2003; Molinier *et al.*, 2006; Loxdale, 2008; Flores *et al.*, 2013; Pasquier *et al.*, 2014). Varios estudios han informado que el estado de metilación puede variar en respuesta a la dieta o al crecimiento y desarrollo del organismo (Flores *et al.*, 2013; Fulneček & Kovařík, 2014; Pasquier *et al.*, 2014). Por lo cual si las condiciones de los áfidos monoclonales fueron las mismas, no se esperaría que exista diferencia en su estado de metilación. Dado que éstos individuos se originaron a partir de una sola hembra partenogénica, correspondían a un mismo instar y se desarrollaron en el mismo entorno con condiciones ambientales idénticas.

No se observaron bajo nuestras condiciones diferencias en los resultados de MS-RAPD con muestras con diferente concentración de ADN provenientes de uno o 20 áfidos (Anexo 4). Se concluyó por lo tanto, que con la cantidad (en promedio 10 ng/ $\mu$ l) de ADN de un solo áfido es suficiente para evaluar variaciones de metilación. Esto concuerda con que la técnica de MS-RAPD se basa en la amplificación mediante PCR, el cual es un método muy sensible capaz de amplificar el ADN aunque solamente se cuente con una copia única de este.

Las diferencias de las bandas observadas en ambas réplicas, pueden ser producto de una digestión incompleta ocasionada por causas ajenas a la metilación, lo cual puede originar resultados con falsos positivos (Laird, 2010). Se ha reportado también que en algunos casos el corte de las enzimas *Msp* I y *Hpa* II pueden ser inconsistentes (Fulneček & Kovařík, 2014). Debido a esto, es recomendable realizar varias réplicas para garantizar la repetibilidad del análisis y considerar solamente aquellas bandas que sean consistentes en todas las réplicas, tal y como se realizó en este caso (Figuras 13 y 14).

### **8.3.2 Comparación de estado de metilación global y endosimbiontes de áfidos.**

Se encontró que en *T. citricidus* y *M. luteum*, la proporción de regiones completamente metiladas ronda el 20% aproximadamente (Cuadro 11); lo que concuerda con lo esperado, ya que estudios previos ha encontrado que los áfidos poseen una baja proporción de regiones hipermetiladas (Field *et al.*, 2004). No se encontraron diferencias en el nivel de metilación de individuos de estadios diferentes. La hipótesis inicial en este caso fue que existieran diferencias entre estadios, debido a que los patrones de metilación varían durante el crecimiento y desarrollo de los organismos (Srinivasan & Brisson, 2012). Sin embargo, también se debe considerar que en la transición de un estadio a otro algunas regiones pueden experimentar cambios de metilación y otras regiones no depende exclusivamente de regulaciones epigenéticas como la metilación de ADN, sino que en esta transición se encuentran involucrados otros factores, como por ejemplo, la acción de la hormona juvenil (JH) (Ogawa & Miura, 2014).

Otro aspecto a considerar es que en algunos insectos como *Tribolium castaneum* (Coleoptera) se ha observado que durante la transición de un estadio a otro, algunos genes se metilan mientras que otros se demetilan simultáneamente. Así, el nivel de metilación global se mantiene constante, debido a la compensación entre la metilación y demetilación de los genes del organismo (Feliciello *et al.*, 2013). En este caso no se puede descartar la posibilidad de que en la transición de un estadio a otro esté ocurriendo una compensación de la metilación y demetilación de ciertos genes, ya que la técnica empleada solamente permite estimar el nivel de metilación global y no permite determinar cómo varía la metilación en regiones específicas.

Se encontraron diferencias significativas en el nivel de metilación entre individuos colectados en fechas distintas (Cuadro 13). Estas diferencias pueden deberse al efecto de variaciones de temperatura y humedad ambiental durante los días en que se colectaron los individuos. En ambas especies, *T. citricidus* y *M. luteum* se observó que cuando simultáneamente se presentaron diferencias entre la

temperatura y la humedad ambiental, también se encontraron diferencias en la metilación observada entre individuos colectados en esas mismas fechas; a diferencia de cuando solamente se observaron diferencias en la humedad promedio o solo en la temperatura promedio (Cuadro 14). Se ha observado que los niveles de metilación pueden variar en respuesta a cambios en las condiciones climáticas o por estrés ambiental, debido a que el control epigenético de los genes juega un papel muy importante en procesos de adaptación y aclimatación ante este tipo de estrés (Srinivasan & Brisson, 2012; Correia *et al.*, 2013).

Existen estudios de las variaciones en los niveles de metilación en diferentes organismos como respuesta a factores ambientales. Utilizando la técnica de MS-RAPD encontraron que en el gorgojo castaño de la harina (*Tribolium castaneum*) el estrés ocasionado por el calor ambiental induce demetilación en el ADN (Felicciello *et al.*, 2013). Otros estudios encontraron en plantas de *Quercus suber* que durante periodos de estrés ambiental en estas plantas, la metilación del ADN se comportaba de manera dinámica, en donde simultáneamente ocurrían eventos de metilación y demetilación, lo cuál les permite a estas plantas la aclimatación y supervivencia (Correia *et al.* 2013).

Se observaron diferencias entre la diversidad de endosimbiontes detectados en los individuos colectados en las tres semanas (Figura 17). Se observó que en la especie *T. citricidus*, los individuos colectados en la semana II fueron los que presentaron el menor número de endosimbiontes (solamente 1) y la mayor proporción de regiones sin metilar en comparación con los individuos colectados en las otras semanas. También se encontró que los individuos de *T. citricidus* colectados durante la semana III fueron los que presentaron el mayor número de especies endosimbiontes (un total de seis) y esto coincide con que esta semana fue la que presentó la temperatura más alta y la humedad más baja de todas las semanas de muestreo. Estas diferencias en la diversidad de especies endosimbiontes observada entre semanas puede deberse a que las poblaciones de bacterias endosimbiontes tienden a cambiar conforme varían las condiciones

ambientales, provocando que unas especies se pierdan y/o se sustituyan por otras diferentes (Douglas, 1998).

Con las observaciones realizadas, se puede concluir que tanto los factores ambientales como la temperatura y la humedad, así como la diversidad de endosimbiontes podrían estar influyendo sobre las variaciones de metilación observadas entre áfidos colectados en diferentes semanas. Sin embargo, para determinar el efecto directo de las condiciones ambientales en la metilación de los áfidos, se debe de continuar investigando y experimentando durante largos periodos con el fin de comprender cuanto de la variación en el nivel de metilación puede deberse a los endosimbiontes presentes en los áfidos y cuanto es producto de cambios en las condiciones climáticas. Se deben de continuar estandarizando la técnica para sensar cambios de metilación direccionados al genoma de los áfidos, sin que interfiera la presencia de los endosimbiontes. Ya que se ha visto que la presencia de endosimbiontes o parasitoides puede interferir en los patrones de bandas obtenidos mediante un análisis de MS-RAPD (Mandrioli & Manicardi, 2015).

Este trabajo inició el proceso de prueba y estandarización de la técnica MS-RAPD para que pueda ser empleada para determinar las variaciones de metilación del ADN de los áfidos que ocurren en respuesta a cambios en las condiciones climáticas. En esta investigación se eligió medir el estado de metilación de individuos colectados en semanas diferentes y no los individuos sobrevivientes de los bioensayos, ya que se quería determinar las variaciones de metilación y endosimbiontes realizando comparaciones por semana de colecta y por estadio del individuo. En el caso de los áfidos sobrevivientes a los bioensayos, en su mayoría eran ninfas y no permitían realizar dicha comparación. Según los resultados obtenidos, es factible utilizar el MS-RAPD para determinar el nivel de metilación de áfidos, sin embargo es necesario continuar probando la técnica durante un largo periodo para que permita comprender la correlación que existe entre la metilación del ADN de los áfidos y las condiciones climáticas y que al analizar su estado de metilación se pueda obtener información indirecta de las condiciones ambientales.

A pesar de tener ciertas limitaciones, esta técnica tiene grandes ventajas, entre las cuales destacan: su bajo costo, sencillez, permite analizar varias áreas del genoma simultáneamente, requiere de muy poca cantidad de ADN y no se requiere conocer la secuencia de ADN completa del organismo que se está analizando (Wilson *et al.*, 2003). Además es una técnica rápida, accesible y muy versátil. Esto hace que pueda emplearse en insectos, plantas e incluso en humanos, generando una amplia gama de aplicaciones que van desde estudios de caracterización de los estados de metilación a través del desarrollo hasta análisis de las variaciones de metilación ocasionadas por diferentes tipos de estrés ambiental. Un ejemplo de esto es el estudio de las variaciones de metilación en plantas de algodón producto de estrés por salinidad del suelo (XueLin *et al.*, 2009) y estudios de cambios de metilación en respuesta al estrés ocasionado por patógenos (Li *et al.*, 2011).

En el caso de plantas, se encuentra en voga este tipo de estudios en donde se trata de elucidar las variaciones epigenéticas en respuesta a perturbaciones climáticas. Un ejemplo de esto, es el estudio realizado con la especie *Quercus ilex* utilizando la técnica MSAP, donde encontraron que en plantas expuestas a sequía disminuyó el porcentaje de loci con metilación en las citosinas internas y un incremento en el porcentaje de loci completamente metilados, encontraron diferencias significativas en metilación de plantas sometidas a estrés y las que no. Esto demuestra que los árboles se aclimatan rápidamente a cambios ambientales mediante modificaciones epigenéticas (Rico *et al.*, 2014). Estudios de la metilación global del ADN de *Quercus suber* empleando la técnica de MS-RAPD encontraron que por encima de los 55°C los árboles comienzan a sufrir de estrés por calor ambiental y la metilación del ADN es diferente a la observada en temperaturas de 25, 35 y 45°C (Correia *et al.*, 2013).

Esta técnica tiene muchísimo potencial para estudiar diversas perturbaciones ambientales a través de organismos biosensores, que permitan por ejemplo determinar variaciones en el estado de metilación en respuesta a otros factores de estrés como contaminación con metales pesados, cambios en pH de suelo y fuentes de agua, aumento de residuos de fertilizantes y plaguicidas, contaminación con

solventes, presencia de toxinas, estrés hídrico, monitoreo ecotoxicológico, entre muchas otras aplicaciones. Además de otro tipo de implicaciones ecológicas, como por ejemplo, estudiar la dinámica poblacional y diversidad de áfidos o bien cualquier otro organismo.

Un aspecto importante a considerar es que puede existir una desconexión temporal entre la exposición al estrés y el efecto epigenético. Ciertos agentes causantes de estrés pueden ocasionar variaciones epigenéticas que perduran mucho tiempo después de haber estado expuestas al estrés. Si bien es cierto estudiar las variaciones epigenéticas es un campo prometedor, a la vez es un proceso complejo que depende de muchos factores y que debe entenderse mejor antes de poder utilizarlo para hacer inferencias sobre las condiciones ambientales y los procesos biológicos. Se debe conocer por ejemplo la prevalencia de una marca epigenética después del estrés ambiental para poder correlacionarlas y emitir conclusiones certeras. En algunos organismos las marcas epigenéticas no ocurren al mismo tiempo que la perturbación o el estrés ambiental, sino que el cambio epigenético ocurre mucho tiempo después (Head *et al.*, 2012).

## 9. CONCLUSIONES

La especie *T. citricidus* parece ser más sensible a los incrementos en la temperatura ambiental en comparación con la especie *M. luteum*, debido a que en el tratamiento de temperatura alta fue la especie que presentó un 100% de mortalidad. Por el contrario, se encontró que la temperatura baja (4°C aproximadamente) en ambas especies tiende a disminuir la mortalidad.

Se realizaron las primeras detecciones de bacterias endosimbiontes en áfidos de Costa Rica. El análisis se limitó a los taxones bacterianos que se pueden detectar con los iniciadores empleados (un total de 8). Se encontró la presencia de *Buchnera*, *Wolbachia*, *Serratia symbiotica*, *Rickettsia*, *Hamiltonella defensa* y *Regiella insecticola* y además por amplificación inespecífica se detectó a la especie *Arsenophonus* sp. entre las muestras analizadas. No se detectó a las bacterias

*Spiroplasma* sp., *Rickettsiella* sp. ni PAXS. Cabe resaltar que se detectaron nuevas asociaciones áfido: endosimbionte previamente no informadas a nivel científico. Se encontró por primera vez la asociación de *Wolbachia* con las especies de áfidos *Aphis sambuci*, *M. salviae*, *Neophyllaphis varicolor* y *Picturaphis pojanii*. Además, se detectaron simbiosis entre *Greenidea psidii* y *S. symbiotica*, *Picturaphis pojanii* y *H. defensa* y *Cavariella aegopodii* con *R. isecticola* que tampoco habían sido reportadas previamente.

Al realizar comparaciones de las especies de endosimbiontes presentes en áfidos de diferentes estadios y en áfidos colectados en semanas diferentes se encontró que existe una variación en la presencia o concentración de endosimbiontes en el tiempo o con respecto al estadio del ciclo de vida en las especies de áfidos: *Macrosiphum luteum* y *Toxoptera citricidus*, empleados en este estudio.

Se logró estandarizar un protocolo de MS-RAPD que nunca antes había sido implementado en áfidos y permite estimar la metilación relativa global de estos organismos. En la estandarización de la técnica MS-RAPD se encontró que no todos los iniciadores OPA son útiles para este tipo de análisis. Se observó que casos en donde el iniciador generaba poca cantidad de fragmentos de ADN de diferente tamaño, no eran tan informativos ni útiles para esta técnica como aquellos imprimadores que generaban una mayor cantidad de fragmentos de ADN. Además, no se observaron diferencias en el protocolo al realizarlo con muestras de ADN a partir de uno o de 20 áfidos (con concentraciones de ADN desde 2,3 a 198 ng/ $\mu$ L), ya que fue posible obtener resultados del estado de metilación a partir de muestras de ADN provenientes de un individuo así como en muestras de 20 individuos.

No se encontraron diferencias en el grado de metilación de individuos de diferentes estadios, pero sí se encontraron diferencias en el grado de metilación de individuos colectados en diferentes fechas. Posiblemente, estas diferencias en el nivel de metilación se deban a las condiciones ambientales que se presentaron durante las fechas en las cuales se colectaron los individuos.



Ahora que se logró estandarizar un protocolo de MS-RAPD, este puede ser empleado en el estudio de la metilación de áfidos e incluso otros organismos. La experiencia con esta técnica en plantas demuestra que su uso en la evaluación de cambios de metilación en respuesta al ambiente, es un campo prometedor y puede ser aplicado con éxito también a otros organismos.

## 10. RECOMENDACIONES

Para estudios posteriores en los que se desee detectar bacterias endosimbiontes en áfidos, se recomienda emplear otras regiones del genoma bacteriano como la región 23 S y la región intergénica para confirmar la detección de endosimbiontes adicionalmente a la región 16S que se empleó en este análisis (Arneodo & Ortego, 2014). Especialmente para el endosimbionte *Buchnera* sp., para el cuál en esta tesis se encontraron diferencias entre el resultado obtenido con el PCR convencional y con el PCR multiplex.

Otra alternativa para casos en los que mediante el PCR Multiplex y mediante el PCR convencional no fue posible detectar ningún endosimbionte, complementariamente se podría emplear el PCR en tiempo real (qPCR) para cuantificar la concentración y detectar bacterias endosimbiontes presentes en una muestra de áfido (Dunbar *et al.*, 2007). De esta forma se podrían detectar aquellos endosimbiontes que se encuentran en concentraciones muy bajas y que normalmente es difícil detectarlas mediante las técnicas convencionales. También se puede utilizar la secuenciación de última generación (NGS) para realizar un análisis de metagenómica y de esta forma determinar la identidad de todas las bacterias endosimbiontes presentes en un determinado individuo.

Para el montaje de láminas fijas de áfidos se recomienda utilizar únicamente individuos que hayan sido colectados recientemente o bien, preservados en etanol de 70%. Esto ya que individuos preservados por largos periodos de tiempo o preservados en etanol con una mayor concentración, son más rígidos y quebradizos, dificultando el montaje. Además durante el proceso de clarificación de los

especímenes, se recomienda monitorear los tiempos de exposición al calor, ya que se observó que ciertas especies o estadios son más susceptibles a sufrir daños debido al calor.

Para estudios empleando la técnica de MS-RAPD, se recomienda emplear más de un iniciador, con el fin de que el análisis sea más robusto e informativo. Ya que se observó que cuando se emplean pocos iniciadores el análisis es menos exacto debido a que se detecta menos variabilidad en la cantidad de regiones hemimetiladas, sin metilar, completamente metiladas y con metilación en las citosinas internas. Debido a la metodología de registro y cálculo de proporciones de estados de metilación, la escala se vuelve categórica y pocas categorías, entre menor es el número de bandas potenciales que se generan. Es conveniente siempre elegir aquellos iniciadores que presenten bandas consistentes, definidas y en mayor cantidad.

También, se recomienda medir cambios en el estado de metilación de genes específicos que tengan relación directa con la respuesta al estrés por temperatura o humedad, de forma complementaria a la técnica de MS-RAPD; por ejemplo medir el estado de metilación en los genes de que codifican para proteínas de shock térmico como por ejemplo el gen que codifica para la proteína Hsp70 que está involucrado con la respuesta al estrés por temperatura en Homoptera (Zhao & Jones, 2012).

Para estudiar variaciones en el estado de metilación en respuesta a condiciones ambientales, se recomienda también incluir otras variables ambientales como por ejemplo la radiación ultravioleta, hacinamiento, duración del fotoperiodo y presencia de parasitoides, las cuales se ha visto que influyen en el estado de metilación (Walsh *et al.*, 2010; Correia *et al.*, 2013; Mandrioli & Manicardi, 2015). No obstante, tales estudios requieren equipo especializado para controlar todas esas variables y el análisis de los datos será de mayor complejidad.

Debido a que se sabe que tanto las condiciones climáticas como las especies de endosimbiontes que albergan los áfidos pueden influir en el estado de metilación de éstos, es necesario continuar estandarizando la técnica con el objetivo de que

ésta sea más específica y permita determinar el estado de metilación de los ácidos sin que la presencia de endosimbiontes o incluso parasitoides afecte el resultado.

## 11. LITERATURA CITADA

- Abbott, W. S. (1925). A method of computing the effectiveness of an insecticide. *Journal Economic Entomology*, 18(2), 265-267.
- Abdi, H., & Williams, L. J. (2010). Tukey's honestly significant difference (HSD) test. *Encyclopedia of Research Design*. Thousand Oaks, CA: Sage, 1-5.
- Amat-García, G., Amat-García, E., & Ariza-Marín, E. (2011). Insectos invasores en los tiempos de cambio climático. *Innovación y Ciencia*, 18, 44-53.
- Annacondia López, M. L. (2015). Perfiles epigenéticos en la respuesta a estrés UV-B en *Pinus radiata*. Tesis, Maestría en Biotecnología Aplicada a la Conservación y Gestión Sostenible de Recursos Vegetales, Universidad de Oviedo, Vicerrectorado de internacionalización y posgrado, Asturias (España). 35p.
- Arneodo, J. D., & Ortego, J. (2014). Exploring the bacterial microbiota associated with native South American species of Aphis (Hemiptera: Aphididae). *Environmental Entomology*, 43(3), 589-594.
- Augustinos, A. A., Santos-Garcia, D., Dionyssopoulou, E., Moreira, M., Papapanagiotou, A., Scarvelakis, M., Vangelis, D., Ramos, S., Aguiar, A., Borges, P., Khadem, M., Latorre, A., Tsiamis, G. & Bourtzis, K. (2011). Detection and characterization of *Wolbachia* infections in natural populations of aphids: is the hidden diversity fully unraveled?. *PloS One*, 6(12), e28695.
- Baumann, P., Baumann, L., Lai, C. Y., Rouhbakhsh, D., Moran, N. A., & Clark, M. A. (1995). Genetics, physiology, and evolutionary relationships of the genus *Buchnera*: intracellular symbionts of aphids. *Annual Reviews in Microbiology*, 49(1), 55-94.
- Bell, J. R., Alderson, L., Izera, D., Kruger, T., Parker, S., Pickup, J., Shortall, C., Taylor, M., Verrier, P. & Harrington, R. (2015). Long-term phenological trends, species accumulation rates, aphid traits and climate: five decades of change in migrating aphids. *Journal of Animal Ecology*, 84(1), 21-34.

- Brady, C. M., Asplen, M. K., Desneux, N., Heimpel, G. E., Hopper, K. R., Linnen, C. R., Oliver, K. M., Wulff, J. A. & White, J. A. (2014). Worldwide populations of the aphid *Aphis craccivora* are infected with diverse facultative bacterial symbionts. *Microbial Ecology*, 67(1), 195-204.
- Bräutigam, K., Vining, K. J., Lafon-Placette, C., Fossdal, C. G., Mirouze, M., Marcos, S., Fluch, M., Fernandez, M., Angeles, D., Abarca, S., Maury, S., Strauss, M., Campbell, A., Rohde, C., Diaz-Sala, M., Cervera & Johnsen, Ø. (2013). Epigenetic regulation of adaptive responses of forest tree species to the environment. *Ecology and Evolution*, 3(2), 399-415.
- Brodeur, J., & Rosenheim, J. A. (2000). Intraguild interactions in aphid parasitoids. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 97(1), 93-108.
- Buchta, C., & Hahsler, M. (2007). cba: Clustering for business analytics. *R package version 0.2-4*.
- Burke, G., Fiehn, O., & Moran, N. (2010). Effects of facultative symbionts and heat stress on the metabolome of pea aphids. *The International Society for Microbial Ecology Journal*, 4(2), 242-252.
- Cannon, R. J. (1998). The implications of predicted climate change for insect pests in the UK, with emphasis on non-indigenous species. *Global Change Biology*, 4(7), 785-796.
- Chen, C. Y., Lai, C. Y., & Kuo, M. H. (2009). Temperature effect on the growth of *Buchnera* endosymbiont in *Aphis craccivora* (Hemiptera: Aphididae). *Symbiosis*, 49(1), 53-59.
- Correia, B., Valledor, L., Meijón, M., Rodriguez, J. L., Dias, M. C., Santos, C., & Pinto, G. (2013). Is the interplay between epigenetic markers related to the acclimation of cork oak plants to high temperatures? *PloS One*, 8(1), e53543.

- Correia, B., Valledor, L., Hancock, R. D., Jesus, C., Amaral, J., Meijón, M., & Pinto, G. (2016). Depicting how *Eucalyptus globulus* survives drought: involvement of redox and DNA methylation events. *Functional Plant Biology*, *43*(9), 838-850.
- Dahllöf, I., Baillie, H., & Kjelleberg, S. (2000). *rpoB*-based microbial community analysis avoids limitations inherent in 16S rRNA gene intraspecies heterogeneity. *Applied and Environmental Microbiology*, *66*(8), 3376-3380.
- Delmotte, F., Sabater-Muñoz, B., Prunier-Leterme, N., Latorre, A., Sunnucks, P., Rispe, C., & Simon, J. C. (2003). phylogenetic evidence for hybrid origins of asexual lineages in an aphid species. *Evolution*, *57*(6), 1291-1303.
- Diaz, B. M., & Fereres, A. (2005). Life table and population parameters of *Nasonovia ribisnigri* (Homoptera: Aphididae) at different constant temperatures. *Environmental Entomology*, *34*(3), 527-534.
- Dixon, A.F.G. (1985). *Aphid Ecology*. 1<sup>a</sup> Ed. Chapman & Hall. New York, USA. 157pp.
- Dombrovsky, A., Arthaud, L., Ledger, T. N., Tares, S., & Robichon, A. (2009). Profiling the repertoire of phenotypes influenced by environmental cues that occur during asexual reproduction. *Genome Research*, *19*(11), 2052-2063.
- Douglas, A. E. (1998). Nutritional interactions in insect-microbial symbioses: aphids and their symbiotic bacteria *Buchnera*. *Annual Review of Entomology*, *43*(1), 17-37.
- Dunbar, H. E., Wilson, A. C., Ferguson, N. R., & Moran, N. A. (2007). Aphid thermal tolerance is governed by a point mutation in bacterial symbionts. *PLoS Biology*, *5*(5), e96.
- Eastop, V. F. (1977). Worldwide importance of aphids as virus vectors. *Aphids as virus vectors*, Academic Press, New York. 559 pp.
- Ebert, T. A., & Cartwright, B. (1997). Biology and ecology of *Aphis gossypii* Glover (Homoptera: aphididae). *Southwestern Entomologist*, *22*(1), 116-153.

- Erturk, F. A., Agar, G., Arslan, E., & Nardemir, G. (2015). Analysis of genetic and epigenetic effects of maize seeds in response to heavy metal (Zn) stress. *Environmental Science and Pollution Research*, 22(13), 10291-10297.
- Feliciello, I., Parazajder, J., Akrap, I., & Ugarković, Đ. (2013). First evidence of DNA methylation in insect *Tribolium castaneum*: environmental regulation of DNA methylation within heterochromatin. *Epigenetics*, 8(5), 534-541.
- Field, L. M., Lyko, F., Mandrioli, M., & Prantera, G. (2004). DNA methylation in insects. *Insect Molecular Biology*, 13(2), 109-115.
- Flores, K. B., Wolschin, F., & Amdam, G. V. (2013). The role of methylation of DNA in environmental adaptation. *Integrative and Comparative Biology*, 53(2), 359–372.
- Footitt, R. G., Maw, H. E. L., Von Dohlen, C. D., & Hebert, P. D. N. (2008). Species identification of aphids (Insecta: Hemiptera: Aphididae) through DNA barcodes. *Molecular Ecology Resources*, 8(6), 1189-1201.
- Fulneček, J., & Kovařík, A. (2014). How to interpret methylation sensitive amplified polymorphism (MSAP) profiles?. *BMC Genetics*, 15(1), 1-9.
- Gaoa, H. H., Zhao, H. Y., Yang, J., Zhang, L., Bai, X. H., Hu, Z. Q., & Hu, X. S. (2014). Effects of Zinc on CarE Activities and Its Gene Transcript Level in the English Grain Aphid, *Sitobion avenae*. *Journal of Insect Science*, 14(1), 67-77.
- Glastad, K. M., Hunt, B. G., Yi, S. V., & Goodisman, M. A. D. (2011). DNA methylation in insects: on the brink of the epigenomic era. *Insect Molecular Biology*, 20(5), 553-565.
- Gómez-Valero, L., Soriano-Navarro, M., Pérez-Brocal, V., Heddi, A., Moya, A., García-Verdugo, J. M., & Latorre, A. (2004). Coexistence of *Wolbachia* with *Buchnera aphidicola* and a secondary symbiont in the aphid *Cinara cedri*. *Journal of Bacteriology*, 186(19), 6626-6633.
- Guay, J. F., Boudreault, S., Michaud, D., & Cloutier, C. (2009). Impact of environmental stress on aphid clonal resistance to parasitoids: role of

*Hamiltonella defensa* bacterial symbiosis in association with a new facultative symbiont of the pea aphid. *Journal of Insect Physiology*, 55(10), 919-926.

Gutiérrez, A. P., Ponti, L., Ellis, C. K., & d'Oultremont, T. (2007). Efecto del calentamiento climático en algunos sistemas agrícolas. *Revista Palmas*, 28(especial), 304-325.

Hales, D. F., Tomiuk, J., Wöhrmann, K., & Sunnucks, P. (1997). Evolutionary and genetic aspects of aphid biology: a review. *European Journal of Entomology*, 94(1), 1-55.

Hall, T. (2004). BioEdit version 7.0. 0. *Distributed by the author, website: www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html*.

Hasan, M. R., Ahmad, M., Rahman, M. H., & Haque, M. A. (2009). Aphid incidence and its correlation with different environmental factors. *Journal of the Bangladesh Agricultural University*, 7(1), 15-18.

Head, J. A., Dolinoy, D. C., & Basu, N. (2012). Epigenetics for ecotoxicologists. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 31(2), 221-227

Hellmann, J. J., Byers, J. E., Bierwagen, B. G., & Dukes, J. S. (2008). Five potential consequences of climate change for invasive species. *Conservation Biology*, 22(3), 534-543.

Hódar, J. A., Zamora, R., & Cayuela, L. (2012). Cambio climático y plagas: algo más que el clima. *Revista Ecosistemas*, 21(3), 73-78.

Hodkinson, I. D., & Bird, J. (1998). Host-specific insect herbivores as sensors of climate change in arctic and Alpine environments. *Arctic and Alpine Research*, 30(1), 78-83.

Hunt, B. G., Brisson, J. A., Soojin, V. Y., & Goodisman, M. A. (2010). Functional conservation of DNA methylation in the pea aphid and the honeybee. *Genome Biology and Evolution*, 2, 719-728.



- Kennedy, J. S., & Mittler, T. E. (1953). A Method of obtaining Phloem Sap via the Mouth-parts of Aphids. *Nature*, 171, 528.
- Kindlmann, P., Dixon, A. F. G., & Michaud, J. P. (2010). *Aphid biodiversity under environmental change: patterns and processes*. Berlín, Alemania: Springer Science & Business Media.
- Koga, R., Tsuchida, T., & Fukatsu, T. (2003). Changing partners in an obligate symbiosis: a facultative endosymbiont can compensate for loss of the essential endosymbiont *Buchnera* in an aphid. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, 270(1533), 2543-2550.
- Komazaki, S. (1982). Effects of constant temperatures on population growth of three aphid species, *Toxoptera citricidus* (Kirkaldy), *Aphis citricola* van der Goot and *Aphis gossypii* Glover (Homoptera: Aphididae) on *Citrus*. *Applied Entomology and Zoology*, 17(1), 75-81.
- Laird, P. W. (2010). Principles and challenges of genome-wide DNA methylation analysis. *Nature Reviews Genetics*, 11(3), 191-203.
- Lamelas, A., Pérez-Brocal, V., Gómez-Valero, L., Gosalbes, M. J., Moya, A., & Latorre, A. (2008). Evolution of the secondary symbiont "*Candidatus Serratia symbiotica*" in aphid species of the subfamily Lachninae. *Applied and Environmental Microbiology*, 74(13), 4236-4240.
- Li, T., Xiao, J. H., Xu, Z. H., Murphy, R. W., & Huang, D. W. (2011). A possibly new *Rickettsia*-like genus symbiont is found in Chinese wheat pest aphid, *Sitobion miscanthi* (Hemiptera: Aphididae). *Journal of Invertebrate Pathology*, 106(3), 418-421.
- Li, L., ZhiMing, Z., DaiBo, L., Jing, W., Jian, G., MaoJun, Z., & GuangTang, P. (2011). Analysis of infection process and methylation-sensitive amplified polymorphism in *Zea mays* genome stressed by *Rhizoctonia solani*. *Journal of Agricultural Biotechnology*, 19(2), 243-249.

- Lojek, J. S., & Orlob, G. B. (1969). Aphid transmission of tobacco mosaic virus. *Science*, 164(3886), 1407-1408.
- Lorente, I., Gamon, D., Gómez, J. L., Santos, R., Flores, L., Camacho, A., & Navarro, J. (2004). Los efectos biológicos del cambio climático. *Revista Ecosistemas*, 13(1), 103-110.
- Loxdale, H. D., & Lushai, G. (2003). Rapid changes in clonal lines: the death of a 'sacred cow'. *Biological Journal of the Linnean Society*, 79(1), 3-16.
- Loxdale, H. D. (2008). The nature and reality of the aphid clone: genetic variation, adaptation and evolution. *Agricultural and Forest Entomology*, 10(2), 81-90.
- 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(3), 985-996.
- Lukasik, P., van Asch, M., Guo, H., Ferrari, J., & Godfray, H. C. J. (2013). Unrelated facultative endosymbionts protect aphids against a fungal pathogen. *Ecology Letters*, 16(2), 214-218.
- Lushai, G., Loxdale, H. D., & Allen, J. A. (2003). The dynamic clonal genome and its adaptive potential. *Biological Journal of the Linnean Society*, 79(1), 193-208.
- Mandrioli, M., & Manicardi, G. C. (2015). Cytosine methylation in insects: new routes for the comprehension of insect complexity. *AIMS Biophysics*, 2, 412-422.
- Mason, W. J., Blevins, J. S., Beenken, K., Wibowo, N., Ojha, N., & Smeltzer, M. S. (2001). Multiplex PCR protocol for the diagnosis of staphylococcal infection. *Journal of Clinical Microbiology*, 39(9), 3332-3338.
- Miller, G. L., & Footitt, R. G. (2009). The taxonomy of crop pests: the aphids. *Insect Biodiversity: Science and Society*, 463-473.
- Moczek, A.P., & Snell-Rood, E.C. (2008). The basis of being different: the role of gene silencing in plasticity. *Evolution & Development*, 10, 511-513.

- Molinier, J., Ries, G., Zipfel, C., & Hohn, B. (2006). Transgeneration memory of stress in plants. *Nature*, 442(7106), 1046-1049.
- Montllor, C. B., Maxmen, A., & Purcell, A. H. (2002). Facultative bacterial endosymbionts benefit pea aphids *Acyrtosiphon pisum* under heat stress. *Ecological Entomology*, 27(2), 189-195.
- Nagrare, V. S. (2006). Aphid *Macrosiphum luteum* (Bukton) infests the orchid *Vanda coerulea*-a new report. *Entomon*, 31(3), 225-227.
- Najar-Rodríguez, A. J., McGraw, E. A., Mensah, R. K., Pittman, G. W., & Walter, G. H. (2009). The microbial flora of *Aphis gossypii*: patterns across host plants and geographical space. *Journal of Invertebrate Pathology*, 100(2), 123-126.
- Neven, L. G. (2000). Physiological responses of insects to heat. *Postharvest Biology and Technology*, 21(1), 103-111.
- Newton, A. (2007). Aphid outbreaks. *Nature Reports Climate Change*, (2007), 153–160.
- Nguyen, T. T. A., Michaud, D., & Cloutier, C. (2009). A proteomic analysis of the aphid *Macrosiphum euphorbiae* under heat and radiation stress. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 39(1), 20-30.
- Nyholm, S. V., & Graf, J. (2012). Knowing your friends: invertebrate innate immunity fosters beneficial bacterial symbioses. *Nature Reviews Microbiology*, 10(12), 815-827.
- Ogawa, K., & Miura, T. (2014). Aphid polyphenisms: trans-generational developmental regulation through viviparity. *Frontiers in Physiology*, 5(1), 1-11.
- 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., Smith, A. H., & Russell, J. A. (2014). Defensive symbiosis in the real world—advancing ecological studies of heritable, protective bacteria in aphids and beyond. *Functional Ecology*, *28*(2), 341-355.
- Paradis, E. (2010). pegas: An R package for population genetics with an integrated—modular approach. *Bioinformatics*, *26*(3), 419-420.
- Pasquier, C., Clément, M., Dombrovsky, A., Penaud, S., Da Rocha, M., Rancurel, C. & Robichon, A. (2014). Environmentally selected aphid variants in clonality context display differential patterns of methylation in the genome. *PLoS one*, *9*(12), e115022.
- Peccoud, J., Simon, J. C., McLaughlin, H. J., & Moran, N. A. (2009). Post-Pleistocene radiation of the pea aphid complex revealed by rapidly evolving endosymbionts. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *106*(38), 16315-16320.
- Peccoud, J., Bonhomme, J., Mahéo, F., Huerta, M., Cosson, O., & Simon, J. C. (2014). Inheritance patterns of secondary symbionts during sexual reproduction of pea aphid biotypes. *Insect Science*, *21*(3), 291-300.
- Rico, L., Ogaya, R., Barbeta, A., & Penuelas, J. (2014). Changes in DNA methylation fingerprint of *Quercus ilex* trees in response to experimental field drought simulating projected climate change. *Plant Biology*, *16*(2), 419-427.
- 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*(1586), 603-610.
- Sabater-Munoz, B., van Ham, R. C. H. J., Martinez-Torres, D., Silva, F. J., Latorre, A., & Moya, A. (2001). Molecular evolution of aphids and their primary (*Buchnera* sp.) and secondary endosymbionts: implications for the role of symbiosis in insect evolution. *Interciencia*, *26*(10), 508-12.

- Sakurai, M., Koga, R., Tsuchida, T., Meng, X. Y., & Fukatsu, T. (2005). *Rickettsia* symbiont in the pea aphid *Acyrtosiphon pisum*: novel cellular tropism, effect on host fitness, and interaction with the essential symbiont *Buchnera*. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(7), 4069-4075.
- Salmon, A., Clotault, J., Jenczewski, E., Chable, V., & Manzanares-Dauleux, M. J. (2008). *Brassica oleracea* displays a high level of DNA methylation polymorphism. *Plant Science*, 174(1), 61-70.
- Scarborough, C. L., Ferrari, J., & Godfray, H. C. J. (2005). Aphid protected from pathogen by endosymbiont. *Science*, 310(5755), 1781-1781.
- Schloss, P. D., Gevers, D., & Westcott, S. L. (2011). Reducing the effects of PCR amplification and sequencing artifacts on 16S rRNA-based studies. *PloS one*, 6(12), e27310.
- Singh, K. P. (2014). Screening of DNA methylation changes by methylation-sensitive random amplified polymorphic DNA-polymerase chain reaction (MS-RAPD-PCR). *Molecular Toxicology Protocols*, 1105: 71-81.
- Srinivasan, D. G., & Brisson, J. A. (2011). Aphids: a model for polyphenism and epigenetics. *Genetics Research International*. 2012, 431531-431531.
- Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipinski, A., & Kumar, S. (2013). MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution*, 30(12), 2725-2729.
- Team, R. C. (2015). R: A Language and Environment for Statistical Computing (R Foundation for Statistical Computing, Vienna, 2012). URL: [http:// www. R-project. org](http://www.R-project.org).
- Thomas, M. B., & Blanford, S. (2003). Thermal biology in insect-parasite interactions. *Trends in Ecology & Evolution*, 18(7), 344-350.
- Tsuchida, T., Koga, R., Shibao, H., Matsumoto, T., & Fukatsu, T. (2002). Diversity and geographic distribution of secondary endosymbiotic bacteria in natural

- populations of the pea aphid, *Acyrtosiphon pisum*. *Molecular Ecology*, 11(10), 2123-2135.
- Tsuchida, T., Koga, R., Sakurai, M., & Fukatsu, T. (2006). Facultative bacterial endosymbionts of three aphid species, *Aphis craccivora*, *Megoura crassicauda* and *Acyrtosiphon pisum*, sympatrically found on the same host plants. *Applied Entomology and Zoology*, 41(1), 129-137.
- Tsuchida, T., Koga, R., Horikawa, M., Tsunoda, T., Maoka, T., Matsumoto, S. & Fukatsu, T. (2010). Symbiotic bacterium modifies aphid body color. *Science*, 330(6007), 1102-1104.
- Villalobos, W., Hidalgo, N. P., Durante, M. M., & Nafria, J. N. (2010). Aphididae (Hemiptera: Sternorrhyncha) from Costa Rica, with new records for Central America. *Boletín de la Asociación Española de Entomología*, 34, 1-2.
- Voegtlin, D., Villalobos, W., Sánchez, M. V., Saborío, G., & Rivera, C. (2003). Guía de los áfidos alados de Costa Rica. *Revista de Biología Tropical*, 51, 1-228.
- Vrijenhoek, R. (1994). DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Molecular Marine Biology and Biotechnology*, 3(5), 294-299.
- Walsh, T. K., Brisson, J. A., Robertson, H. M., Gordon, K., Jaubert-Possamai, S., Tagu, D., & Edwards, O. R. (2010). A functional DNA methylation system in the pea aphid, *Acyrtosiphon pisum*. *Insect Molecular Biology*, 19, 215–228.
- Wang, Z., Shen, Z. R., Song, Y., Liu, H. Y., & Li, Z. X. (2009). Distribution and diversity of *Wolbachia* in different populations of the wheat aphid *Sitobion miscanthi* (Hemiptera: Aphididae) in China. *European Journal of Entomology*, 106(1), 49-55.
- Wennergren, U., & Landin, J. (1993). Population growth and structure in a variable environment. *Oecologia*, 93(3), 394-405.

- Wernegreen, J. J. (2012). Mutualism meltdown in insects: bacteria constrain thermal adaptation. *Current Opinion in Microbiology*, 15(3), 255-262.
- 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.
- Wilson, A. C., Sunnucks, P., & Hales, D. F. (2003). Heritable genetic variation and potential for adaptive evolution in asexual aphids (Aphidoidea). *Biological Journal of the Linnean Society*, 79(1), 115-135.
- XueLin, L., ZhongXu, L., YiChun, N., XiaoPing, G., & XianLong, Z. (2009). MSAP analysis of epigenetic changes in cotton (*Gossypium hirsutum* L.) under salt stress. *Acta Agronomica Sinica*, 35(4), 588-596.
- Zamora-Mejías, D. (2009). Asociación de áfidos (Aphididae) en Costa Rica, su diversidad e interacciones tróficas con especies parasitoides (Braconidae: Aphidiinae) e hiperparasitoides (Hymenoptera). Tesis, Licenciatura en Biología con énfasis en Manejo Integrado de Plagas, Universidad de Costa Rica, Escuela de Biología, San José (Costa Rica). 97p.
- Zhao, L., & Jones, W. A. (2012). Expression of heat shock protein genes in insect stress responses. *Invertebrate Survival Journal*, 90, 93-101.
- Zhao, Y., Zhang, S., Luo, J. Y., Wang, C. Y., Lv, L. M., & Cui, J. J. (2016). Bacterial communities of the cotton aphid *Aphis gossypii* associated with Bt cotton in northern China. *Scientific Reports*, 6: 22958.
- Zilberman, D., & Henikoff, S. (2007). Genome-wide analysis of DNA methylation patterns. *Development*, 134(22), 3959-3965.
- Zytynska, S. E., Meyer, S. T., Sturm, S., Ullmann, W., Mehrparvar, M., & Weisser, W. W. (2016). Secondary bacterial symbiont community in aphids responds to plant diversity. *Oecologia*, 180(3), 735-747.

## 12. ANEXOS

**Anexo 1.** Concentración de ADN de cada una de las muestras obtenidas a partir de 20 áfidos a las cuales se les realizó la detección de sus bacterias endosimbiontes.

Código	Especie	Cn de ADN (ng/μL)
ML21	<i>Macrosiphum luteum</i>	90,6
ML (A)	<i>Macrosiphum luteum</i>	117,4
ML (B)	<i>Macrosiphum luteum</i>	147,4
TC26	<i>Toxoptera citricidus</i>	140,1
TC37	<i>Toxoptera citricidus</i>	225,3
AG1	<i>Aphis gossypii</i>	79,3
AG21	<i>Aphis gossypii</i>	174,1
365 (A)	<i>Aphis gossypii</i>	110,8
365 (B)	<i>Aphis gossypii</i>	112,3
370	<i>Aphis gossypii</i>	99,7
PC4	<i>Picturaphis pojanii</i>	166
PC11	<i>Picturaphis pojanii</i>	167,1
AS6	<i>Aphis sambuci</i>	509,9
AS7	<i>Aphis sambuci</i>	380,6
A8	<i>Macrosiphum rosae</i>	253,7
A10	<i>Macrosiphum rosae</i>	236,3
AS14	<i>Aphis spiraecola</i>	257,2
AS20	<i>Aphis spiraecola</i>	139,8
CA15	<i>Cavariella aegopodii</i>	239,3
CA16	<i>Cavariella aegopodii</i>	297,9
NV18	<i>Neophyllaphis varicolor</i>	223,9
NV19	<i>Neophyllaphis varicolor</i>	287,4
364 (A)	<i>Neophyllaphis varicolor</i>	168,4
364 (B)	<i>Neophyllaphis varicolor</i>	208,2
GP22	<i>Grenidea psidii</i>	347,3
GP23	<i>Grenidea psidii</i>	303,5
TA24	<i>Toxoptera aurantii</i>	352,6
TA27	<i>Toxoptera aurantii</i>	190,7
SA26	<i>Sitobion avenae</i>	315,6
AN28	<i>Aphis nerii</i>	250,7
AN30	<i>Aphis nerii</i>	891,2
AH35	<i>Aphis helianthi</i>	234,5
AH36	<i>Aphis helianthi</i>	521,3
39	<i>Cerataphis lataniae</i>	255,8
40	<i>Cerataphis lataniae</i>	184,7
362 (A)	<i>Sitobion avenae</i>	103,1
362 (B)	<i>Sitobion avenae</i>	89,2
363 (A)	<i>Aphis craccivora</i>	142,0
363 (B)	<i>Aphis craccivora</i>	120,9
369 (A)	<i>Macrosiphum sp.</i>	156,0
369 (B)	<i>Macrosiphum sp.</i>	149,7
375 (A)	<i>Brevicoryne brassicae</i>	100,1
375 (B)	<i>Brevicoryne brassicae</i>	230,9
376 (A)	<i>Macrosiphum salviae</i>	137,6
376 (B)	<i>Macrosiphum salviae</i>	130,2
381 (A)	<i>Melanaphis sacchari</i>	125,3
381 (B)	<i>Melanaphis sacchari</i>	101,7
382 (A)	<i>Tinocallis kahawaluokani</i>	201,1
382 (B)	<i>Tinocallis kahawaluokani</i>	211,9



**Anexo 2.** Especies de bacterias endosimbiontes detectadas en ADN genómico total extraído a partir de muestras de áfidos de 20 individuos.

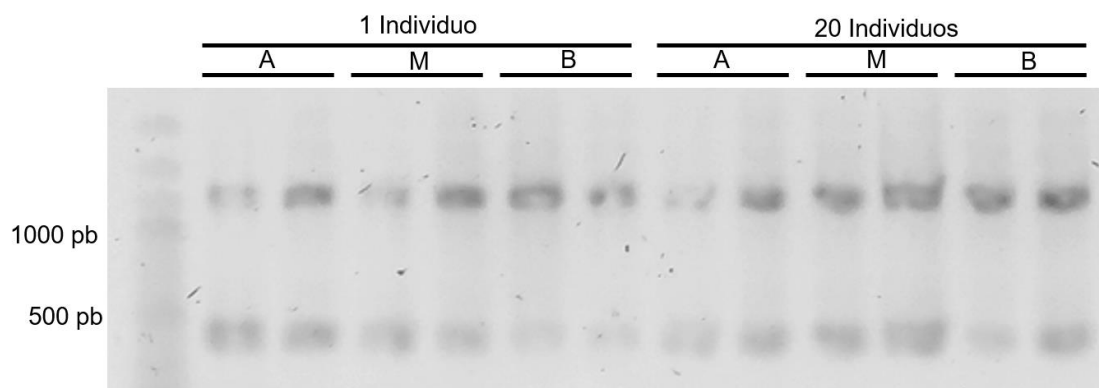
Códigos de muestra	Bacterias endosimbiontes detectadas						
	PCR específico		PCR multiplex				
	<i>Wolbachia</i>	<i>Buchnera</i>	<i>Buchnera</i>	<i>S. symbiotica</i>	<i>Rickettsia</i>	<i>H. defensa</i>	<i>R. insecticola</i>
ML21		+	+				
TC26	+	+		+	+		
TC37	+	+					
AG1		+					
AG21		+					
PC4	+		+			+	
PC11	+	+	+			+	
AS6	+		+				
AS7	+	+	+				
A8	+	+	+	+			
A10	+	+	+	+			
AS14		+				+	
AS20		+					
CA15		+					+
CA16		+					+
NV18							
NV19		+					
GP22		+	+	+			
GP23		+					
TA24		+		+			
TA27		+		+			
SA26		+	+				
AN28							
AN30							
AH35		+					
AH36		+					
39							
40							
362 (A)	+	+	+				
362 (B)		+	+				
363 (A)	+	+	+		+		
363 (B)	+	+	+		+		
364 (A)	+		+				
364 (B)			+				
365 (A)		+	+	+	+		
365 (B)		+	+	+	+		
369 (A)		+	+				
369 (B)		+	+				
370		+					
375 (A)		+	+				
375 (B)		+	+				
376 (A)	+	+	+				
376 (B)	+	+	+				
ML (A)		+					
ML (B)		+					
381 (A)		+					
381 (B)							
382 (A)							
382 (B)							

**Anexo 3.** Bacterias endosimbiontes detectadas en muestras de diferentes especies de áfidos.

Especie	N	<i>Wolbachia</i>	<i>Buchnera</i>	<i>S. symbiotica</i>	<i>Rickettsia</i>	<i>H. defensa</i>	<i>R. insecticola</i>	Total de EE <sup>1</sup>
<i>M. luteum</i>	3	0 / 3	3 / 3	0 / 3	0 / 3	0 / 3	0 / 3	1/6
<i>T. citricidus</i>	2	2 / 2	2 / 2	1 / 2	1 / 2	0 / 2	0 / 2	4/6
<i>A. gossypii</i>	5	0 / 5	5 / 5	2 / 5	2 / 5	0 / 5	0 / 5	3/6
<i>P. pojarii</i>	2	2 / 2	2 / 2	0 / 2	0 / 2	2 / 2	0 / 2	3/6
<i>A. sambuci</i>	2	2 / 2	2 / 2	0 / 2	0 / 2	0 / 2	0 / 2	2/6
<i>M. rosae</i>	2	2 / 2	2 / 2	2 / 2	0 / 2	0 / 2	0 / 2	3/6
<i>A. spiraecola</i>	2	0 / 2	2 / 2	0 / 2	0 / 2	0 / 2	0 / 2	1/6
<i>C. aegopodii</i>	2	0 / 2	2 / 2	0 / 2	0 / 2	0 / 2	2 / 2	2/6
<i>N. varicolor</i>	4	1 / 4	3 / 4	0 / 4	0 / 4	0 / 4	0 / 4	2/6
<i>G. psidii</i>	2	0 / 2	2 / 2	1 / 2	0 / 2	0 / 2	0 / 2	2/6
<i>T. aurantii</i>	2	0 / 2	2 / 2	2 / 2	0 / 2	0 / 2	0 / 2	2/6
<i>S. avenae</i>	3	1 / 3	3 / 3	1 / 3	0 / 3	0 / 3	0 / 3	3/6
<i>A. nerii</i>	2	0 / 2	0 / 2	0 / 2	0 / 2	0 / 2	0 / 2	0/6
<i>A. helianthi</i>	2	0 / 2	2 / 2	0 / 2	0 / 2	0 / 2	0 / 2	1/6
<i>C. lataniae</i>	2	0 / 2	0 / 2	0 / 2	0 / 2	0 / 2	0 / 2	0/6
<i>A. craccivora</i>	2	2 / 2	2 / 2	0 / 2	2 / 2	0 / 2	0 / 2	3/6
<i>Macrosiphum sp.</i>	2	0 / 2	2 / 2	0 / 2	0 / 2	0 / 2	0 / 2	1/6
<i>B. brassicae</i>	2	0 / 2	2 / 2	0 / 2	0 / 2	0 / 2	0 / 2	1/6
<i>M. salviae</i>	2	2 / 2	2 / 2	0 / 2	0 / 2	0 / 2	0 / 2	2/6
<i>M. sacchari</i>	2	0 / 2	1 / 2	0 / 2	0 / 2	0 / 2	0 / 2	1/6
<i>T. kahawaluokalani</i>	2	0 / 2	0 / 2	0 / 2	0 / 2	0 / 2	0 / 2	0/6
Total de muestras <sup>2</sup>	4 9	14 / 49	41 / 49	9 / 49	5 / 49	2 / 49	2 / 49	-

<sup>1</sup> EE = Especies de endosimbiontes

<sup>2</sup> Total de muestras diferentes especies de áfidos obtenidas a partir de 20 individuos



**Anexo 4.** Electroforesis en gel de agarosa al 1% para visualizar los fragmentos amplificados con el OPA-07 utilizando muestras de ADN genómico total de 1 y 20 individuos de la especie *T. citricidus*. A= Concentración de ADN alta, M: Concentración media, B: Concentración baja.

**Anexo 5.** Total de bandas obtenidas con MS-RAPDs en muestras de ADN de 1 y 20 individuos de las especies *T. citricidus* y *M. luteum*.

Muestra	Individuos	Cn ADN (ng/uL)	Especie	Primer	Replica 1			Replica 2		
					S.D*	Msp I	Hpa II	S.D*	Msp I	Hpa II
18	1	2,9	<i>M. luteum</i>	OPA-8	3	2	4	2	2	5
5	1	2,3	<i>M. luteum</i>	OPA-8	4	4	4	3	4	4
19	1	8,2	<i>M. luteum</i>	OPA-8	4	3	4	3	3	4
52	20	110,6	<i>M. luteum</i>	OPA-8	4	4	5	4	3	4
54	20	138,9	<i>M. luteum</i>	OPA-8	5	3	4	4	4	4
57	20	198	<i>M. luteum</i>	OPA-8	4	3	4	4	3	3
18	1	2,9	<i>M. luteum</i>	OPA-11	3	0	0	3	1	3
5	1	2,3	<i>M. luteum</i>	OPA-11	3	3	3	3	3	4
19	1	8,2	<i>M. luteum</i>	OPA-11	2	2	2	3	2	1
52	20	110,6	<i>M. luteum</i>	OPA-11	2	2	3	2	2	3
54	20	138,9	<i>M. luteum</i>	OPA-11	2	2	3	2	2	3
57	20	198	<i>M. luteum</i>	OPA-11	2	2	0	2	1	3
18	1	2,9	<i>M. luteum</i>	OPA-13	3	1	1	1	1	1
5	1	2,3	<i>M. luteum</i>	OPA-13	4	1	1	1	1	1
19	1	8,2	<i>M. luteum</i>	OPA-13	4	1	1	1	1	1
52	20	110,6	<i>M. luteum</i>	OPA-13	4	1	1	1	1	1
54	20	138,9	<i>M. luteum</i>	OPA-13	2	1	1	1	1	1
57	20	198	<i>M. luteum</i>	OPA-13	4	1	1	1	1	1
50	1	60,4	<i>T. citricidus</i>	OPA-1	1	1	1	2	1	2
34	1	48,1	<i>T. citricidus</i>	OPA-1	1	1	1	2	1	2
22	1	9,9	<i>T. citricidus</i>	OPA-1	1	1	1	2	1	2
26	20	12,3	<i>T. citricidus</i>	OPA-1	1	1	1	2	1	2
38	20	13,9	<i>T. citricidus</i>	OPA-1	1	1	1	2	1	1
46	20	22,3	<i>T. citricidus</i>	OPA-1	1	1	1	2	1	1
50	1	60,4	<i>T. citricidus</i>	OPA-7	3	1	3	2	1	1
34	1	48,1	<i>T. citricidus</i>	OPA-7	3	1	1	2	1	2
22	1	9,9	<i>T. citricidus</i>	OPA-7	3	1	3	2	1	2
26	20	12,3	<i>T. citricidus</i>	OPA-7	0	3	1	2	2	1
38	20	13,9	<i>T. citricidus</i>	OPA-7	3	3	2	2	2	1
46	20	22,3	<i>T. citricidus</i>	OPA-7	2	3	1	2	3	1
50	1	60,4	<i>T. citricidus</i>	OPA-9	3	3	3	3	4	3
34	1	48,1	<i>T. citricidus</i>	OPA-9	5	4	3	3	5	6
22	1	9,9	<i>T. citricidus</i>	OPA-9	4	4	4	3	4	4
26	20	12,3	<i>T. citricidus</i>	OPA-9	4	4	4	3	3	2
38	20	13,9	<i>T. citricidus</i>	OPA-9	4	3	3	3	0	3
46	20	22,3	<i>T. citricidus</i>	OPA-9	3	2	1	3	2	1

\*S.D : ADN sin digerir

**Anexo 6.** Resumen de los principales resultados obtenidos al realizar comparaciones de metilación y endosimbiontes según el estadio y semana de colecta de áfidos de la especie *T. citricidus*.

	<b>Comparación entre estadios</b>	<b>Comparación entre semanas</b>
<b>Endosimbiontes</b>	-Adultos (alados y ápteros) únicos con <i>R. insecticola</i> y <i>H. defensa</i>	-Semana III presentó el mayor número de endosimbiontes (6)  - Semana II presentó el menor número de endosimbiontes (1)
<b>Metilación</b>	-Sin diferencias	-Semana II presentó diferencias en la cantidad de regiones sin metilar
<b>Condiciones ambientales</b>	NA <sup>1</sup>	-Semana III presentó la temperatura más alta  -Semana III presentó la humedad más baja

<sup>1</sup> NA = no aplica.

**Anexo 7.** Resumen de los principales resultados obtenidos al realizar comparaciones de metilación y endosimbiontes según el estadio y semana de colecta de áfidos de la especie *M. luteum*.

	<b>Comparación entre estadios</b>	<b>Comparación entre semanas</b>
<b>Endosimbiontes</b>	-Ninfas únicas con <i>H. defensa</i>	-Semana II única en la que se detectó <i>H. defensa</i>
<b>Metilación</b>	-Sin diferencias	-Semana I presentó diferencias en la cantidad de regiones hemimetiladas y completamente metiladas
<b>Condiciones ambientales</b>	NA <sup>1</sup>	-Semana III presentó la temperatura más alta  -Semana I presentó la humedad más alta

<sup>1</sup> NA = no aplica.