
**BASES GENÓMICAS Y TRANSCRIPTÓMICAS DE LA PLASTICIDAD EN EL
USO DE HOSPEDEROS DEL PARASITOIDE *APHIDIUS ERVI* HALIDAY
(HYMENOPTERA: BRACONIDAE). MOLECULAR MECHANISMS
UNDERPINNING HOST FIDELITY IN THE PARASITOID WASP *APHIDIUS ERVI*
HALIDAY (HYMENOPTERA: BRACONIDAE)**

**GABRIEL IGNACIO BALLESTEROS TEUBER
DOCTOR EN CIENCIAS MENCIÓN INGENIERÍA GENÉTICA VEGETAL**

RESUMEN

La agricultura moderna está basada en el uso de cultivos homogéneos y susceptibles al ataque de plagas, enfermedades y malezas, las que son controladas principalmente a través de aplicaciones de grandes cantidades de pesticidas de origen sintético. No obstante, existen estrategias de control alternativas, tales como el uso de enemigos naturales introducidos, naturalizados, naturales o liberados para el control de plagas. Uno de los grupos de enemigos naturales de insectos más utilizados son las micro avispas parasitoides, organismos que poseen un ciclo de vida que involucra el parasitismo de un insecto hospedero que finalmente ocasiona su muerte. En general, los parasitoides presentan una alta especificidad a un hospedero particular y son muy eficientes como controladores de la especie blanco. Sin embargo, se ha descrito que existen especies de parasitoides que presentan un amplio rango en el uso de hospederos y una gran variación fenotípica asociada a la elección y oviposición sobre diferentes insectos hospederos. Este es el caso del parasitoide *Aphidius ervi*, capaz de parasitar dentro de más de 20 especies de áfidos, por lo que se usa como controlador biológico de áfidos de importancia agrícola a nivel mundial. En Chile, este parasitoide fue introducido en la década de los 70s como agente controlador del áfido plaga de cereales *Sitobion avenae*. Sin embargo, en Chile también se han encontrado poblaciones de *A. ervi* sobre el pulgón de las leguminosas *Acyrtosiphon pisum*. De forma muy interesante, las poblaciones de *A. ervi* en Chile no evidencian signos de diferenciación genética entre poblaciones a pesar de que exhiben especialización conductual y preferencias por su hospedero natal (fidelidad al hospedero) respecto de hospederos alternativos no-natales. En efecto, parasitoides *A. ervi* no muestran diferencias en cuanto a su desempeño cuando se compara su tasa de reproducción entre *S. avenae* y *A. pisum*. En consecuencia, se ha propuesto que la preferencia hacia un hospedero natal en particular (fidelidad de hospedero) observada en *A. ervi* dependería tanto de factores ambientales (por ej., señales químicas del insecto hospedero y del cultivo atacado) como de factores heredables (por ej., marcas

epigenéticas). En la siguiente tesis se propone que la fidelidad al hospedero en *A. ervi* sería consecuencia de una plasticidad transcripcional para genes relacionados con la percepción de estímulos químicos. La expresión diferencial de estos genes explicaría la plasticidad para rasgos fenotípicos como la elección y uso de hospederos. Además, se propone que algunos de estos mecanismos de detección de señales química estarían siendo regulados por mecanismos epigenéticos que actuarían como intermediarios entre el genotipo del individuo y el ambiente en donde se ha desarrollado (aprendizaje asociativo). En primer lugar, en esta tesis se determinó el efecto del desarrollo del parasitoide *A. ervi* dentro de un cierto áfido hospedero (*S. avenae* versus *A. pisum*) sobre los perfiles transcripcionales de hembras adultas a escala de transcriptoma completo, lográndose identificar un primer grupo de genes diferencialmente regulados entre parasitoides provenientes de ambos hospederos que podrían estar involucrados en la formación de la fidelidad al hospedero. Los resultados efectivamente sugieren que *A. ervi* presenta plasticidad fenotípica a nivel transcripcional, la que a su vez depende del origen poblacional de los parasitoides y que podría ser mediada por la relación planta-hospedero, descartándose que las avispas parasitoides utilicen las mismas estrategias a nivel molecular para parasitar hospederos natales y no-natales.

En segundo término, se determinaron los efectos de realizar un trasplante recíproco entre hospederos natales y no-natales sobre los niveles de expresión génica para genes candidatos codificantes para proteínas quimiosensoras en dos líneas de *A. ervi* provenientes de dos hospederos diferentes (*A. pisum* y *S. avenae*). Dado que los parasitoides son multiplicados en insectarios con fines comerciales para ser vendidos y luego liberados al campo (control biológico), adicionalmente se estudió el efecto de la crianza sobre el éxito del parasitismo a través de la comparación de niveles de expresión génica para el mismo set de genes quimiosensoriales estudiados previamente, entre poblaciones naturales de campo y poblaciones endogámicas de laboratorio. La falta de fidelidad al hospedero descrita previamente para poblaciones con altos niveles de endogamia (comparado con sus contrapartes de campo) pudo relacionarse con variaciones en mecanismos moleculares específicamente involucrados en la olfacción.

Finalmente, se secuenció y ensambló *de novo* el genoma de *A. ervi*, utilizando una estrategia híbrida de ensamble que consistió en combinar librerías Illumina con una librería PacBio. Esta estrategia permitió obtener un ensamble genómico de alta calidad con bajo nivel de fragmentación (5,778 *scaffolds*). Con este genoma se logró

predecir 20,226 genes codificantes a partir de la evidencia transcripcional obtenida previamente para *A. ervi* en esta tesis (capítulo II). Sorpresivamente no se encontró evidencia respecto de la metilación del DNA como mecanismo epigenético involucrado en la regulación génica de *A. ervi*, como sí ha sido descrito para otros himenópteros, en donde la metilación del DNA estaría involucrada en la regulación transcripcional en respuesta a cambios/factores ambientales. Estos resultados sugieren que, en *A. ervi*, la metilación del DNA no tendría un rol *per se* sobre la plasticidad fenotípica observada, a diferencia de lo que ocurre en otros himenópteros. Este genoma y los genes predichos utilizando evidencia transcripcional están disponibles públicamente y constituyen un aporte a la comunidad científica. En efecto, actualmente se están llevando a cabo una serie de estudios colaborativos que están dando luces de los mecanismos moleculares que posee *A. ervi* y que le permiten enfrentar ambientes cambiantes, lo que a su vez llevará a un mejor entendimiento de los factores que inciden en la eficacia de los parasitoides como agentes biocontroladores.

ABSTRACT

Modern agriculture is mostly based on homogeneous crops, which are pest, disease and weed susceptible; this situation requires a permanent, mandatory input of synthetic pesticides into these oversimplified agroecosystems. Alternatively, biological control strategies are becoming an important part of sustainable pest control. These strategies are based on using introduced, naturalized, natural or released antagonistic agents to regulate population densities of other organisms. Parasitoid wasps are among the most widely used agents in biological control programs, as they lay eggs inside the body of host's juvenile stages or adults, subsequently killing them during their development. Overall, parasitoids have been shown to be host specialist and can be employed in pest control without negative side effects due to potential impacts on non-target organisms. However, many parasitoid species exhibit broad host ranges, as well as phenotypic variation in selection and parasitization of different insect hosts. This is the case of *Aphidius ervi*, a parasitoid wasp capable of parasitizing over 20 different aphid species, being widely used in biological control programs of several relevant aphid pests worldwide. In Chile, this parasitoid was introduced from Europe in the late 70's as a biological control agent of a cereal pest, the grain aphid *Sitobion avenae*. However, the introduced Chilean *A. ervi* wasps also parasitize the pea aphid *Acyrtosiphon pisum*, populations. Interestingly, even when parasitizing different aphid species, Chilean *A. ervi* populations do not exhibit signatures of genetic differentiation between them. Surprisingly, although they do display variation in terms of host preference towards their natal host (host fidelity) compared to alternate hosts (non-natal hosts), no differences in fitness were observed in terms of reproductive rate between *S. avenae* and *A. pisum*. Hence, it has been proposed that the strong preference towards their natal host (host fidelity) observed in Chilean populations of *A. ervi* would depend on both environmental factors (i.e., chemical signals derived from the host insect and the plant species) and on heritable factors (i.e., epigenetic marks). In the following Thesis, it has been proposed that host fidelity in *A. ervi* is a consequence of transcriptional plasticity for genes involved in perception of chemical stimuli. Differential expression on these genes would in turn explain the phenotypic plasticity observed in terms of host selection and host preference. Additionally, it has been proposed that the perception of some of these stimuli is modulated by epigenetic mechanisms, which would be acting as mediators between the individual's genotype and the environment where it developed, producing specific phenotypes.

In this thesis we first examined the effect of rearing and development in two different aphid host species (*Sitobion avenae* versus *Acyrtosiphon pisum*) on the transcriptome of adult *A. ervi* females. This approach allowed us to identify several differentially expressed genes (which could be involved in host fidelity) when comparing parasitoids reared on different aphid host species. Our results suggest that *A. ervi* displays a significant phenotypic plasticity at transcriptional levels, which would depend on the aphid-plant complex that the parasitoid populations developed on. Hence, it is unlikely that these parasitoid wasps use the same strategies and/or molecular mechanisms to parasitize and exploit either a natal or non-natal aphid host. Second, the effects of reciprocal transplants between natal and non-natal hosts were determined in the expression levels of genes coding for chemosensory

proteins in two different *A. ervi* lines reared on two different aphid hosts (*A. pisum* and *S. avenae*). As parasitoids are reared in small caged populations in commercial insectaries under laboratory conditions before being released to farms and/or natural environments, the effect of long-term rearing on the parasitism success was also studied by comparing the gene expression levels for the same chemosensory candidate genes between natural, field *A. ervi* populations and highly inbred populations reared in laboratory. In this way a relationship could be established between variations in molecular mechanisms specifically involved in olfactory perception with the reduced host fidelity described previously for highly inbred populations of *A. ervi* (compared to their counterparts from field).

Finally, the *A. ervi* genome was sequenced and *de novo* assembled, using a hybrid assembly strategy which combined both Illumina libraries (short reads) and a Pacific Biosciences library (long reads) into a hybrid assembly. Using this strategy, a high-quality genome draft was obtained with reduced fragmentation levels (5,778 scaffolds). From this genome assembly, 20,226 coding genes were predicted by using as reference the transcriptional evidence for *A. ervi* obtained within this thesis (Chapter II). Surprisingly, no evidence was found supporting the existence of DNA methylation as an epigenetic mechanism involved in gene regulation of *A. ervi*, unlike other Hymenoptera species, where it has been described as an important mechanism involved in transcriptional regulation in response to environmental factors/changes. Thus, these results suggest that, in *A. ervi*, DNA methylation would not be responsible *per se* for the observed phenotypic plasticity. This genome assembly and predicted coding genes using transcriptional data are publicly available and constitute a valuable resource to the scientific community. Indeed, collaborative studies are currently being performed, aimed at addressing the molecular mechanisms present in *A. ervi* involved in responding to changing environments. This will lead to a better understanding of several key aspects of parasitoids' biology affecting their efficacy as biological control agents of agricultural aphid pests.