



Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C.
Posgrado en Ciencias Biológicas

Estudio y caracterización de bacteriófagos del sistema
digestivo de insectos plaga de importancia económica

Tesis que presenta
Daniel Bravo Pérez

En opción al título de

DOCTOR EN CIENCIAS

(Ciencias Biológicas: Opción Bioquímica y Biología Molecular)

Mérida, Yucatán, México.

2024

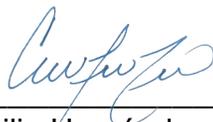
*CENTRO DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA DE YUCATÁN, A. C.
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS*



RECONOCIMIENTO

Por medio de la presente, hago constar que el trabajo de tesis de Daniel Bravo Pérez titulado **Estudio y caracterización de bacteriófagos del sistema digestivo de insectos plaga de importancia económica**, fue realizado en la Unidad de Biología Integrativa, en la línea de investigación interacción Planta-Ambiente, en el Laboratorio USF 10 del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C. bajo la dirección del Dr. Oscar Alberto Moreno Valenzuela, dentro de la opción de Bioquímica y Biología Molecular, perteneciente al Programa de Posgrado en Ciencias Biológicas de este Centro y la codirección del Dr. Cristóbal Chaidez Quiroz, del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo

Atentamente



Dra. Cecilia Hernández Zepeda
Directora de Docencia

Mérida, Yucatán, México, a 02 de julio de 2024

DECLARACIÓN DE PROPIEDAD

Declaro que la información contenida en las secciones de: Materiales y Métodos, Resultados y Discusión de este documento, proviene de las actividades de investigación realizadas durante el período que se me asignó para desarrollar mi trabajo de tesis, en las Unidades y Laboratorios del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C., y que, a razón de lo anterior, y en contraprestación de los servicios educativos o de apoyo que me fueron brindados, dicha información, en términos de la Ley Federal del Derecho de Autor y la Ley Federal de Protección a la Propiedad Industrial, le pertenece patrimonialmente a dicho Centro de Investigación. Por otra parte, en virtud de lo ya manifestado, reconozco que de igual manera los productos intelectuales o desarrollos tecnológicos que deriven o pudieran derivar de lo correspondiente a dicha información, le pertenecen patrimonialmente al Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C., y se registrarán, en todo caso, por lo dispuesto por la Ley Federal del Derecho de Autor y la Ley Federal de Protección a la Propiedad Industrial, en el tenor de lo expuesto en la presente Declaración.

Firma: _____



Nombre: Daniel Bravo Pérez

Este trabajo se llevó a cabo en la Unidad de Bioquímica y Biología Molecular del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C., bajo la dirección del Dr. Oscar Alberto Moreno Valenzuela y el Dr. Cristóbal Chaidez Quiroz.

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Humanidades Ciencia y Tecnologías (CONAHCYT) por la beca otorgada durante los cuatro años de doctorado.

Al Centro de Investigación Científica de Yucatán A.C. por todas las facilidades otorgadas para el uso de instalaciones y equipos, pero principalmente al núcleo de investigadores y técnicos.

Al Dr. Oscar Alberto Moreno Valenzuela por permitirme ser parte de su gran equipo de investigación y por todo el apoyo otorgado para la culminación de la presente investigación.

Al Dr. Cristóbal Chaidez Quiroz y al Dr. Jean Pierre González Gómez del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo (CIAD), Unidad Mazatlán, Sinaloa, por la atención brindada durante todo el proceso del trabajo.

A la Dra. Daysi de la Caridad Pérez Brito y a la Dra. Cecilia Hernández Zepeda por todos los aportes y recomendaciones a la investigación.

A la Q.F.B. Yereni Minero García por todo su apoyo en el laboratorio.

Al Comité tutorial y revisor por las aportaciones y recomendaciones para mejorar el escrito.

DEDICATORIAS

A mis padres Herlinda Pérez Roblero y Galtier Bravo Méndez gracias por siempre impulsarme a ser mejor persona cada día.

A mi esposa Mercedes Báez Santana por todo su apoyo.

A las razones de mi vida y que me alegran todos los días:

Valentina Denali

Héctor Daniel

Vale....

A mis patronas: Amable Bravo Pérez†, Gloria Santana†, Iyeni Luna†, gracias por siempre cuidarme.

A mi familia Glendy, Alex, Suemi, Luis, Mari, Jorget†, muchas gracias por su apoyo y amistad.

PRODUCTOS

Artículos

Bravo-Pérez D, Hernández-Zepeda C, Chaidez-Quiroz C, Pérez-Brito D, González-Gómez JP, Minero-García Y, Rosiles-González G, Carillo-Jovel VH, Moreno-Valenzuela OA. 2024. Composition of the whiteflies microbiome in populations with and without insecticide applications in Yucatan Mexico. *Biología*. En Prensa.

Bravo-Pérez D, González-Gómez JP, Pérez-Brito D, Hernandez-Zepeda C, Chaidez-Quiroz C, Minero-García Y, Moreno-Valenzuela O. Isolation and characterization of SIOphi-like phage from the digestive system of whiteflies. En elaboración.

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	1
CAPÍTULO I.....	3
ANTECEDENTES	3
1.1 Trips del aguacate	3
1.2 Mosquita blanca.....	7
1.3 Endosimbiontes bacterianos de insectos.....	10
1.4 Bacteriófagos.....	12
JUSTIFICACIÓN.....	20
HIPÓTESIS	20
OBJETIVO GENERAL.....	20
OBJETIVOS PARTICULARES	20
ESTRATEGIA EXPERIMENTAL	20
CAPÍTULO II.....	21
IDENTIFICACIÓN DE BACTERIAS PRESENTES EN EL SISTEMA DIGESTIVO DE LOS TRIPS Y LA MOSQUITA BLANCA.....	21
2.1 INTRODUCCIÓN.....	21
2.2 MATERIALES Y MÉTODOS.....	22
2.2.1 Recolecta de especímenes de trips y mosquita blanca	22
2.2.2 Aislamiento de bacterias intestinales.....	22
2.2.3 Extracción de ADN de las bacterias	24
2.2.4 Amplificación por PCR	25
2.2.5 Clonación	25
2.2.6 Análisis de secuencias.....	26
2.3 RESULTADOS.....	26
2.3.1 Trips del aguacate	26
2.3.2 Mosquita blanca.....	30
2.4 DISCUSIÓN	33
CAPÍTULO III.....	36
COMPOSICIÓN DEL MICROBIOMA DE MOSQUITA BLANCA EN POBLACIONES CON Y SIN APLICACIÓN DE INSECTICIDAS EN YUCATÁN MÉXICO	36
3.1 INTRODUCCIÓN	36
3.1 MATERIALES Y MÉTODOS.....	38

3.3 RESULTADOS	41
3.4 DISCUSIÓN	45
CAPÍTULO IV	49
AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DEL BACTERIOFAGO SIOPHI ESPECIFICO A <i>Bacillus licheniformis.</i>	49
4.1 INTRODUCCIÓN	49
4.2 MATERIALES Y MÉTODOS	50
4.3 RESULTADOS	54
4.4 DISCUSIÓN	58
5.1 DISCUSIÓN GENERAL	60
5.2 CONCLUSIÓN	61
5.3 PERSPECTIVAS	61
LITERATURA CITADA	63

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 2. 1 A) Disección de especímenes de trips. B) Maceración de abdómenes.....	23
Figura 2.2 Crecimiento de colonias de bacterias a partir de la maceración de abdómenes.	27
Figura 2.3 Visualización en gel de agarosa del ADN de las 12 cepas de bacterias obtenidas de trips. LD = HyperLadder 1, M=muestras (1-12).....	27
Figura 2. 4 Visualización en gel de la amplificación del fragmento del gen 16Sr del ADN de las 12 cepas bacterianas obtenidas de los trips. LD = HyperLadder 1.	28
Figura 2. 5 Visualización de los productos de PCR purificados de las 12 cepas bacterianas obtenidas de los trips. LD = HyperLadder 1.....	28
Figura 2. 6 Morfología de bacterias obtenidas de abdómenes de mosquita blanca.	30
Figura 2. 7 Amplificación por PCR del ADN de las cepas de bacterias obtenidas de la mosquita blanca.	31
Figura 2. 8 Visualización de los fragmentos purificados de las cepas de bacterias obtenidas de la mosquita blanca. Gel de agarosa al 1.5 %.	31
Figura 3. 1 Cladograma inferido con el método de Máxima Verosimilitud (ML) utilizando el gen mtCOI de Bemisia tabaci colectadas en Yucatán. Las secuencias utilizadas como referencias se etiquetan según su número de acceso GenBank.	41
Figura 3. 2 Curvas de rarefacción de bibliotecas de ambas muestras.	42
Figura 3. 3 Abundancia relativa de Phylum y familias en MB1 y MB2. Las secuencias que no podían estar en ningún grupo conocido se asignaron como "Unclassified".	43
Figura 3. 4 Abundancia relativa de géneros en MB1 y MB2.	44
Figura 3. 5 OTUs más abundantes en las muestras analizadas A) MB1, B) MB2.....	45
Figura 4. 1 Placas de lisis, uniformes, de forma circular de aproximadamente 0.1-0.5 mm de diámetro.....	55
Figura 4. 2 Microfotografía electrónica del fago SIOphi.....	55
Figura 4. 3 Estabilidad del fago SIOphi a diferentes temperaturas.....	56
Figura 4. 4 Viabilidad de fago SIOphi a diferentes pH.....	56
Figura 4.5 Cinética de crecimiento de la cepa <i>Bacillus licheniformis</i>	57
Figura 4. 6 Efecto del fago SIOphi sobre la cepa <i>Bacillus licheniformis</i>	58

ÍNDICE DE TABLA

Tabla 1. 1 Principales productores de aguacate en México	3
Tabla 1. 2 Principales municipios productores de aguacate en el estado de Michoacán	4
Tabla 1. 3 Principales hospederos de la mosquita blanca cultivadas en México.....	8
Tabla 1. 4 Clasificación de bacteriófagos (Ackerman, 2009).....	13
Tabla 2. 1 Bacterias identificadas del sistema digestivo de trips	29
Tabla 2. 2 Bacterias identificadas del sistema digestivo de mosquita blanca.....	32
Tabla 3. 1 Índices de diversidad alfa de bacterias del análisis de secuenciación del gen 16s rRNA de muestras de Bemisia tabaci	42
Tabla 4. 1 Cepas sometidas al rango de hospederos del fago SIOphi.....	57

ABREVIATURAS

PBS: buffer fosfato salino

TSA: medio triptona soya agar

TSB: caldo de triptona soya

ADN: ácido desoxirribonucleíco

PCR: reacción en cadena de la polimerasa

LB: medio Luria Bertani

X-Gal: 5-bromo-4-cloro-3-indolil-beta-D-galacto-piranósido

BLAST: basic local alignment search tool

RESUMEN

Los insectos contienen una microbiota intestinal que desempeña papeles importantes en muchos aspectos cruciales de su vida, como la nutrición, el desarrollo, el metabolismo y la resistencia a patógenos, por lo que es importante conocer la composición microbiana de ésta, principalmente si son plaga en la agricultura para poder tener alternativas para su manejo. Debido a lo anterior, se llevó a cabo el aislamiento y el cultivo de bacterias del sistema digestivo de insectos plaga como trips del aguacate y mosquita blanca. De ésta última también se estudió su metagenómica bacteriana y la búsqueda de bacteriófagos líticos para sus bacterias cultivables. La caracterización molecular de las bacterias cultivadas permitió identificar la presencia de *Weissella cibaria* y *Bacillus simplex* en trips del aguacate y *Bacillus licheniformis*, *Solibacillus silvestris*, *Paenibacillus lautus*, *Bacillus isronensis* y *Streptomyces* sp en mosquita blanca. El análisis metagenómico de mosquita blanca determinó la presencia del simbionte primario *Portiera* y los simbiontes secundarios *Cardinium*, *Hamiltonella* y *Fritschea* en ambas muestras analizadas. Se aisló el fago SIOphi, el cual es virulento para la bacteria *Bacillus licheniformis*, la temperatura óptima para su mayor replicación fue 20 °C y el pH óptimo fue de 7.0. El bacteriófago aislado en este estudio presenta características potenciales para su utilización en pruebas de fagoterapia, cuya técnica representa una alternativa al tratamiento con antibióticos de enfermedades bacterianas.

ABSTRACT

Insects contain a gut microbiota that plays important roles in many crucial aspects of their lives such as nutrition, development, metabolism, and resistance to pathogens; Therefore, it is important to know the microbial composition of these, especially if they are a pest in agriculture in order to have alternatives for their management. Due to the above, the isolation and culture of bacteria from the digestive system of pest insects such as avocado thrips and whiteflies was carried out; of the latter, its bacterial metagenomics and the search for lytic bacteriophages for its cultivable bacteria were also studied. The molecular characterization of the cultured bacteria determined the presence of *Weissella cibaria* and *Bacillus simplex* in avocado thrips and *Bacillus licheniformis*, *Solibacillus silvestris*, *Paenibacillus lautus*, *Bacillus isronensis* and *Streptomyces* sp in whiteflies. Whitefly metagenomics determined the presence of the primary symbiont *Portiera* and the secondary symbionts *Cardinium*, *Hamiltonella* and *Fritschea* in both samples analyzed. The SIOphi phage, which is virulent for the *Bacillus licheniformis* bacterium, was isolated. Its optimal temperature for further replication was 20 °C and the optimum pH was 7. The bacteriophage isolated in this study presents potential characteristics for its use in tests of phage therapy, whose technique represents an alternative to antibiotic treatment for bacterial diseases.

INTRODUCCIÓN

México es el séptimo productor mundial de frutas y hortalizas, con un total de 32 millones de toneladas anuales, su producción promedio es de aproximadamente 16.3 toneladas por Km², superando ampliamente lo conseguido por Estados Unidos de América (6.5 t/Km²) y Brasil (5.8 t/Km²) (Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura, FAO, siglas en inglés; El Economista, 2017). Entre las principales hortalizas y leguminosas que se producen en México se encuentran: el jitomate o tomate rojo, el aguacate, la cebolla blanca, el chile jalapeño, el tomate verde, la calabaza, el frijol y la soya (Inforural, 2019). El aguacate es uno de los productos más exitosos de la exportación agroalimentaria de nuestro país, a nivel mundial México es el principal exportador de este fruto (Statista, 2023).

Todos los cultivos son afectados por diversos factores como el clima, el tipo de suelo, la disponibilidad de agua y la fertilización. Sin embargo, el control de plagas y enfermedades representa una fuerte derrama económica, tanto en su prevención como en su control, lo que se refleja al momento de la cosecha en la inversión y en la ganancia del productor. Respecto a las plagas de importancia en el cultivo del aguacate, los trips (*Scirtothrips perseae* y *Frankliniella* spp.), empezaron a causar problemas en Michoacán, después de que en algunas regiones de este estado los huertos de aguacate se establecieron en zonas forestales (Johansen *et al.*, 1999). Las especies fitófagas obtienen su alimento penetrando con sus partes bucales picadoras-chupadoras en los tejidos vivos de brotes foliares y florales, así como en los frutos jóvenes. Al succionar el contenido celular, se rompen las células del tejido epidérmico, lo que ocasiona áreas necróticas, las cuales pueden ser invadidas por microorganismos fitopatógenos. En altas densidades, los trips pueden causar daños en hojas, flores y frutos: en hojas el enrollamiento y defoliación, en flores inhiben su fecundación y provocan su caída y cuando atacan a los frutos en etapa muy temprana, pueden llegar a causar cicatrices, malformaciones y caída de éstos (Ascención, 2000).

Los cultivos como el jitomate, el frijol, el chile, la calabaza y la soya tienen como una de sus principales plagas a la mosquita blanca, *Bemisia tabaci*, la cual está ampliamente distribuida en regiones tropicales y subtropicales del mundo, afecta a más de 600 especies de plantas al alimentarse del floema y los daños que causa pueden clasificarse como directos o indirectos. Los directos son el debilitamiento de la planta por la extracción de nutrientes por la alimentación, lo que también puede provocar problemas fisiológicos (como madurez irregular en fruto de tomate

y el plateado en cucurbitáceas), los daños indirectos los ocasionan al excretar sustancias azucaradas que favorecen el crecimiento de hongos sobre la planta (fumagina) y la transmisión de virus fitopatógenos como begomovirus (Geminiviridae) (Oliveira *et al.*, 2001; Jones, 2003; Cuellar y Morales, 2006).

El constante crecimiento de la población a nivel mundial genera un gran reto para la agricultura para proporcionar alimentos, lo cual implica un aumento en la producción y la búsqueda de soluciones para el control de plagas. La forma más común para controlar plagas es a través del uso de plaguicidas; sin embargo, el uso de estos productos ha provocado un aumento en la resistencia, así como un mayor impacto al medio ambiente, debido a la acumulación de sustancias tóxicas en el suelo, aguas superficiales y mantos acuíferos (AINIA, 2016). Para el control de plagas en los cultivos, actualmente se está dando especial atención al Manejo Integrado de Plagas, lo cual es una estrategia que usa una gran variedad de métodos complementarios, dentro de los que se encuentran los de tipo físico, mecánico, químico, biológico, genético, legal y cultural. Esta estrategia tiene como objetivo reducir o eliminar el uso de plaguicidas, antibióticos y así minimizar el impacto que estos generan al medio ambiente (Barrera-Gaytán, 2015).

Una tecnología prometedora para el control de plagas es el uso de los bacteriófagos, los cuales son enemigos naturales de las bacterias. Los bacteriófagos son capaces de infectar y matar las principales bacterias responsables de enfermedades en plantas (AINIA, 2016). Se ha reportado que en insectos las comunidades bacterianas desempeñan funciones importantes en muchos aspectos cruciales de la vida de sus hospederos, por ejemplo, nutrición, desarrollo, defensa contra patógenos, interacciones de la comunidad y supervivencia en ambientes hostiles al metabolizar las toxinas (Adams *et al.*, 2010; Dillon y Dillon, 2004; Douglas, 2009). Por lo anterior, el uso de bacteriófagos es una herramienta prometedora para el control de poblaciones de insectos plaga a través de la supresión de los principales simbiontes bacterianos intestinales, por lo que el objetivo del presente estudio es la identificación de bacterias del sistema digestivo de trips y mosquita blanca y la búsqueda de bacteriófagos virulentos para las bacterias cultivables.

CAPÍTULO I

ANTECEDENTES

1.1 Trips del aguacate

Importancia económica del aguacate

México en los últimos 60 años ha incrementado exponencialmente la plantación, producción y exportación de aguacate, su oferta cada vez es mayor en el mercado internacional, se estima que en las exportaciones el aguacate se coloca en tercer lugar solo detrás del jitomate y la cerveza (Díaz, 2021; Cruz *et al.*, 2022). A nivel mundial, nuestro país es el primer productor de aguacate, con una producción en el 2021 de 2,442,944 toneladas, seguido de Colombia (979,617 t), Perú (777,095 t), Indonesia (669,260 t) y República Dominicana (634,368 t) (FAO, 2023). En nuestro país existen sembradas 252,132.86 ha, con un rendimiento promedio de 10.76 t/ha y un valor de producción de \$63 mil millones de pesos, siendo Michoacán el principal estado productor, seguido por Jalisco y el Estado de México (SIAP, 2023) (Tabla 1.1).

Tabla 1. 1 Principales productores de aguacate en México

Estado	Michoacán	Jalisco	Edo. México	Nayarit	Morelos
Producción (t)	2,252,783	323,228	132,478	76,587	53,545
Superficie (ha)	186,713	29,618	12,936	8141	5813
Rendimiento (t/ha)	12.23	12.02	11.56	10.54	9.39

SIAP, 2023

Dentro del estado de Michoacán, el municipio de Tancítaro es el principal productor de aguacate (Tabla 1.2).

Tabla 1. 2 Principales municipios productores de aguacate en el estado de Michoacán

Municipio	Tacámbaro	Tancítaro	Salvador Escalante	Ario	Uruapan
Producción (t)	311,142	303,620	249,975	239,965	219,011
Porcentaje	16.92	11.80	13.51	11.92	11.69

SIAP, 2023

Problemas fitosanitarios del aguacate

Los problemas fitosanitarios del aguacate se dividen en dos tipos: los de importancia económica y los cuarentenarios. Los de importancia económica son los que se encuentran distribuidos en todas las zonas aguacateras como la roña, la antracnosis, los trips, la araña roja, las plantas parásitas, entre otras, que disminuyen la calidad de la fruta y que afectan al productor (CESAVEM, 2010). Las cuarentenarias son plagas que limitan la movilización y comercialización de la fruta, la cual está sujeta a un estricto control, con base a la Norma Oficial Mexicana NOM-066-FITO-2002, Especificaciones para el manejo fitosanitario y movilización del aguacate (CESAVEG, 2008). En México, las plagas reglamentadas del aguacate son el barrenador de las ramas del aguacatero *Copturus aguacatae* (Kissinger), el barrenador pequeño del hueso del aguacate *Conotrachelus perseae* (Barber) y *C. aguacatae* (Barber), el barrenador grande del hueso del aguacate *Heilipus lauri* (Boheman) y la palomilla barrenadora del hueso *Stenomacatanifer* (Walsingham), las cuales fueron la causa que originó la implementación de la cuarentena impuesta por el gobierno de Estados Unidos de América en 1912 al aguacate mexicano (SENASICA, 2019).

Importancia de los trips

Los trips adultos y las larvas dañan las plantas debido a que succionan la savia y también porque algunas especies son vectores de tospovirus. Las especies fitófagas de trips succionan el contenido celular de los tejidos vivos de las plantas, con sus partes bucales picadoras-chupadoras, por lo que la ruptura de las células del tejido epidérmico provocan áreas necróticas, causando daños principalmente cuando se alimentan de frutos en estado recién amarrado o de tamaño “cerillo” o “canica”, en los cuales provocan deformaciones en la superficie del pericarpio en forma de protuberancias o crestas, deformaciones que son más evidentes en los frutos

maduros. Las heridas en los frutos favorecen la aparición de enfermedades como la roña del fruto, causada por el hongo *Sphaceloma perseae* Jenkins. (Ascensión *et al.* 1999; González *et al.* 2007).

Características de los trips

Las larvas y los adultos presentan partes bucales asimétricas, en la que la mandíbula derecha no está desarrollada más allá del esclerito basal. El nombre ordinal “Thysanoptera” que es el orden al que pertenecen, se deriva de unas palabras griegas que significan “alas con fleco” y se refiere a las alas estrechas que poseen los trips adultos, aunque muchos de éstos carecen de alas. El tarso de los trips carece de la uña típica, la cual sí está presente en los demás insectos. En su lugar lleva un arolio reversible adhesivo (Goldarazena, 2006).

Los trips son uno de los grupos de insectos alados más pequeños, pues miden entre 0.5 y 13 mm. El cuerpo es alargado, casi cilíndrico, de coloración variable entre el negro y el amarillo pálido, pasando por distintas tonalidades de castaño. Los adultos pueden ser alados o ápteros. Las alas son largas, estrechas, con sedas o cilios largos en los bordes. Tienen la cabeza asimétrica, de base cuadrangular y terminada en un cono. Presentan aparato bucal picador-chupador, con importantes adaptaciones según el tipo de alimentación (Lacasa y Lloréns, 1996). Las antenas están formadas por 6 a 9 artejos, con elementos sensoriales diferenciados. El tórax presenta el protórax diferenciado y con autonomía en los movimientos con relación a los otros dos segmentos. Las patas son cortas, terminan en uno o dos tarsos, con un arolio en forma de vesícula, retráctil, que sirve como órgano de adherencia. El abdomen está formado por 11 segmentos, aunque el último está reducido a un pequeño esclerito. El extremo es cónico en las especies del suborden Terebrantia y en forma de tubo el último segmento en las del suborden Tubulífera (Mound y Marullo, 1996). Los trips tienen especies fitófagas, depredadoras, polinizadoras, micófagas (Mound y Teulon, 1995) y parasitoides (Johansen y Mujica, 1996).

Biología de los trips

Los trips del Suborden Terebrantia presentan seis etapas en su desarrollo: huevo, dos estadios larvales, prepupa, pupa y adulto. En los del Suborden Tubulífera son siete etapas: huevo, dos larvales, primipupa, prepupa, pupa y adulto. Las hembras de los Terebrantia tienen un ovipositor falciforme, que les permite incrustar los huevos en el tejido vegetal, mientras que las de los Tubulífera las depositan sobre el sustrato al carecer de ovipositor. El huevo es oval y alargado u oblongo, adoptando diferentes formas según las especies. En los Terebrantia tiene la superficie

del corión lisa y es generalmente reniforme; en cambio en los Tubulifera son elipsoidales, más o menos alargados y en algunos casos con una prominencia en el polo. En ocasiones tienen la superficie de corion con reticulaciones (Lacasa y Lloréns, 1996; Bournier, 1983).

Los estados larvarios son parecidos a los adultos, pero carecen de paquetes de alares y ocelos. Su coloración es muy variable; en general en los Terebrantia predomina el color blanco o los tenues, mientras en los Tubulifera son frecuentes los amarillos, anaranjados o rojizos (Lacasa y Lloréns, 1996).

Métodos de manejo y control de trips

Control cultural. Es recomendable mantener bien nutrida a la planta para obtener mejores cosechas, sin embargo, esta condición favorece la presencia del insecto. Se recomienda realizar monitoreos permanentes, sacudir flores o follaje de la planta sobre una superficie de color claro que permita determinar la presencia de trips para realizar los conteos. Cuando exista una alta infestación, se recomienda incrementar la humedad relativa, realizar un control oportuno y adecuado de las malezas dentro del huerto y alrededor de éste y podar las ramas o estructuras dañadas por trips (Coria, 2009; ICA, 2012).

Control químico. Esta sigue siendo la principal estrategia para el combate de plagas, principalmente porque el mercado de exportación hacia E.U.A es el más atractivo, ya que no acepta frutas con síntomas del ataque del insecto y los insecticidas sintéticos presentan mayor impacto sobre las poblaciones de las plagas. Sin embargo, se deben aplicar insecticidas específicos para el control de plagas específicas, con ello se debe elaborar un plan de aplicaciones donde se utilicen diferentes ingredientes activos, siguiendo las recomendaciones del asistente técnico y de la etiqueta del producto, además de considerar los umbrales de acción recomendados para estas plagas para cada región. Al respecto se debe consultar la lista de productos autorizados por la Dirección General de Sanidad Vegetal en el cultivo de aguacate y de los recomendados por el APEAM (Coria, 2009; ICA, 2012; APEAM, 2021).

Control biológico. En México se han reportado una gran diversidad de organismos que atacan a las poblaciones de trips y a otras plagas del aguacate. Algunos parasitoides que impactan de manera importante sobre los huevos de los trips son las avispas *Megaphragma mymaripenne* y *Triponius semiluteus*, esta última está disponible comercialmente. Existen también cinco especies depredadoras de trips que son *Franklinothrips vespiformis*, *F. lineatus*, *F. orizabensis*, *Watsoniella flavipes* y *Leptothrips mali*. Además de las anteriores, se ha observado impacto sobre la plaga

por los depredadores conocidos como “chinche pirata” del género *Orius* y por “crisopas” como *Chrysoperla rufilabris* y *C. carnea*. En México se han encontrado de manera natural en los huertos de aguacate a los depredadores *Aeolothrips mexicanus*, *F. vespiformis* y *Leptothrips mcconnelli* (Coria, 2009).

1.2 Mosquita blanca

Importancia económica de hortalizas y leguminosas

De acuerdo a datos del 2018, el tomate es la principal hortaliza que se produce en el mundo, con un total de 182,256,458 toneladas, la segunda más producida es la cebolla (102,242,258 t) y la tercera el pepino (75,219,440 t). Los principales países productores de hortalizas son China, con un volumen de producción de casi 551.5 millones de toneladas, India (128.24 millones de t) y Estados Unidos de América (31.74 millones de t). México se ubica en el séptimo lugar con 16.17 millones de t (FAO, 2020). En lo que se refiere a las leguminosas, el frijol es el más importante para consumo directo y constituye una fuente de desarrollo en el mundo. En México es la leguminosa con más superficie sembrada (SIAP, 2023).

Problemas fitosanitarios de hortalizas

El control de plagas en las hortalizas es muy importante, se estima que en promedio la inversión es de aproximadamente el 25 % del costo total de producción. Los daños que pueden ocasionar son diversos, en hojas se puede tener problemas con gusanos, minadores de hojas y diabroticas; en tallos se presentan gusanos trozadores y barrenadores; en raíz por gallina ciega, gusanos de alambre y nematodos; en frutos por gusanos, mosquita blanca, chinches y picudos; en flores el daño puede ser por trips, diabroticas y mayates. Como transmisores de virus se presentan la mosquita blanca, la paratrioza, las chicharritas, los trips, etc. (Martínez de la Cerda, 2020).

Importancia de la mosquita blanca (*Bemisia tabaci*)

La mosquita blanca *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae), es una de las plagas más ampliamente distribuidas en regiones tropicales y subtropicales del mundo, afecta más de 600 especies de plantas cultivadas y silvestres, de las cuales se alimenta del floema. Los daños que causa pueden clasificarse como directos o indirectos. Los directos son el debilitamiento de la planta por la extracción de nutrientes por la alimentación, lo que también puede provocar problemas fisiológicos (como madurez irregular en fruto de tomate y plateado en cucurbitáceas). Los daños indirectos los ocasionan al excretar sustancias azucaradas que favorecen el

crecimiento de hongos sobre la planta (fumagina) y mediante la transmisión de virus fitopatógenos como los begomovirus (Geminiviridae) (Oliveira *et al.*, 2001; Jones, 2003; Cuellar y Morales, 2006). En México se cultivan en grandes extensiones algunos de los principales hospedantes de la mosquita blanca (Tabla 1.3).

Tabla 1. 3 Principales hospederos de la mosquita blanca cultivadas en México

Cultivo	Frijol	Algodón	Soya	Chile	Papa	Tomate	Sandía
Sup. (Ha)	1,091,125	134,049	95,527	173,869	62,440	49,522	43,425

SIAP, 2023

Características de la mosquita blanca

La mosquita blanca pertenece al Orden Hemíptera, donde también se encuentran los pulgones, las escamas y las cochinillas. Es un insecto pequeño que mide en estado adulto de 0.8 a 1.5 mm de longitud, tiene cuerpo amarillo y alas blancas, su nombre común de mosquita blanca proviene de la cera blanca que cubre sus alas. En estado biológico de ninfa y adulto se alimenta de la savia de las plantas, tiene aparato bucal de tipo picador chupador, lo cual le permite perforar el tejido de la planta (Sela, 2018).

Biología de la mosquita blanca

La hembra ovíparosita individualmente o en grupos sobre la superficie de la hoja, raramente son puestos en círculo; los huevos son de color blanco amarillento, tornándose marrón dorado cuando van a eclosionar. Su primer instar ninfal es un estado de desarrollo activo en locomoción y se desplaza en busca de un lugar adecuado para la alimentación y ahí se establece, a este primer instar se le llama caminante. Al fijarse la ninfa del primer instar inserta su estilete en la hoja, para alimentarse y permanece en este sitio durante dos instares ninfales más, al terminar el tercer instar pasa a un estado de inactividad y latencia llamado pupa, durante el cual no se alimenta hasta llegar al estado adulto. Al emerger los adultos se aparean y empiezan a ovipositar un día después de la copulación y continúan haciéndolo por un periodo de 13 a 19 días (Carapia-Ruiz y Castillo-Gutiérrez, 2013; CESAVESON, 2020).

Métodos de manejo y control de la mosquita blanca

Control cultural. Algunas prácticas culturales que se recomiendan para el manejo de problemas relacionados con mosquita blanca como plaga directa o vector de virus son: manejo de época de siembra, rotación de cultivos, manejo del agua, manejo de malezas, destrucción de residuos de cosecha, protección física de semilleros, protección física de cultivo. Las últimas prácticas mencionadas requieren materiales especiales, por ejemplo, el uso de túneles tiene un costo que puede representar del 15 al 20 % del costo total de un cultivo como el tomate, por lo que se recomienda que este tipo de práctica se utilice cuando el precio del producto es bueno (Morales *et al.*, 2006).

Control genético. El mejoramiento genético ha traído grandes beneficios en las últimas décadas. En el cultivo de frijol se ha realizado mejoramiento genético para obtener plantas resistentes a virus transmitidos por mosquita blanca como el mosaico enano, mosaico dorado, mosaico dorado amarillo y mosaico (Cuellar y Morales, 2006).

Control químico. Generalmente en las plagas que ocasionan daño directo, la aplicación de insecticidas (imidacloprid, tiametoxan, etc) está determinada por el umbral de acción; sin embargo, en el caso de un insecto vector de virus, no se puede usar el concepto de umbral, basta con unas moscas virulíferas para iniciar la infección en el cultivo. Es recomendable que la protección con insecticidas al cultivo se realice con un insecticida sistémico al momento de la siembra o trasplante antes de que las plantas se expongan a mosquitas virulíferas (Morales *et al.*, 2006). Es importante conocer el tiempo de protección del producto aplicado, así como las condiciones para que el producto actúe eficientemente.

Los insecticidas de contacto reducen las poblaciones de adultos de mosquita blanca, pero no afectan los huevos o estados inmaduros, lo que hace que los agricultores apliquen insecticidas con mayor frecuencia, por lo que ha desarrollado resistencia a organofosforados, carbamatos y piretroides de contacto y de acción sistémica.

Control biológico. Este tipo de control de la mosquita blanca es realizado por depredadores de las familias Chrysopidae y Coniopterygidae (Neuroptera), Drosophilidae, Cecidomyidae y Sirphidae (Diptera), Coccinellidae (Coleoptera) (Hernández y Camero, 2000), Miridae (Hemiptera) (Sánchez *et al.*, 2003); parasitoides del Orden Hymenoptera entre los que destacan avispas de

los géneros *Amitus*, *Encarsia*, *Eretmocerus* (Vázquez, 2002) y hongos entomopatógenos *Beauveria*, *Paecilomyces* y *Verticillium* (Ortiz-Catón *et al.*, 2011). Los depredadores y parasitoides no son muy efectivos debido al uso intensivo de plaguicidas, por lo que se debe minimizar el uso de estos y conseguir un equilibrio ecológico para que estos enemigos naturales tengan efectividad. La limitante de los hongos entomopatógenos en campo es la falta de humedad en periodos secos, que es cuando las mosquitas blancas alcanzan su máxima población (Morales *et al.*, 2006).

1.3 Endosimbiontes bacterianos de insectos

Se ha reportado que las comunidades bacterianas desempeñan papeles importantes en muchos aspectos cruciales de la vida de sus hospederos, por ejemplo, nutrición, desarrollo, defensa contra patógenos, interacciones de la comunidad y supervivencia en ambientes hostiles al metabolizar las toxinas (Adams *et al.*, 2010; Dillon y Dillon, 2004; Douglas, 2009). En la clase Insecta hay varias bacterias asociadas a especies diferentes de insectos en todos los órdenes; a las asociaciones permanentes entre bacterias y organismos superiores se denominan simbióticos y el tipo de simbiosis depende del huésped particular, el simbiote y las condiciones ambientales (Boucher *et al.*, 1982; Bronstein, 1994).

Los endosimbiontes bacterianos de los insectos se clasifican en primarios (P-endosimbiontes) y secundarios (S-endosimbiontes). El papel principal de los primeros es proporcionar aminoácidos esenciales, vitaminas y nutrientes que faltan en la dieta del insecto hospedero (Aksoy, 2000; Shigenobu *et al.*, 2000). El papel de los endosimbiontes secundarios está relacionado con la adaptación del hospedero, especialmente aspectos de la supervivencia, la capacidad competitiva y la resistencia contra enemigos naturales y plaguicidas (Oliver *et al.*, 2012; Scarborough *et al.*, 2005; Hedges *et al.*, 2008).

Los insectos herbívoros que tienen aparato bucal picador-chupador, tienen como única fuente de alimento a la savia de las plantas, la cual tiene una composición pobre de aminoácidos y a menudo sin muchos aminoácidos esenciales. La estrategia de este tipo de insectos consiste en asociarse con endosimbiontes bacterianos, que son organismos simples, pero bioquímicamente más completos que los insectos y les proporcionan todos o casi todos los aminoácidos esenciales que necesitan para la síntesis de proteínas. Algunas de estas bacterias proporcionan nutrientes críticos en dietas nutricionalmente limitadas o desequilibradas de los insectos y están obligatoriamente asociadas con su anfitrión, a estos se les llama endosimbiontes primarios (Zchori-Fein y Bourtzis, 2011; Beitia *et al.*, 2015).

Endosimbiontes bacterianos en trips

Los trips en general han recibido relativamente poca atención con respecto a sus comunidades bacterianas. En *Frankliniella occidentalis* se han centrado en estudiar en gran medida a la bacteria encontrada con mayor frecuencia (identificada como una especie cercana a *Erwinia*), otras especies de las que se reporta su microbiota son *Aptinotrips rufus*, *Thrips tabaci*, *Scirtothrips dorsalis*, *F. fusca* y *F. tritici*. La flora bacteriana de *Frankliniella occidentalis*, uno de los principales trips como plagas de cultivos y como vector de virus, fue analizada mediante filogenia molecular basada en el gen 16S RNAr y análisis bioquímico. Los resultados mostraron a dos grupos distintos de bacterias, el primer grupo de acuerdo con el análisis filogenético tiene una ascendencia compartida con *Erwinia*, mientras el segundo grupo es cercano a *Escherichia coli*, aunque para este último se sugiere realizar estudios con genes adicionales para la determinación clara de sus relaciones ancestrales (Chanbusarakum y Ullman, 2008).

En *Aptinotrips rufus* la asexualidad es inducida por endosimbiontes, principalmente por *Wolbachia* y otras bacterias que manipulan la reproducción del huésped; sin embargo, solo el 69 % de las hembras asexuales están infectadas con *Wolbachia*, lo que también hace pensar que otras bacterias desconocidas manipulan la reproducción del hospedero (Kooi y Schwander, 2014).

En *Thrips tabaci* se estudiaron los endosimbiontes bacterianos y se reportaron altas cantidades de bacterias en la mayoría de los individuos estudiados. Al igual que en *F. occidentalis* se encontró una bacteria que superaba claramente a todos los otros tipos presentes en el intestino, esta bacteria se identificó como una especie de *Erwinia*; sin embargo, sus características bioquímicas y la secuencia del 16 DNAr diferían de las bacterias de *F. occidentalis* reportadas previamente (de Vries *et al.*, 2008).

Endosimbiontes bacterianos en mosquita blanca

Las 37 especies crípticas actualmente reconocidas de *B. tabaci* contienen simbiosis bacterianos primarios como *Portiera*, así como siete simbiosis secundarios pertenecientes a los géneros de *Arsenophonus*, *Cardinium*, *Fritschea*, *Hamiltonella*, *Hemipteriphilus*, *Rickettsia* y *Wolbachia*. Estos simbiosis no se encuentran en todos los individuos que pertenecen a una población. Al género *Wolbachia* se le ha encontrado en especímenes de Asia, Australia, África y América (De Barro *et al.*, 2011; Wang *et al.*, 2019).

Todas las especies crípticas de *B. tabaci* contienen al endosimbionte primario (*Candidatus Portiera aleyrodidarum*), debido a que este se transmite verticalmente de la madre a su descendencia y se ha demostrado que han evolucionado en paralelo con sus anfitriones de insectos por millones de años (Baumann *et al.*, 2006; Wilson *et al.*, 2010).

1.4 Bacteriófagos

Los bacteriófagos fueron descritos por primera vez por Frederick Twort en 1915, en el Reino Unido y posteriormente en 1917 por Felix d'Herelle en Francia. Este último les dio el nombre de bacteriófagos, por su capacidad de lisar bacterias (del griego phagein: "comer"). Los bacteriófagos son los entes biológicos más abundantes sobre la tierra, se estima un total de 10^{30} a 10^{32} en todo el planeta y desempeñan un papel importante en el balance de los ecosistemas bacterianos (Goyal, 2006, Kutter & Sulakvelidze, 2005).

Los bacteriófagos (o fagos) tienen material genético en forma de ADN bicatenario (dsDNA, la gran mayoría), ADN monocatenario (ssDNA), ARN monocatenario (ssRNA) y ARN bicatenario (dsRNA; muy raro), encapsidado por una cubierta proteica (Ackermann, 2009; Clark y March, 2006). Como todos los virus, son metabólicamente inertes en su forma extracelular y dependen de la colonización en un hospedero para replicarse (Weinbauer 2004; Ackermann 2006).

La cápside está unida a una cola que tiene fibras, que utiliza para unir los receptores en la superficie de las células bacterianas. La mayoría de los fagos tienen cápside poliédrica, excepto los fagos filamentosos (Ackermann, 1998). Los fagos de cola constituyen el grupo más grande y pertenecen al orden Caudovirales (Weinbauer 2004; Ackermann 2006). Existen 14 familias de fagos, que se clasifican de acuerdo con la naturaleza de su genoma y a sus características morfológicas (Tabla 1.4). De los aproximadamente 5,500 bacteriófagos analizados por microscopía electrónica, los fagos con cola representan el 96 % del total. Dentro de este grupo, la distribución es de 60.8 % de la familia Siphoviridae, 25.1 % familia Myoviridae y 14.1 % de la familia Podoviridae (Ackermann, 2001; Ackermann, 2009).

Tabla 1. 4 Clasificación de bacteriófagos (Ackerman, 2009).

Familia	Género	Ácido nucleico	Forma	Particularidades	Miembros
Myoviridae	6	dsDNA (L)	Con cola	Cola contráctil	1,320
Siphoviridae	7			Cola larga, no contráctil	3,229
Podoviridae	4			Cola corta	771
Microviridae	4	ssDNA (C)	Poliédrico	Capsómeros conspicuos	40
Corticoviridae	1	dsDNA (C, S)	Poliédrico	Cápside compleja, lípidos	3?
Tectiviridae	1	dsDNA (L)	Poliédrico	Doble cápside, lípidos, pseudocola	19
SH1*		dsDNA (L)	Poliédrico	Doble cápside, lípidos	1
STIV*		dsDNA (C)	Poliédrico	Protuberancias en forma de torreta	1
Leviviridae	2	ssRNA (L)	Poliédrico	Tipo poliovirus	39
Cystoviridae	1	dsRNA (L, M)	Poliédrico	Envoltura, lípidos	3
Inoviridae	2	ssDNA (C)	Filamentoso	Filamentos largos, barras cortas	67

Lipothrixviridae	4	dsDNA (L)	Filamentoso	Envoltura, lípidos	7
Rudiviridae	1	dsDNA (L)	Filamentoso	Varillas rígidas, tipo TMV	3
Plasmaviridae	1	dsDNA (C,S)	Pleomórfico	Envoltura, no cápside, lípidos	5
Fuselloviridae	1	dsDNA (C,S)	Pleomórfico	Forma de limón, envoltura, lípidos	11
—	1**	dsDNA (C,S)	Pleomórfico	Forma de envoltura, lípidos	1
Guttaviridae	1	dsDNA(C,S)	Pleomórfico	En forma de gota	1
Ampullaviridae*		dsDNA (L)	Pleomórfico	NC helicoidal en forma de botella	1
Bicaudaviridae*		dsDNA (C)	Pleomórfico	Dos colas, ciclo de desarrollo, NC helicoidal	1
Globuloviridae*		dsDNA(L)	Pleomórfico	Envoltura, esférico, lípidos, NC helicoidal	1

C: circular; L: lineal; M: multipartito; NC: nucleocápside; S: superenrollado; —: sin nombre, *: no clasificado; **: género Salterprovirus. La columna de miembros, indica el número de fagos examinados por microscopía electrónica, excluyendo bacteriocinas similares a fagos y fagos defectuosos conocidos.

Durante la infección, un fago se adhiere a la membrana plasmática de una bacteria e inserta su material genético en la célula. Después de eso, el fago generalmente sigue uno de los dos ciclos de vida: lítico o virulento y lisogénico o temperado. Los bacteriófagos líticos se hacen cargo de la maquinaria de la célula para fabricar los componentes que ellos requieren, luego destruyen o lisan la célula matando a sus hospederos y liberando nuevas partículas del bacteriófago. Los bacteriófagos lisogénicos incorporan su ácido nucleico en el cromosoma de la célula del

hospedero y se replican con él como una unidad sin destruir la célula, replicándose en él durante muchas generaciones, o bien, entran en un estado quiescente en la célula. El ADN del bacteriófago en este estado reprimido se le conoce como profago, porque no es un fago, pero posee el potencial para producir fagos. Bajo ciertas condiciones, los bacteriófagos lisogénicos pueden ser inducidos a seguir un ciclo lítico (Inal, 2003; Haq *et al.*, 2012; Enciclopedia Británica, 2018).

Ventajas de los bacteriófagos

La principal ventaja de los bacteriófagos es su especificidad para las bacterias objetivo, lo que reduce en gran medida el daño a la flora normal del hospedero. La bacteria objetivo debe identificarse primero o, de lo contrario, debe utilizarse un cóctel de bacteriófagos. Los bacteriófagos son autolimitados, es decir, requieren que su hospedero se reproduzca constantemente; si los patógenos bacterianos para los que son específicos están ausentes, no persistirán el tiempo suficiente en el medio (Clark y March, 2006). La replicación en el sitio de la infección es otra ventaja de los fagos, además de que son seguros con ningún o pocos efectos secundarios (Häusler, 2006, Sulakvelidze *et al.*, 2001).

Desventajas de los bacteriófagos

Algunos problemas que pueden llegar a presentarse al usar terapia de bacteriófagos como agentes de biocontrol, son el desarrollo de resistencia a estos, así como las bacterias pueden volverse resistentes a los antibióticos, también pueden volverse resistentes a los fagos por una variedad de mecanismos, como la modificación de los receptores de la superficie del fago en la célula bacteriana, la conversión mucoidía, la integración del genoma del fago en el cromosoma bacteriano, los sistemas de restricción-modificación, los sistemas CRISPR/Cas, BREX, DISARM (Svircev *et al.*, 2018; Scanlan *et al.*, 2015; Tock y Dryden, 2005; Mojica *et al.*, 2005; Barrangou *et al.*, 2007; Goldfarb *et al.*, 2015; Ofir *et al.*, 2018; Doron *et al.*, 2018). Otro obstáculo potencial con el uso de fagos es la producción de bacteriófagos lisógenos y pseudolisógenos, la persistencia del genoma en la célula hospedero proporcionaría una inmunidad de superinfección que negaría la eficacia de la sustancia biológica y posiblemente confiera características nuevas a la bacteria objetivo; un tercer problema para el uso de bacteriófagos es que podrían fungir como vectores de elementos genéticos móviles, incluidos los genes de resistencia a antibióticos (Svircev *et al.*, 2018; Muniesa *et al.*, 2013a, b).

Uso como agentes de biocontrol en la agricultura

Actualmente el desafío de la agricultura para proporcionar alimentos a una población mundial que va en constante aumento representa un gran reto. Para aumentar la producción de una gran cantidad de alimentos, se han utilizado antibióticos ampliamente para mitigar pérdidas causadas por bacterias; sin embargo, se ha observado que la resistencia a los antibióticos representa una amenaza a la agricultura (Svircev *et al.*, 2018). Los bacteriófagos se han estudiado ampliamente como agentes de biocontrol contra enfermedades bacterianas en animales y plantas; así también, se han propuesto como una alternativa de control de la población bacteriana resistente a antibióticos. La característica de los bacteriófagos de ser específicos los convierte en agentes antimicrobianos muy prometedores (Svircev *et al.*, 2018; Ribeiro *et al.*, 2019).

Bacteriófagos en enfermedades fitopatógenas

A nivel mundial, las bacterias fitopatógenas causan enfermedades potenciales, lo cual afecta a la economía del agricultor, comparado con hongos y virus, ocasionan relativamente menores daños y costos económicos (Vidhyasekaran 2002; Kennedy y Alcorn 1980). En las plantas se observan daños como manchas, mosaicos, pústulas en hojas y frutos, pudriciones malolientes de tubérculos y pueden llegar a causar hasta su muerte. Otras bacterias causan distorsión en hojas y tallos (fasciación), agalla de corona y proliferación de células vegetales que producen un abultamiento en el cuello de las plantas y sus raíces; sin embargo, muchas plantas hospedan fitopatógenos sin desarrollar síntomas (Vidaver y Lambrecht, 2004).

Dentro de los estudios realizados con el uso de bacteriófagos para controlar enfermedades bacterianas en plantas, la primera evidencia experimental fue con el patógeno de la pudrición negra en brasicas *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. Posteriormente contra la pudrición blanda en papa *Pectobacterium atrosepticum* se demostró que la exposición a fagos impedía el desarrollo de la enfermedad (Mallmann y Hemstreet, 1924; Kotila y Coons, 1925). La primera prueba en campo para el uso de bacteriófagos fue contra el patógeno del marchitamiento bacteriano del maíz *Pantoea stewartii*, mediante pretratamiento de semillas de maíz (Thomas, 1935).

Otras enfermedades bacterianas en las que se han evaluado bacteriófagos como agentes de control biológico son: pudrición blanda del tubérculo de la papa (*Dickeya solani* y *Pectobacterium* spp.), marchitez bacteriana en tomate (*Ralstonia solanacearum*), mancha foliar bacteriana del tomate (*Xanthomonas perforans*), peca bacteriana (*Pseudomonas syringae*), cancro asiático de

los cítricos (*Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*), mancha bacteriana de los cítricos (*Xanthomonas axonopodis* pv. *citrumelo*), enfermedad de Pierce (*Xylella fastidiosa* subsp. *fastidiosa*) y tizón de fuego (*Erwinia amylovora*) (Svircev *et al.*, 2018).

Bacteriófagos contra insectos

En insectos, se ha estudiado el uso de bacteriófagos para diferentes objetivos: 1) Control de bacterias que son patógenas para el insecto, 2) Supresión de poblaciones de principales simbiontes intestinales del insecto, 3) Modelo de infección de bacteriófagos en insectos con patógenos de humanos.

La Loque americana es una de las enfermedades bacterianas más devastadoras en la apicultura, que afecta a larvas de abejas (*Apis mellífera*) a nivel mundial. Esta enfermedad contagiosa es causada por la forma vegetativa de la bacteria Gram-positiva *Paenibacillus larvae* y se dispersa fácilmente a través de sus esporas altamente resistentes, la forma esporulada de la bacteria soporta temperaturas extremas, la exposición a desinfectantes, tolera a los antibióticos comúnmente usados y puede permanecer latente durante años (Hansen y Brødsgaard, 1999; Lindström *et al.*, 2008). El manejo de esta bacteria en las colmenas infectadas representa un gran desafío, debido a que los derivados (miel, propóleo, jalea real, veneno y polen de abeja) no pueden comercializarse si están contaminados con antibióticos, además de la resistencia a estos (Alippi *et al.*, 2007; Tian *et al.*, 2012; Pasupuleti *et al.*, 2017).

Para evitar el uso de antibióticos en colmenas por el problema que representa en el control de *P. larvae*, se han realizado esfuerzos para explorar el potencial de la terapia con fagos para el tratamiento de la Loque americana. Algunos fagos que se han evaluado son phiBB_PI23, F, WA, XIII, HB10c2, ATCC-49843, ATCC-25368, ATCC-25367, ATCC-25747, ATCC-49843, T1, T4, T7 y cocteles de fagos (Oliveira *et al.*, 2013; Beims *et al.*, 2015; Ghorbani-Nezami *et al.*, 2015; Yost *et al.*, 2016; Brady *et al.*, 2017). La aplicación de estos fagos se ha hecho principalmente por aspersión a las colmenas y se ha observado que sirve como protección y las rescatan de la infección de *P. larvae*. La mejor forma para hacer llegar los fagos a las larvas podría ser a través de la alimentación de abejas adultas, porque de esta manera se ocasiona un menor desperdicio de fagos; sin embargo, la cantidad de partículas viables encontradas en las larvas parece ser muy baja para poder reducir la carga de *P. larvae* y así controlar la Loque americana (Ribeiro *et al.*, 2019).

El uso de antibióticos por ingestión, inyección o como tratamiento de esterilización a la superficie de huevos de insectos suprime o elimina los simbioses intestinales, lo que resulta en un aumento en la tasa de mortalidad, crecimiento más lento, tamaño corporal reducido y una coloración anormal del cuerpo de sus respectivos hospederos (Fikatsu *et al.*, 2002; Kikuchi *et al.*, 2007; Boucias *et al.*, 2012; Bistolas *et al.*, 2014). Sin embargo, después de un largo periodo de uso los antibióticos pueden llegar a presentar resistencia. También se ha observado que los efectos que estos producen son tóxicos, pero no letales para el hospedero, por lo que una opción para eliminar los simbioses intestinales es el uso de fagos (Xu *et al.*, 2016).

La chinche de los pastos o chinche del sur *Blissus insularis*, es la principal plaga del pasto San Agustín *Stenotaphrum secundatum* y se ha reportado el rápido desarrollo de resistencia contra los principales insecticidas usados para su control, como es el caso de bifentrina en Florida EE.UU (Kerr, 1956; Cherry y Nagata, 2005). En este insecto se evaluó el bacteriófago BiBurk16MC_R aislado del suelo, contra *Burkholderia* uno de sus principales simbioses del intestino medio. La administración oral del bacteriófago a ninfas del quinto instar no mostró efectos nocivos a la aptitud del hospedero, debido probablemente al bloqueo de la conexión entre las regiones del intestino medio anterior y posterior (Xu *et al.*, 2016).

Varios estudios han demostrado la efectividad de la terapia de fagos usando como modelo a animales para el tratamiento de varios patógenos bacterianos de humanos (Seed y Dennis, 2009); en insectos se ha utilizado ampliamente como modelo al lepidóptero *Galleria mellonella* para dichos estudios, algunos de los patógenos que se han estudiado en este insecto se encuentran *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus cereus* y *Francisella tularensis* (Miyata *et al.*, 2003; Fedhila *et al.*, 2006; Aperis *et al.*, 2007). La terapia de fagos como agente microbiano en el sistema de insectos ha sido muy poco probada. En el Complejo *Burkholderia cepacia* (BCC, por sus siglas en inglés), que representa un grupo de patógenos bacterianos altamente resistentes a los antibióticos y asociados con infecciones respiratorias debilitantes, se evaluó el fago KS12 con resultados de capacidad de reducción de hasta 90 % de los efectos letales del BCC, con una sola inyección (Seed y Dennis, 2009).

Otro caso en el que se usó el modelo intestinal de un insecto para el estudio de la interacción fago-antibiótico fue en *Trichoplusia ni*. En este estudio, la resistencia a los antibióticos existe en muy baja frecuencia (Mikonranta *et al.*, 2019) y dicha resistencia es generada por los plásmidos. El bacteriófago se dirige específicamente a las células portadoras de resistencia (Jalasvuori *et al.*, 2011). La bacteria *Enterobacter cloacae* en los humanos puede producir infección en el tracto

urinario, en heridas quirúrgicas, bacteremias y algunas veces cuando bajan las defensas produce infecciones oportunistas. Esta bacteria forma una asociación intestinal persistente con las larvas de lepidópteros después de la inoculación oral (Watanabe *et al.*, 2000). Para reducir poblaciones resistentes de *E. cloacae* en *T. ni* se utilizó el bacteriófago PRD1, que es dependiente del plásmido e infecta específicamente las células portadoras de RP4 (Olsen *et al.*, 1974). En este estudio se demostró que si bien la terapia con fagos no fue capaz de reducir la frecuencia de las bacterias objetivo en la población durante la selección positiva con antibióticos, alivió la flora inducida al disminuir la carga general de células resistentes. El sistema modelo presentado en este estudio permite la manipulación de la estructura y la conectividad de la población del organismo tratado y puede ser un interesante tratamiento en el futuro hacia los efectos epidemiológicos de la terapia con fagos. Estos hallazgos tienen implicaciones para el uso terapéutico de fagos, especialmente teniendo en cuenta los efectos evolutivos sinérgicos con antibióticos (Mikonranta *et al.*, 2019).

En insectos, el efecto tóxico de las proteínas Cry se ha explotado comercialmente por más de 70 años, para controlar las poblaciones de insectos que tienen un impacto en la silvicultura, la agricultura y la salud y los genes de las toxinas también se han usado en plantas transgénicas (Schnepf *et al.*, 1998; Zhao *et al.*, 2003; Federici, 2005; Rosas-García, 2008). La especificidad de las toxinas *Bt* Cry a un número restringido de especies de insectos proporciona una gran ventaja para su uso, ya que no perjudica a los organismos no objetivos; sin embargo, para algunos insectos de interés no se conoce toxinas que puedan usarse para su control (Domínguez-Flores *et al.*, 2017). Una tecnología de detección de alto rendimiento para el aislamiento potencial de nuevas toxinas con actividades novedosas contra nuevos insectos, es la metodología basada en la visualización de fagos, esta es una potente herramienta molecular para la selección *in vitro* de proteínas con un perfil de unión específica, en esta técnica, una proteína o una biblioteca de mutantes se fusiona con una proteína del fago para que se muestre en la superficie del fago (Mazari *et al.*, 1997; Oliveira *et al.*, 2011).

Domínguez-Flores *et al.* (2017), usando el intestino de *Aedes aegypti* y el fago λ obtuvieron variantes de la toxina Cry1Aa13 modificadas en el dominio II del bucle 2, para la selección de nuevas toxinas, así como también aislaron varios fagos para la realización de más pruebas. En este trabajo, se presentó el primer reporte sobre el uso de bacteriófagos para identificar nuevas actividades hacia insectos de órdenes taxonómicos distantes, y así establecer una tecnología basada en el uso de Cry como una herramienta potencial para desarrollar insecticidas de acuerdo con nuevos insectos objetivo.

JUSTIFICACIÓN

En la agricultura, hay una búsqueda de nuevas alternativas de manejo de plagas que representen menos riesgo que los ingredientes químicos, pero que tengan la misma o mejor efectividad. Considerando que el uso de bacteriófagos para el control de enfermedades bacterianas es una metodología muy prometedora para contrarrestar la resistencia a formulaciones químicas; el presente trabajo propone estudiar fagos de bacterias simbiotes del intestino insectos plaga, que puedan ser utilizados en un futuro como controladores biológicos.

HIPÓTESIS

Existen bacteriófagos virulentos que al usarlos contra bacterias simbiotes cultivables de mosquita blanca no permiten su crecimiento.

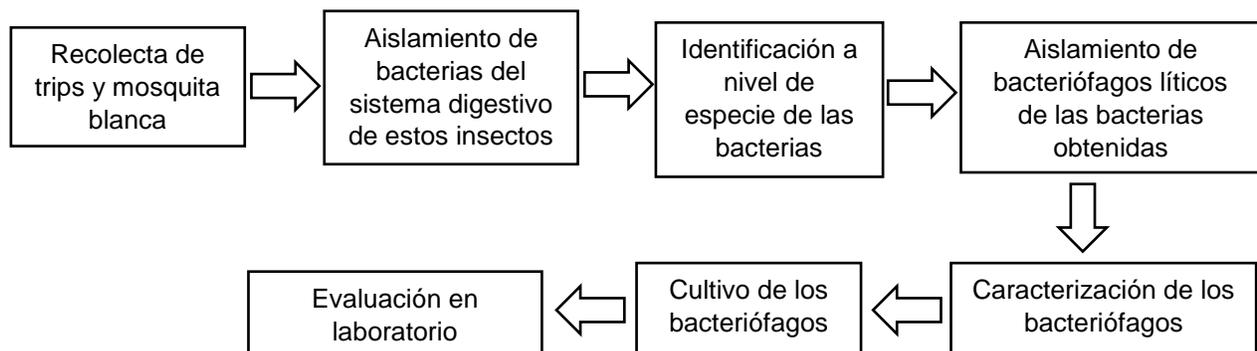
OBJETIVO GENERAL

Obtener bacteriófagos virulentos para usarlos contra bacterias simbiotes del sistema digestivo de mosquita blanca.

OBJETIVOS PARTICULARES

- 1.- Identificar las bacterias presentes en el sistema digestivo de los trips y la mosquita blanca.
- 2.- Identificar y caracterizar bacteriófagos de las bacterias simbiotes aisladas del sistema digestivo de la mosquita blanca.
- 3.- Evaluar en el laboratorio la eficiencia de los bacteriófagos contra las bacterias cultivadas.

ESTRATEGIA EXPERIMENTAL



CAPÍTULO II

IDENTIFICACIÓN DE BACTERIAS PRESENTES EN EL SISTEMA DIGESTIVO DE LOS TRIPS Y LA MOSQUITA BLANCA.

2.1 INTRODUCCIÓN

Los insectos son el grupo animal con mayor número de especies a nivel mundial, habitan en casi todos los entornos, debido a su amplia distribución se relacionan con microorganismos como bacterias, virus, hongos, protozoos, nematodos y parásitos multicelulares (Mondal *et al.*, 2023). El éxito evolutivo de los insectos ha dependido en gran parte de sus innumerables relaciones con microorganismos benéficos, principalmente con su microbiota intestinal, quienes les aportan nutrientes a sus dietas, ayudan a su digestión, los protegen de depredadores, parásitos y patógenos, dominan su sistema de apareamiento y reproducción, degradan fitotoxinas y plaguicidas, para los insectos que son vectores de enfermedades influyen en la eficiencia de vectorización y el tiempo de desarrollo (Arora y Douglas, 2017; McMeniman *et al.*, 2009; Ricci *et al.*, 2012; Chouaia *et al.*, 2012).

La asociación entre insectos y microorganismos puede ser simbiótica o dañina. Una relación simbiótica implica la fuerte conexión de dos especies distintas, este tipo de relación se clasifica como comensalismo, mutualismo o parasitismo (Moya *et al.*, 2008). En las interacciones entre insectos y microorganismos, a la bacteria se le denomina simbiote y al insecto el huésped, los simbiotes se clasifican en primarios y secundarios, los primarios desarrollan una función crucial para el insecto y se transfieren por vía materna de generación en generación (Kikuchi, 2018).

En insectos como los pulgones, la mosca tsetse y los psilidos, el simbiote primario desempeña una función protectora y sintetiza nutrientes vitales (Crotti *et al.*, 2012). Algunos casos estudiados son la mosquita blanca, quien tiene como simbiote primario a *Candidatus Portiera aleyrodidarum*, esta bacteria le proporciona carotenoides y aminoácidos esenciales (Sloan y Moran, 2012), otro ejemplo de este tipo de simbiotes es *Buchnera aphidicola*, que se encuentra dentro de los bacteriocitos en la cavidad abdominal del cuerpo de casi todos los pulgones y aporta aminoácidos necesarios que están ausentes en la dieta de savia del floema de los insectos (Shigenobu *et al.*, 2000). En los insectos plaga, el microbioma intestinal desempeña un papel crucial, esta es vital en la digestión de los alimentos, mantiene alejados a los microorganismos

dañinos, produce las vitaminas necesarias para el huésped y realiza la desintoxicación metabólica (Mitsumori *et al.*, 2003).

Si bien, para el caso de mosquita blanca ya se ha estudiado su microbiota intestinal, y se ha reportado la presencia de simbioses primarios y secundarios (Wang *et al.*, 2019), dichos trabajos en su mayoría corresponden a análisis de secuenciación masiva; sin embargo, existen pocos trabajos sobre bacterias del sistema digestivo de esta plaga que sean cultivables. Con respecto a los insectos del orden Thysanoptera, existen limitados trabajos sobre el estudio de su microbiota intestinal, más aún para el caso del cultivo del aguacate Hass en México, no hay literatura en la que se mencione información acerca de ello. Por lo que aquí, buscamos bacterias cultivables de mosquita blanca recolectadas de chile habanero en el estado de Yucatán, y de trips del aguacate (*Frankliniella* sp., y *Scirtothrips* sp.) de Michoacán, con el objetivo de encontrar alguna que fuera esencial para dichos insectos.

2.2 MATERIALES Y MÉTODOS

2.2.1 Recolecta de especímenes de trips y mosquita blanca

Los especímenes de trips se recolectaron en el estado de Michoacán en el mes de abril del 2019. Inflorescencias con trips vivos se colocaron en un sobre de papel, el cual fue cuidadosamente sellado y transportado al laboratorio para ser procesados. Trips vivos del género *Frankliniella* y *Scirtothrips* se colocaron dentro de una caja Petri, la cual se puso a 4 °C para anestesiarse y posteriormente ser procesados.

Los especímenes de mosquita blanca se recolectaron en plantas de chile habanero (*Capsicum chinense* Jacq.) dentro de las instalaciones del Centro de Investigación Científica de Yucatán (CICY), las mosquitas blancas se colocaron en frascos pequeños con mallas en la tapa y fueron transportados al laboratorio para ser procesadas. Los frascos fueron colocados a 4 °C.

2.2.2 Aislamiento de bacterias intestinales

El protocolo se llevó a cabo por separado para cada insecto estudiado.

Transcurridos 15 minutos a 4 °C, para asegurar la obtención únicamente de bacterias intestinales y evitar contaminaciones, los trips y las mosquitas blancas adultos se lavaron con alcohol al 70% durante 5 min (con agitaciones suaves cada minuto), posteriormente se realizaron tres enjuagues en buffer de fosfatos (PBS, pH 7.4). Del último enjuague se realizaron siembras del buffer por

extensión en placa (100 μL), en medio agar soya tripticaseína (TSA, por sus siglas en inglés), para observar que ya no había bacterias presentes. Adicionalmente, insectos completos (sanitizados) fueron depositados sobre placas de TSA para asegurar ausencia de bacterias u otros microorganismos.

Enseguida, los especímenes se transfirieron a una caja Petri bajo el estereoscopio, ubicado en una campana de flujo laminar, adicionando una gota de PBS. Suavemente se retiró el abdomen del trips/mosquita blanca (Figura 2.1 A). Se tomaron alrededor de 50 abdómenes y se colocaron en un tubo de microcentrífuga de 1.5 mL con 200 μL de PBS estéril y se maceraron por 30 segundos con un pistilo estéril (Figura 2.1 B) (Apte-Deshpande *et al.*, 2012).

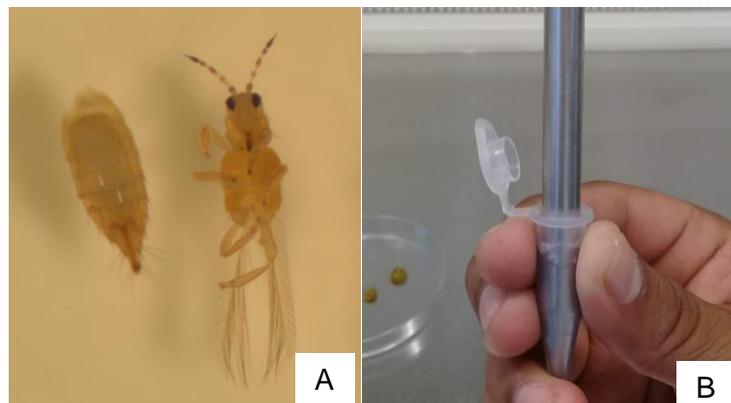


Figura 2. 1 A) Disección de especímenes de trips. B) Maceración de abdómenes.

Crecimiento bacteriano

De la mezcla obtenida del macerado de abdómenes, se tomaron 100 μL para realizar diluciones (10^{-1} a 10^{-2}), se sembraron en medio TSA por extensión en placa: 100 μL de dilución 10^{-1} (dos repeticiones), 100 μL de 10^{-2} (dos repeticiones) y 100 μL del macerado inicial (una repeticion), posteriormente se incubaron a 37°C por 48 h para el crecimiento de las bacterias. De las colonias bacterianas que crecieron, se seleccionaron por morfología colonial diferencial, se mezclaron en 100 μL de agua destilada estéril y se sembraron por extensión en placa de manera individual a cajas con TSA. Transcurridas 72 horas, se realizó el crecimiento de la colonia en 5 mL de medio de caldo de soya tripticaseína (TSB, por sus siglas en inglés), para posteriormente realizar la extracción de ADN. Después de 48 horas, se midió el crecimiento bacteriano por espectrofotometría, para verificar que el crecimiento estuviera a 0.8 de absorbancia a una longitud de onda de 600 nm. Cuando se hizo la extracción de ADN, se tomaron 500 μL de la suspensión

bacteriana y se mezclaron con 500 μ L de TSB-Glicerol (50-50 v/v) en un tubo de 1.5 mL, los tubos fueron colocados a -20 °C.

2.2.3 Extracción de ADN de las bacterias

Se realizó la extracción del ADN de acuerdo con el protocolo basado en Bromuro de Cetiltrimetilamonio (CTAB, por sus siglas en inglés) con modificaciones (Sambrook *et al.*, 2001; Marques *et al.*, 2015), que se describen a continuación:

- 1.- Transferir 1.5 mL del cultivo a un tubo de microcentrifuga. Centrifugar a 13,000 rpm por 3 minutos. Remover el medio (sobrenadante), dejando la pastilla. Repetir este paso con el resto del cultivo.
- 2.- Resuspender la pastilla con 500 μ L de buffer TE 1x (0.01 M Tris HCl, 0.001 M EDTA pH 8).
- 3.- Añadir perlitas de lisis y agitar vigorosamente por 5 minutos.
- 4.- Añadir 30 μ L de SDS al 10% y 3 μ L de proteinasa K (20 μ g/ μ L), mezclar e incubar a 37°C por 1 hora.
- 5.- Transcurrido el tiempo adicionar 100 μ L de NaCl 5 M y 80 μ L de CTAB/NaCl (1:1 CTAB 10% y NaCl 5 M), homogeneizar e incubar a 65°C por 10 min.
- 6.- Posteriormente aplicar tres lavados con 1 volumen de fenol-cloroformo-alcohol isoamílico (25:24:1), entre cada lavado realizar una centrifugación a 13,000 rpm por 5 minutos.
- 7.- Finalmente realizar la precipitación de los ácidos nucleicos con alcohol absoluto a -20°C de 2 horas a 4 horas y centrifugación a 13,000 rpm por 15 minutos.
- 8.- Secar las pastillas obtenidas a temperatura ambiente y resuspenderlas en 49 μ L de agua grado biología molecular y 1 μ L de RNasa (10 mg/ml). Agitar brevemente e incubar 30 min a 37 °C. Almacenar a -20 °C.

La concentración y la integridad del ADN se verificaron mediante espectrofotometría con Nanodrop 2000c (Thermo Scientific, EE. UU.) y mediante visualización en gel de agarosa al 1,5 % bajo UV, respectivamente.

2.2.4 Amplificación por PCR

Se amplificó el ADN de las muestras obtenidas por PCR (Biorad®). Se usaron los primers degenerados 1494r (5'-TAC GGYTAC CTT GTT AGC ACT T-3') y 27f (5'-AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG-3'), que amplifican un fragmento de alrededor de 1542 pb, se utilizó un volumen final de 25 µL para la reacción, con 17.7 µL de agua, 2.5 µL de buffer 10X, 1 µL de MgCl₂ (50 mM), 0.5 µL de dNTP's (10 mM) 0.6 µL de cada cebador (20 pmol), 0.1 µL de Taq polimerasa y 2 µL de ADN. Las condiciones para la PCR fueron: 6 min a 94 °C (1 ciclo); 30 s a 94 °C, 45 s a 58 °C, 1 min a 72 °C (35 ciclos); 4 s a 72 °C (1 ciclo). Los productos de amplificación fueron analizados por electroforesis en gel de agarosa al 1.5 % teñido con bromuro de etidio y visualizado bajo luz UV. Se cargaron en el gel los 25 µL de la amplificación para obtener la banda amplificada, la cual se purificó con el kit comercial Wizard® de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

2.2.5 Clonación

El producto de PCR purificado a partir del gel se utilizó para realizar la clonación del fragmento con el vector pGEM®-T Easy de Promega de acuerdo con las indicaciones del fabricante. Para la transformación por choque térmico se utilizaron células competentes Top 10, se sembraron en placas de medio sólido LB que contenían X-Gal (20 µL) y 25 µL de ampicilina (100 mg/mL), se dejaron en crecimiento por 20 h. Se seleccionaron al menos cuatro colonias transformadas para tener varias repeticiones de cada muestra y se crecieron en tubos con 3 mL de medio líquido LB con 3 µL de ampicilina (100 mg/mL) por 24 h.

La purificación del plásmido se hizo utilizando el protocolo VIII Minipreps bajo la siguiente metodología:

- 1.- Transferir 1.5 mL del cultivo a un tubo de microcentrífuga. Centrifugar a 13,000 rpm por 3 min. Remover el medio (sobrenadante), dejando la pastilla. Repetir este paso con el resto del cultivo.
- 2.- Resuspender la pastilla con 100 µL de solución TEG fría mediante agitación vigorosa.
- 3.- Agregar 200 µL de la solución II (sacarlo antes para usar a temperatura ambiente). Mezclar el contenido por inversión cinco veces; conservar el tubo en hielo.
- 4.- Añadir 150 µL de solución III. Mezclar en el agitador por 10 s; conservar en hielo por 5 min.

5.- Centrifugar a 13,000 rpm por 10 min a 4 °C. Transferir el sobrenadante a un tubo nuevo.

6.- Agregar 2 volúmenes de etanol absoluto frío, mezclar en el agitador y dejar a -20 °C de 30 min a 1 hora para precipitar los ácidos nucleicos.

7.- Centrifugar a 13,000 rpm por 10 min. Remover el sobrenadante invirtiendo el tubo sobre papel toalla.

8.- Lavar la pastilla con 500 µL de etanol al 70 % a 4 °C.

9.- Centrifugar a 13,000 rpm por 5 min a 4 °C.

10.- Remover el sobrenadante y secar la pastilla a temperatura ambiente por 10 min.

11.- Resuspender los ácidos nucleicos en 49 µL de agua grado biología molecular y 1 µL de RNasa (10 mg/mL). Agitar brevemente e incubar 30 min a 37 °C. Almacenar a -20 °C.

Posteriormente se hizo una PCR con los primer 1494r y 27f, para constatar que se encontrara el fragmento de interés.

2.2.6 Análisis de secuencias

Los fragmentos clonados se enviaron a secuenciar a la empresa Macrogen en Corea del Sur. Las secuencias obtenidas se editaron en el programa VecScreen para limpiar los restos del vector y se compararon por BLAST para la búsqueda de secuencias parecidas.

2.3 RESULTADOS

2.3.1 Trips del aguacate

Crecimiento de bacterias de trips

La morfología de las colonias de bacterias que crecieron fue principalmente de dos tipos: crecimiento circular y formas irregulares. Las de crecimiento circular fueron de color blanco, de consistencia cremosa y con elevación (Figura 2.2 A). Las de forma irregular fueron de color amarillo, de consistencia viscosa y crecimiento plano (Figura 2.2 B).

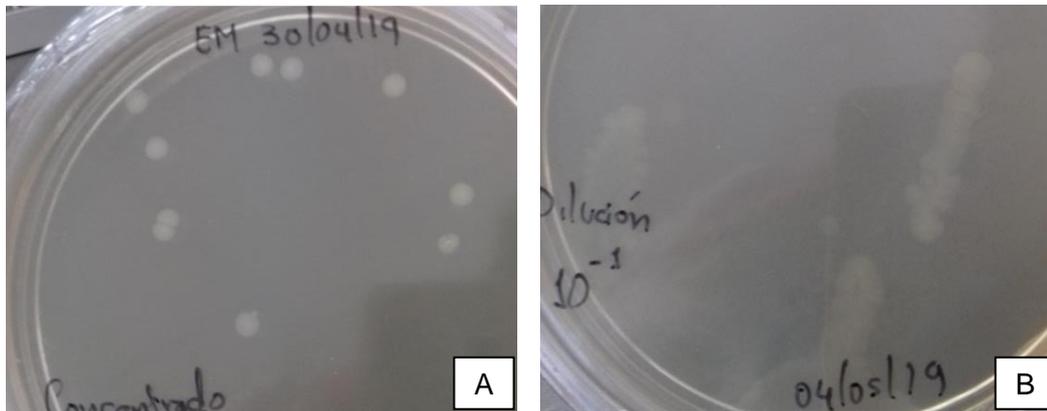


Figura 2.2 Crecimiento de colonias de bacterias a partir de la maceración de abdómenes.

Extracción de ADN y amplificación por PCR de bacterias de trips

Se verificó la calidad en gel de agarosa del ADN bacteriano obtenido de las 12 cepas obtenidas de abdómenes de trips. Se obtuvo altas concentraciones de ADN en la mayoría de las muestras (500-800 ng/ul), por lo que realizó diluciones para llevarlas a concentraciones bajas (~20 ng/ul). Se cargó 2 μ l de cada muestra más 1 μ l de buffer de carga para ser visualizados en gel de agarosa (Figura 2.3).

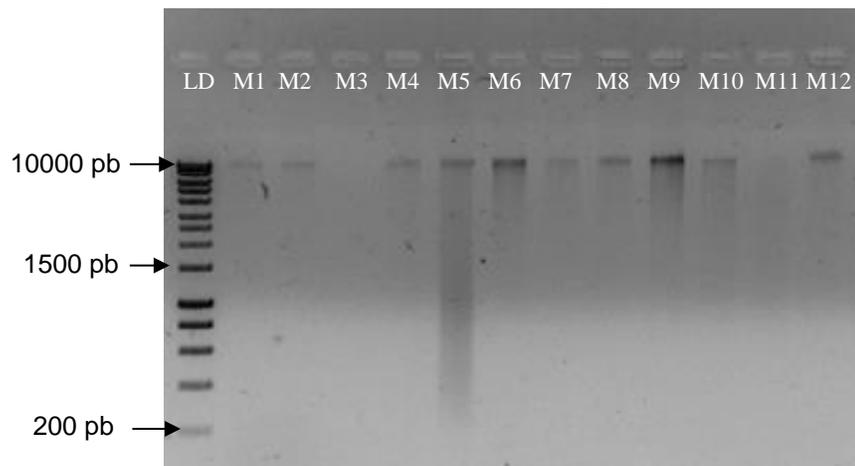


Figura 2.3 Visualización en gel de agarosa del ADN de las 12 cepas de bacterias obtenidas de trips. LD = HyperLadder 1, M=muestras (1-12).

Se realizó la amplificación del fragmento del gen 16S por PCR, se utilizó una concentración de ~20 ng por µl de ADN. Se visualizó mediante gel de agarosa el fragmento esperado de 1500 pb de las 12 cepas de bacterias (Figura 2.4).

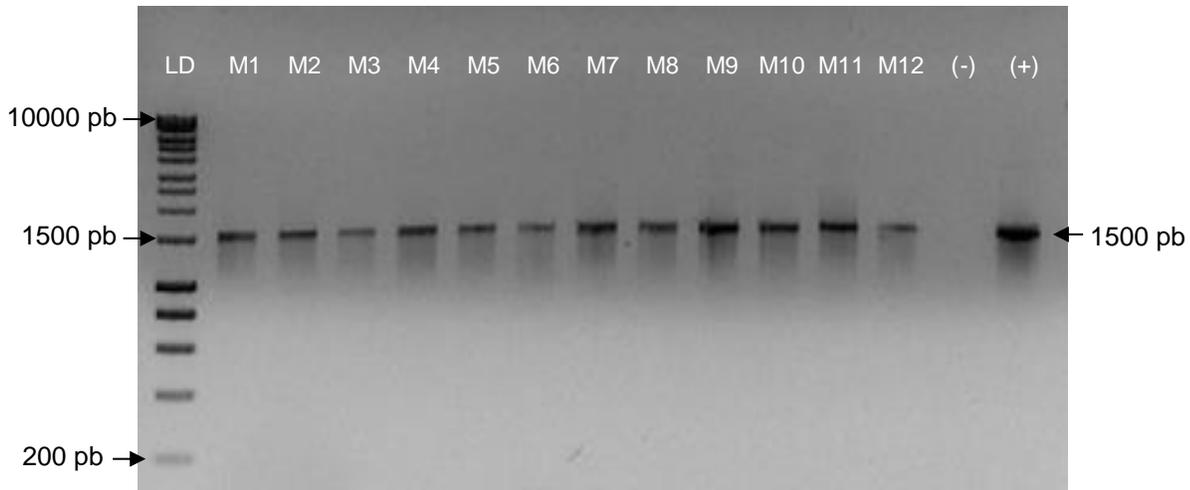


Figura 2. 4 Visualización en gel de la amplificación del fragmento del gen 16Sr del ADN de las 12 cepas bacterianas obtenidas de los trips. LD = HyperLadder 1.

Se cortó el fragmento del gel de las 12 muestras analizadas para ser purificado con el kit Wizard® (Promega). Se obtuvieron bajas concentraciones, la más baja fue de 10.2 ng/uL y la más alta de 49.1 ng/uL (Figura 2.5), por lo que se decidió continuar con la clonación de los fragmentos obtenidos.

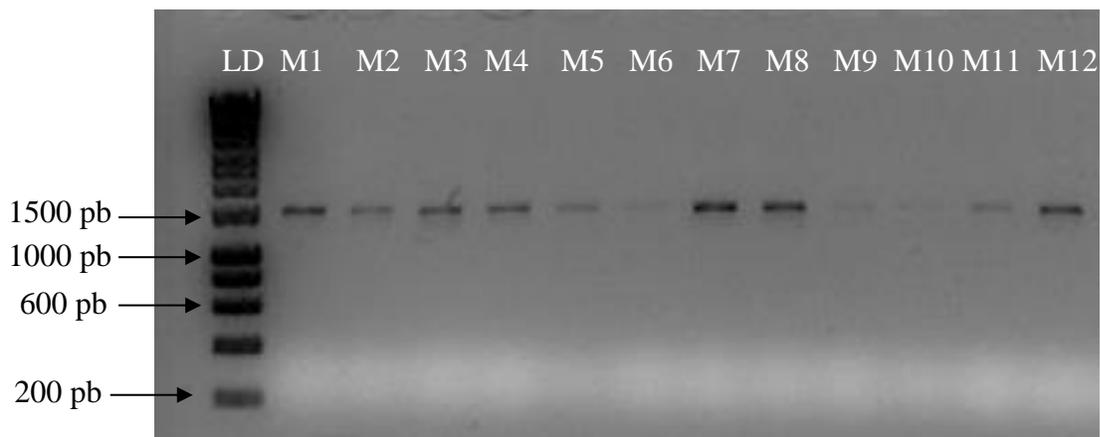


Figura 2. 5 Visualización de los productos de PCR purificados de las 12 cepas bacterianas obtenidas de los trips. LD = HyperLadder 1.

Clonación de los fragmentos amplificados por PCR

Para verificar la presencia del fragmento amplificado dentro del plásmido de clonación, se realizó una amplificación en el termociclador con todas las repeticiones obtenidas de cada muestra. Se enviaron a secuenciar las muestras que presentaron el fragmento de interés a Macrogen en Corea del Sur.

Secuenciación

Las clonas fueron secuenciadas en ambos sentidos para obtener secuencias más grandes. El tamaño de las secuencias obtenidas fue de alrededor de 1100 pb. Al comparar nuestras secuencias con las del GenBank, se encontró similitud con especies reportadas de *Weissella cibaria* y *Bacillus simplex* (Tabla 2.1).

Tabla 2. 1 Bacterias identificadas del sistema digestivo de trips

Muestras	No. de clonas	Organismo	Cobertura	Identidad	Accesión
M2	2	<i>Weissella cibaria</i>	97 %	96.54 %	AB362617.1
M3	2	<i>Weissella cibaria</i>	90 %	97.44 %	AB362617.1
M4	2	<i>Weissella cibaria</i>	96 %	95.54 %	CP020928.1
M7	2	<i>Weissella cibaria</i>	72 %	94.11 %	CP041193.1
M9	2	<i>Bacillus simplex</i>	80 %	88.36 %	CP041193.1
M10	2	<i>Bacillus simplex</i>	92 %	91.71 %	KF475857.1
M11	2	<i>Bacillus simplex</i>	92 %	96.52 %	KR018734.1

2.3.2 Mosquita blanca

Crecimiento de bacterias de mosquita blanca

La morfología de las colonias de bacterias que crecieron, obtenidas a partir del abdomen de las mosquitas blancas fueron principalmente de dos tipos: crecimiento circular de color blanco con elevación y dureza (Figura 2.6A), crecimiento circular de color rojo con elevación y dureza (Figura 2.6B) y formas acuosas (Figura 2.6C), crecimiento circular con elevación y de color amarillo intenso (Figura 2.6D), crecimiento circular con elevación y de color amarillo claro (Figura 2.6E).

Amplificación por PCR del ADN de bacterias de mosquita blanca

La amplificación del ADN de mosquita blanca se realizó con las mismas condiciones y los mismos primers que se utilizaron en las bacterias de trips. Se obtuvieron un total de 9 cepas, las cuales se etiquetaron con MB de las 2 a la 12, con ausencia de 5 y 6 (Figura 2.7).

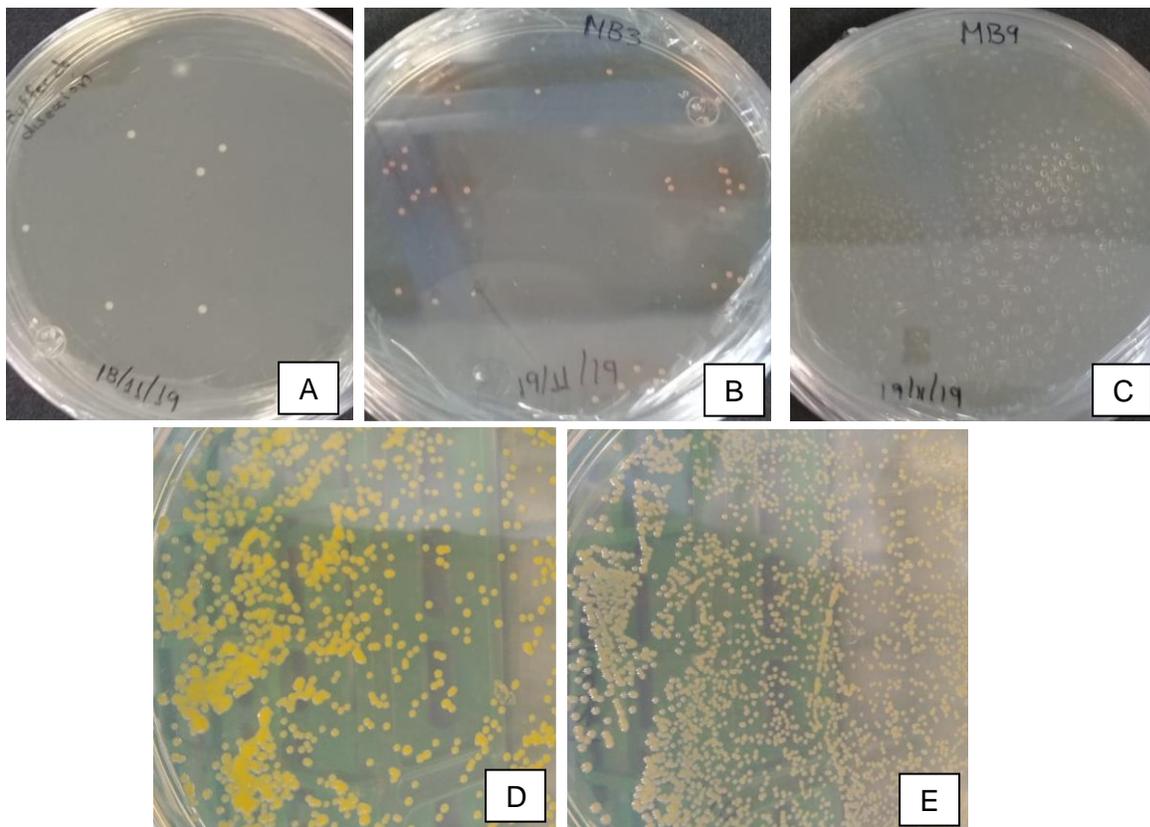


Figura 2. 6 Morfología de bacterias obtenidas de abdómenes de mosquita blanca.

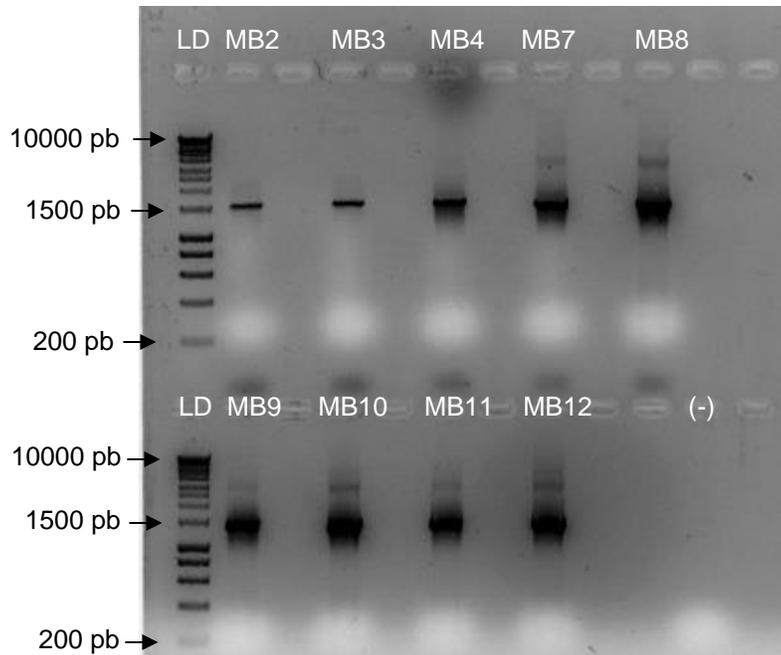


Figura 2. 7 Amplificación por PCR del ADN de las cepas de bacterias obtenidas de la mosquita blanca.

A partir del gel de agarosa con las 9 cepas amplificadas por PCR, se cortó el fragmento del gel para ser purificado, se obtuvo baja cantidad de ADN, la concentración más baja fue de 9.6 ng/uL y más alta de 25.8 ng/uL (Figura 2.8).

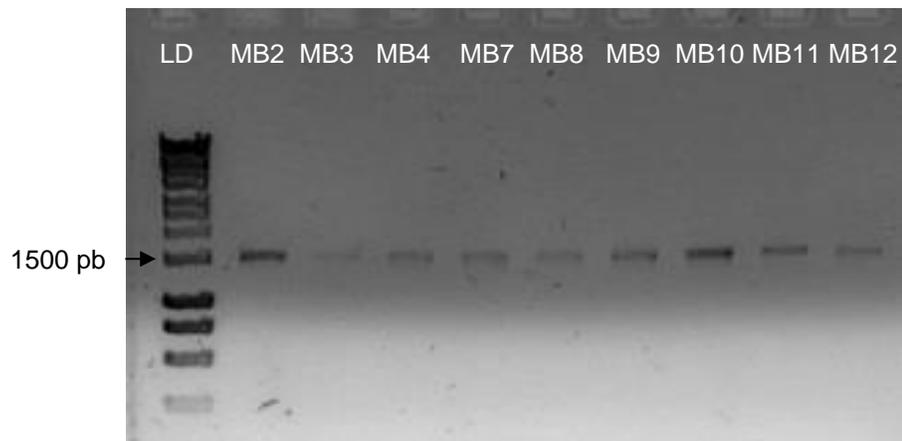


Figura 2. 8 Visualización de los fragmentos purificados de las cepas de bacterias obtenidas de la mosquita blanca. Gel de agarosa al 1.5 %.

Clonación de los fragmentos amplificados por PCR

Para verificar la presencia del fragmento amplificado dentro del plásmido de clonación, se amplificaron todas las repeticiones obtenidas de cada muestra. Se enviaron a secuenciar las muestras que presentaron el fragmento de interés.

Secuenciación

Las clonas para mosquita blanca también fueron secuenciadas en ambas direcciones, obteniéndose secuencias de alrededor de 1300 pb. Se encontró similitud en el GenBank de las secuencias de las cepas obtenidas con *Bacillus licheniformis*, *Streptomyces* sp, *Solibacillus silvestris*, *Bacillus isronensis* y *Paenibacillus lautus* (Tabla 2.2).

Tabla 2. 2 Bacterias identificadas del sistema digestivo de mosquita blanca

Muestras	No. de clonas	Organismo	Cobertura	Identidad	Accesión
MB2	5	<i>Bacillus licheniformis</i>	99 %	98.84 %	CP042252.1
MB3	5	<i>Streptomyces</i> sp.	98 %	97.86 %	MN116556.1
MB4	5	<i>Bacillus licheniformis</i>	99 %	99.32 %	CP042252.1
MB7	5	<i>Bacillus licheniformis</i>	99 %	95.44 %	MF045813.1
MB8	3	<i>Solibacillus silvestris</i>	99 %	97.70 %	CP014609.1
MB9	5	<i>Bacillus licheniformis</i>	80 %	89.88 %	KX953127.1
MB10	5	<i>Bacillus licheniformis</i>	98 %	99.46 %	KM226939.1
MB11	2	<i>Bacillus isronensis</i>	99 %	98.70 %	NR_115952.1
MB12	5	<i>Paenibacillus lautus</i>	96 %	97.48 %	CP032412.1

2.4 DISCUSIÓN

La diversidad bacteriana del intestino de insectos tisanópteros y mosquita blanca utilizando medios nutritivos para su crecimiento ha sido poco estudiada, la mayoría de los estudios de simbioses de estos insectos ha sido a través de secuenciación masiva (Chanbusarakum y Ullman, 2008; de Vries *et al.*, 2008; Singh *et al.*, 2012; Wang *et al.*, 2019). En el caso de simbioses bacterianas de trips, Díaz-Castillo *et al.*, (2018), reportó a las bacterias cultivables *Serratia marcescens* del trips *Frankliniella parvula* y *Acinetobacter baylyi* del trips *Chaetanaphothrips signipennis*, ambos se presentan como plaga en el cultivo de banano. En estudio de la microbiota de trips (*Scirtothrips hansonii*, *Frankliniella panamensis* y *Frankliniella* sp.) del cultivo de aguacate Hass y Fuerte en Colombia basándose en la secuenciación del gen 16S rRNA y la girasa B identificaron los géneros *Bacillus*, *Serratia*, *Moraxella*, *Pantoea* y *Sphingomonas*, mientras que con el análisis de la región V1-V2 se detectó la presencia de *Wolbachia* > 92 % en *S. hansonii*, de 0 a 2.43 % en *Frankliniella* sp. y 0.16 % en *F. panamensis* (Cano-Calle *et al.*, 2022). En el presente trabajo se obtuvo de abdómenes macerados de *Frankliniella* sp. y *Scirtothrips* sp. a las especies *Weissella cibaria* y *Bacillus simplex*. El género *Weissella* pertenece al grupo gram positivo, no formadora de endosporas con morfología cocoide o en forma de bastón, este género pertenece al grupo generalmente conocido como bacterias del ácido láctico (Fusco *et al.*, 2015). *W. cibaria* es una especie de importancia médica, que principalmente se reporta aislada de saliva del ser humano, es considerada probiótico para el cuidado bucal que está comercialmente disponible (Kang *et al.*, 2019). En insectos *W. cibaria* se ha reportado en la mosca del vinagre *Drosophila* spp., la cual comúnmente está asociada a este insecto por el ácido láctico (Ricks *et al.*, 2017); también ha sido reportada en los escarabajos de tierra *Poecilus chalcites* los cuales son insectos benéficos en los sistemas agrícolas donde estos insectos contribuyen al control de plagas de insectos y malezas (Lehman *et al.*, 2009). Otras especies de *Weissella* que han sido reportadas de la microbiota intestinal de insectos son *W. paramesenteroides* y la nueva especie *W. diestrammenae*, estas se aislaron recientemente del barrenador europeo del maíz (*Ostrinia nubilalis*) y el grillo del camello (*Diestrammena coreana*), respectivamente (Belda *et al.*, 2011; Oh *et al.*, 2013).

El otro género reportado en el presente trabajo en trips es *Bacillus*, este pertenece al grupo Gram positivo, presenta forma de bastón y son bacterias formadoras de esporas. *Bacillus simplex* se ha reportado en la flora bacteriana del lepidóptero *Thaumetopoea pityocampa*, la cual es una de las plagas más importantes para las especies de pino (Ince *et al.*, 2008), en el escarabajo del pino de montaña *Dendroctonus ponderosae* también se ha reportado a *B. simplex*, aunque no se

especifica si es de la flora intestinal, debido a que el aislamiento se obtuvo de la maceración completa del insecto (Adams *et al.*, 2011).

Con respecto a bacterias cultivables de mosquita blanca, Ateyyat *et al.*, (2010) reportó 11 especies, *Exiguobacterium acetylicum* se aisló de adultos, ninfas y pupas parasitadas recolectadas de los cultivos de pepino, pepino serpiente, tomate y frijol, *Pseudomonas putida* se aisló de ninfas y pupas parasitadas de frijol y pepino serpiente, *Bacillus licheniformis* se obtuvo de adultos y ninfas de algodón, *Micrococcus caseolyticus* fue aislado de ninfas de pepino serpiente, *Erwinia persicinus* se aisló de ninfas del cultivo de coliflor, *Exiguobacterium undae* solo se encontró en adultos en algodón, *Bacillus subtilis* se presentó en adultos de los cultivos de pepino serpiente y coliflor y *Brevibacterium casei* se obtuvo de adultos en algodón. Roopa *et al.* (2014) estudió la melaza excretada de mosquita blanca en hojas y reportó tres bacterias cultivables *Bacillus endophyticus*, *Bacillus niacini* y *Roseomonas* sp. Tireng Karut *et al.* (2020) analizaron adultos e insectos inmaduros macerados de mosquita blanca recolectados del cultivo de ajonjolí y obtuvieron a las bacterias *Bacillus* sp., *Methylobacterium* sp., *Microbacterium* sp., *Sphingomonas* sp. y *Serratia marcescens*, y de poblaciones recolectadas del cultivo de melón obtuvieron a *Acinetobacter iwoffii*, *Bacillus cereus*, *Staphylococcus hominis* y *Staphylococcus warneri*.

En el presente estudio se identificó en mayor abundancia al género *Bacillus*. *Bacillus licheniformis* ha sido aislado del tracto digestivo de larvas de moscas de la fruta (*Anastrepha ludens*) (Lugo-Morán, 2017). Se ha reportado que *Bacillus cereus* aislado de *Bactrocera cucurbitae* contiene sustancias químicas que son atrayentes sobre machos y hembras de diferentes especies de *Bactrocera* (Hadapad *et al.*, 2016).

Streptomyces es un género de bacterias gram positivas, se encuentran predominantemente en suelos y en vegetación en descomposición. En hormigas, avispa excavadora solitaria y escarabajo del pino del sur, el género *Streptomyces* producen metabolitos secundarios que proporcionan protección antibacteriana y antifúngica.

De acuerdo a estudios realizados sobre la diversidad bacteriana del intestino en insectos, esta va variar dependiendo principalmente de la época de recolecta del insecto, el hospedante, la especie y el manejo agronómico del cultivo, para el caso de mosquita blanca están disponibles algunos estudios sobre las bacterias cultivables en los diferentes estados biológicos; sin embargo, la presencia de tres biotipos en esta especie y a la gran diferencia que presentan estos a nivel mundial se ha convertido en una especie muy compleja para su estudio, el presente

trabajo es una aportación de bacterias simbiotes de mosquita blanca en cultivo de chile habanero en Yucatán. Para el caso de bacterias simbiotes del orden Thysanoptera principalmente del cultivo del aguacate son limitados y en nuestro país no hay literatura disponible sobre el estudio de estas, considerando la importancia del cultivo y a la aplicación continua de insecticidas para el control de los trips es necesario continuar con esta línea de investigación, el presente trabajo se limitó el estudio debido a la lejanía de los principales estados productores; sin embargo se realiza un aporte de las bacterias cultivables del género *Frankliniella* y *Scirtothrips*.

CAPÍTULO III

COMPOSICIÓN DEL MICROBIOMA DE MOSQUITA BLANCA EN POBLACIONES CON Y SIN APLICACIÓN DE INSECTICIDAS EN YUCATÁN MÉXICO

3.1 INTRODUCCIÓN

La mosquita blanca *Bemisia tabaci* (Gennadius) (Hemiptera: Aleyrodidae) es una de las plagas de mayor distribución en las regiones tropicales y subtropicales del mundo, afectando a más de 600 especies de plantas cultivadas y silvestres (Shah y Liu 2013). Las mosquitas blancas causan daño a la planta al alimentarse del floema, lo que resulta en la extracción de nutrientes, y también al excretar sustancias azucaradas que favorecen el crecimiento de hongos en la planta (fumagina) (Perring *et al.*, 2018). Además, durante la alimentación, la mosquita blanca es uno de los vectores de virus más importantes, transmitiendo más de cuatrocientas especies de virus, la mayoría pertenecientes al género begomovirus (Geminiviridae) (Ghosh y Ghanim 2021).

Actualmente se reconocen tres biotipos basados en el análisis filogenético de las secuencias del gen de la enzima citocromo oxidasa 1 (*COI*), que se denominan: biotipo A o Nuevo Mundo (NW), biotipo B que incluye el Medio Oriente-Asia Menor 1 (MEAM 1) y el biotipo Q que incluye los del Mediterráneo (MED) (Boykin *et al.*, 2007; Shatters *et al.*, 2009; De Barro *et al.*, 2011; Mugerwa *et al.*, 2012, 2018; Elfekih *et al.*, 2018). Además, se han reconocido varias especies crípticas mediante análisis filogenéticos del gen *COI* (De Barro *et al.*, 2011).

Todas las especies crípticas que se han estudiado de *B. tabaci* contienen el endosimbionte primario *Candidatus Portiera aleyrodidarum*, que se transmite verticalmente de madre a descendencia y se ha demostrado que ha evolucionado en paralelo con sus insectos huéspedes durante millones de años (Baumann *et al.*, 2006; Wilson *et al.*, 2010), además de siete simbioses secundarios pertenecientes a los géneros *Wolbachia*, *Hamiltonella*, *Arsenophonus*, *Rickettsia*, *Cardinium*, *Fritschea* y *Hemipteriphilus* (Li *et al.*, 2023; Wang *et al.*, 2019; Andreason *et al.*, 2020). El endosimbionte primario *Portiera* proporciona a la mosquita blanca aminoácidos esenciales, carotenoides y otros metabolitos que su hospedero no puede producir por sí mismo y no recibe en su dieta ni de otros simbioses (Thao y Bauman 2004; Sloan y Moran 2012). Los endosimbioses secundarios tienen interacciones complejas con sus anfitriones y demuestran una variedad de relaciones con ellos. El género *Wolbachia*, es capaz de manipular la reproducción y la dinámica poblacional de los insectos y se ha encontrado en especímenes de

Asia, Australia, África y América (De Barro *et al.*, 2011; Mariño *et al.*, 2017). *Hamiltonella* está involucrada en las vías de biosíntesis de aminoácidos esenciales y en la producción de vitamina B (Luan *et al.*, 2015; Rao *et al.*, 2015), sin embargo, también se sugiere que es un parásito que compite con *Portiera* por los recursos derivados del hospedero (Ankrah *et al.*, 2017). Se sugiere que *Arsenophonus* ayuda a proporcionar nutrientes esenciales. Tanto *Hamiltonella* como *Arsenophonus* parecen estar fijos dentro de las poblaciones de *B. tabaci* (Zchori-Fein y Brown 2002; Santos-García *et al.*, 2018); *Rickettsia*, *Cardinium*, *Fritschea* y *Hemipteriphilus* generalmente no están fijados en las poblaciones y pueden representar asociaciones más dinámicas, similares a las de los parásitos, pero se desconoce su papel en el metabolismo nutricional del hospedero (Andreason *et al.*, 2020).

Las comunidades bacterianas juegan un papel importante en muchos aspectos cruciales de la vida de sus hospederos, por ejemplo, la nutrición, el desarrollo, la defensa contra patógenos, las interacciones de la comunidad y la supervivencia en entornos hostiles mediante el metabolismo de toxinas (Dillon y Dillon 2004; Douglas 2009; Adams *et al.*, 2010). Es bien sabido que los pesticidas pueden cambiar la composición taxonómica bacteriana, la biodiversidad y las proporciones bacterianas del microbioma en los insectos (Syromyatnikov *et al.*, 2020). Por ejemplo, el microbioma del mosquito *Aedes aegypti*, insecto ampliamente estudiado en condiciones de campo y laboratorio que crece con y sin insecticida, tiene una microbiota central donde el 99% de las secuencias pertenecen a los Phylum Proteobacteria, Firmicutes, Actinobacteria y Bacteroidetes (Scolari *et al.*, 2019). Los estudios en mosquitos han descrito una gran variación entre individuos (Bennett *et al.*, 2019), donde ciertas familias y especies bacterianas son más abundantes en un individuo, pero son raras o están ausentes en otros (Scolari *et al.*, 2019). Esto no se entiende bien en los mosquitos, pero podría tener un efecto potencial sobre la resistencia donde la presión de los insecticidas podría causar el aumento de ciertas bacterias (Arévalo-Cortés *et al.*, 2020), como en el caso de *Riptortus pedestris*, donde aumentar la dosis de fenitrotion aumenta la población de *Burkholderia* (Itoh *et al.*, 2018).

Las poblaciones de mosquita blanca que están sujetas a insecticidas como tiametoxam, imidacloprid, pyriproxyfen y spiromesifen tienen altas cantidades de *Rickettsia-Arsenophonus* y *Wolbachia-Arsenophonus* en su microbioma (Ghanim y Kontsedalov 2009). Esto último sugiere que la abundancia y diversidad de simbioses puede cambiar dependiendo del insecticida utilizado, como es el caso del uso de tiametoxan, donde se observaron altas cantidades de *Portiera* y bajas cantidades de *Rickettsia* en el microbioma de mosquita blanca, mientras que con el uso de imidacloprid se observó una mayor cantidad de *Rickettsia* (Barman *et al.*, 2021).

A pesar de los numerosos estudios sobre la microbiota bacteriana de la mosquita blanca, no se ha podido dilucidar cuál es el principal factor que puede influir en la composición de la microbiota. Caamal-Chan *et al.* (2019) propusieron que la aplicación de agroquímicos fue el principal factor que ejerció una diferencia en la estructura de la microbiota de la mosquita blanca en Baja California Sur. Además, Su *et al.* (2016) realizaron una evaluación de poblaciones de los biotipos B y Q y reportaron una mayor diversidad a nivel de géneros en la microbiota de las mosquitas blancas que se alimentaban de plantas de tomate que de las que se alimentaban de algodón, sugiriendo que el principal factor que afecta a la microbiota de mosquita blanca fue el anfitrión. Además, la comparación de las diversidades bacterianas alfa de los biotipos de mosca blanca recolectados en diferentes partes del mundo mostró una falta de asociación entre la diversidad microbiana y los diferentes biotipos (Wang *et al.*, 2019).

En México, se ha reportado que los biotipos de mosquita blanca A, B y Q se presentan en diferentes cultivos, aunque los mecanismos de resistencia a los pesticidas varían, un patrón que ha surgido recientemente es la desintoxicación mediada por simbiontes dentro de las plagas de insectos (Blanton y Peterson 2020); sin embargo, aún existe poca información respecto a la composición de endosimbiontes presentes en estos biotipos (Caamal-Chan *et al.*, 2019; Carnero-Avilés *et al.*, 2021). Yucatán es uno de los principales estados productores de chile en el sureste mexicano representando el 0.19 % de la producción total de chile en México, donde se presenta el biotipo B y donde se utilizan frecuentemente insecticidas para el control de plagas (Ballina-Gómez *et al.*, 2013). Por ello, en el presente trabajo se estudió la microbiota de dos poblaciones de mosquita blanca, una donde se aplican insecticidas y otra donde no se realizan aplicaciones, con el objetivo de conocer la diversidad de endosimbiontes bajo dos tipos de manejo de *B. tabaci* en dos diferentes variedades de chile.

3.1 MATERIALES Y MÉTODOS

Recolecta de la muestra

Se colectaron adultos de mosquita blanca (al menos 100 organismos) en dos sitios, así: 1) donde se cultiva chile habanero (*Capsicum chinense* Jacq.) en invernaderos pertenecientes al Centro de Investigación Científica de Yucatán (CICY) (21°01'47"N , 89°38'20"W), donde se aplican aplicaciones semanales de abamectina, piriproxifeno, espiromesifeno y omeotato; 2) en cultivos de traspatio de chile piquín (*Capsicum annuum* L. aviculare) en el municipio de Umán (20°53'36"N, 89°43'15"O), donde no se aplicaron insecticidas. Las mosquitas blancas se

recolectaron vivas utilizando recipientes de plástico de 10 cm de diámetro y 15 cm de profundidad. Después de la recolección, las muestras vivas se transportaron al laboratorio, se colocaron a 4 °C durante 15 minutos y se almacenaron en alcohol al 96 % a -20 °C para su posterior análisis.

Extracción de ADN total de *B. tabaci*

Para la extracción de ADN total, las muestras agrupadas que contenían 100 especímenes por sitio se lavaron en alcohol al 70 % durante 5 min y posteriormente se enjuagaron tres veces en buffer de fosfato (PBS, pH 7,4). La maceración de los insectos se realizó con nitrógeno líquido. El ADN total se extrajo usando la metodología CTAB como se describió previamente (Sambrook y Rusell, 2001). La concentración y la integridad del ADN se verificaron mediante espectrofotometría con Nanodrop 2000c (Thermo Scientific, EE. UU.) y mediante visualización en gel de agarosa al 1.5 % bajo UV, respectivamente.

Identificación de *B. tabaci*

Para identificar a la especie y al biotipo de los especímenes recolectados se amplificó por PCR el gen de la Citocromo Oxidasa I mitocondrial (*mtCOI*) con los oligonucleótidos LCO1490 (5'-GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG-3') y HCO2198 (5'-TAACTTCAGGGTGACCAAAAATCA-3') (Folmer *et al.*, 1994) utilizando como diana el ADN total aislado. La PCR se realizó en un volumen de 25 µl, los cebadores se utilizaron a 10 pmol y 40 ng de ADN molde. Se utilizaron las siguientes condiciones de amplificación: 60 s de desnaturalización a 94 °C, 4 ciclos de 94 °C por 30 s, 45 °C por 90 s, 72 °C por 60 s; y 35 ciclos de 94 °C por 30 s, 51 °C por 90 s y 72 °C por 60 s, con una extensión final de 72 °C por 5 min. Los productos de PCR se resolvieron mediante electroforesis en un gel de agarosa al 1.5 % en buffer TAE 1x, que se tiñó con bromuro de etidio y se visualizó bajo UV. Los productos de PCR se ligaron con ADN ligasa T4 en el vector pGEM-T Easy (Promega®, Madison, EE. UU.) siguiendo las instrucciones del proveedor. Posteriormente, células de *Escherichia coli* TOP10 fueron transformadas por el método de choque térmico (Sambrook y Rusell, 2001). La secuenciación se realizó en MacroGen Inc. en Corea del Sur.

Para el análisis filogenético se obtuvieron 12 secuencias del gen *mtCOI* de *B. tabaci* del GenBank, las cuales se alinearon con siete secuencias obtenidas en el presente trabajo utilizando el algoritmo Clustal W (Thompson *et al.* 1994). La reconstrucción filogenética se generó con el método de "Máxima verosimilitud" (ML) con el parámetro del modelo Tamura Nei con soporte

estadístico de 1000 bootstrap en MEGA (Kumar et al. 2018). Se usó una secuencia de 720 nucleótidos del gen *COI* de *Trialeurodes vaporariorum* (número de acceso JF693935) como grupo externo.

Amplificación y preparación de bibliotecas y secuenciación de ARNr 16S

La región V3 del gen 16S rRNA fue secuenciada en el Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo (CIAD), Mazatlán, Sinaloa, utilizando los iniciadores 338f (5'-ACTCCTACGGGAGGCAGCAG-3') y 338f (5'-ACYCCTACGGGRGGCAGCAG-3') (Huse et al. 2008). La región V3 se amplificó por Real-Time PCR a 95 °C a 5 min, 35 ciclos; (95 °C a los 35 s, 56 °C a los 35 s y 72 °C a los 30 s, y 72 °C a los 10 min). Posteriormente, se realizó una segunda PCR en tiempo real agregando adaptadores Nextera XT (Illumina, San Diego, CA, EE. UU.) en cada producto de PCR en tiempo real para agregar dominios de unión a células de flujo y diferenciar las muestras en bibliotecas para la secuenciación masiva. Los productos se visualizaron mediante electroforesis en gel y se cuantificaron siguiendo el protocolo del kit de ensayo Qubit dsDNA HS (Thermo Fisher Scientific). Las bibliotecas se purificaron (AMPure XP Magnetic Beads; Brea, CA, EE. UU.) y su concentración se normalizó a 4 nM y luego se homogeneizó en un grupo único. El grupo se secuenció en una plataforma MiniSeq (Illumina) en una configuración de extremo emparejado usando 2 x 150 ciclos con una celda de flujo medio (300 ciclos) (Illumina).

Análisis bioinformático

Las secuencias se analizaron en una imagen virtual de Linux (MGLinux) utilizando el software Oracle VM VirtualBox (Oracle Corporation, Redwood City, CA, EE. UU.). Las lecturas sin procesar se filtraron para eliminar los adaptadores de secuenciación y las secuencias de baja calidad utilizando `pair-end_cleaner v0.9` (https://github.com/GenomicaMicrob/pair-end_cleaner) y `Cutadapt` (Martin, 2011). Se ensamblaron lecturas emparejadas (R1 y R2) de cada muestra (software PEAR The Exelixis Lab, Heidelberg, Alemania). Luego, las quimeras se eliminaron de las secuencias ensambladas con `Chimeradetector v0.1.1` (https://github.com/GenomicaMicrob/chimera_detector). La anotación taxonómica se realizó utilizando el programa `VSEARCH v2.15.2` <https://github.com/torognes/vsearch> (Edgar 2010) contra la base de datos SILVA132 (Quast et al. 2013).

3.3 RESULTADOS

Identificación de *Bemisia tabaci*

Se amplificó un fragmento de 711 pb de dos muestras agrupadas. El análisis por pares mostró que las secuencias MB1 (Números de acceso: PP761126-PP761129) y MB2 (PP761130-PP761132) tenían una identidad del 99,7% y 99,85, respectivamente, con *B. tabaci* (MK290857.1, MK290858.1). Esto confirma que las poblaciones analizadas en este estudio corresponden a esta principal especie vectora de begomovirus de importancia mundial. Las secuencias MB1 y MB2 tuvieron un porcentaje de identidad del 98,58% y 98,76%, respectivamente, con la secuencia del biotipo A (KJ190489) de los Estados Unidos de América. El árbol filogenético realizado generó clados robustos, con soportes estadísticos bootstrap de 62 a 99%, agrupando tres clados según los tres grupos genéticos: biotipo A, B y Q (Figura 3.1). Las muestras MB1 y MB2 presentaron una relación filogenética con miembros del biotipo A identificados en Estados Unidos de América y Colombia con respaldo estadístico de 71 y 62% de bootstrap, respectivamente.

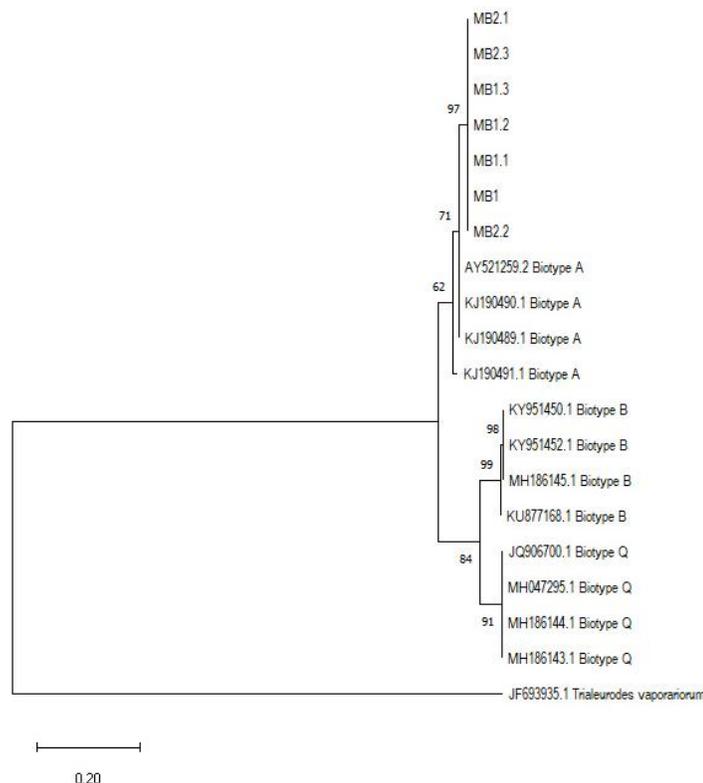


Figura 3. 1 Cladograma inferido con el método de Máxima Verosimilitud (ML) utilizando el gen mtCOI de *Bemisia tabaci* colectadas en Yucatán. Las secuencias utilizadas como referencias se etiquetan según su número de acceso GenBank.

Diversidad y composición del microbiana de *Bemisia tabaci*

Se obtuvieron un total de 112,575 secuencias para la muestra MB1 y 100,343 para MB2. Las curvas de rarefacción indicaron que la profundidad de secuenciación fue satisfactoria para las dos muestras (Figura 3.2). La diversidad alfa de las muestras analizadas (MB1, MB2) fue baja según los diferentes índices de diversidad evaluados; sin embargo, al comparar las dos muestras, MB2 presentó mayor riqueza y diversidad que MB1 (Tabla 3.1). El filo más abundante en las dos muestras analizadas (MB1, MB2) fue Proteobacteria, con presencia de 63,533 y 59,454 secuencias respectivamente. El segundo filo más abundante fue Chlamydiae con 43.207 y 36.473 secuencias para cada muestra, y el tercero más abundante fue Bacteroidetes con 5.506 y 4.163 respectivamente (Figura 3.3). Los filos menos abundantes compartidos por las dos muestras analizadas fueron Actinobacteria, Cyanobacteria, Fusobacteria y Firmicutes, cada uno con menos de 200 secuencias. Phylum Acidobacteria solo se encontró en la muestra MB1 y Verrucomicrobia solo en la muestra MB2.

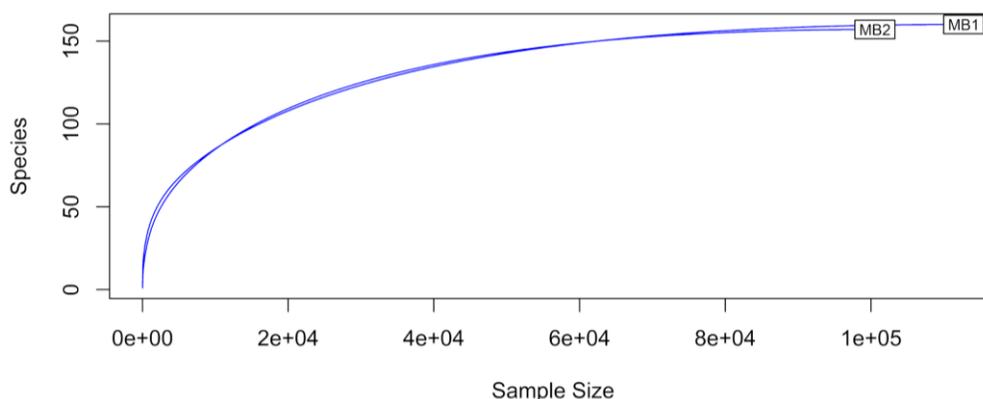


Figura 3. 2 Curvas de rarefacción de bibliotecas de ambas muestras.

Tabla 3. 1 Índices de diversidad alfa de bacterias del análisis de secuenciación del gen 16s rRNA de muestras de *Bemisia tabaci*

Muestra	Riqueza	Menhinick	Shannon	Simpson	Berger-Parker	Simpson-evenness	Shannon
MB1	88	1.034	1.063	0.321	0.823	0.0354	1.063
MB2	93	1.377	1.698	0.546	0.666	0.0197	1.698

La familia más abundante en las dos muestras analizadas (MB1 y MB2) fue Halomonadaceae con 37,713 y 35,759 secuencias, respectivamente. En la muestra MB1, siguieron en abundancia los siguientes grupos taxonómicos, Simkaniaceae, una familia no clasificada que corresponde al filo Proteobacteria y Amoebophilaceae con 39,751, 15,334 y 5,488 secuencias, respectivamente. En la muestra MB2, la familia Halomonadaceae fue seguida en abundancia por una familia no clasificada correspondiente a los phylum Chlamydiae, Enterobacteriaceae y Beijerinckiaceae con 33,657, 15,599 y 7,662 respectivamente (Figura 3.3).

De los simbioses ya reportados en mosquita blanca, en la muestra MB1 *Candidatus Portiera* fue el género más abundante con 36,621 lecturas, *Candidatus Fritschea* con 8,498, *Candidatus Cardinium* con 1,925 y *Candidatus Hamiltonella* con 489. En la muestra MB2 el género más abundante fue *Candidatus Portiera* con 4,269, *Candidatus Fritschea* con 795, *Candidatus Hamiltonella* con 191 y *Candidatus Cardinium* con 128. También se encontraron en gran abundancia bacterias con géneros no clasificados (Figura 3.4). En ambas muestras se encontró el simbionte primario *Portiera* y los secundarios *Fritschea*, *Cardinium* y *Hamiltonella*, todos ellos presentes en mayor abundancia en MB1.

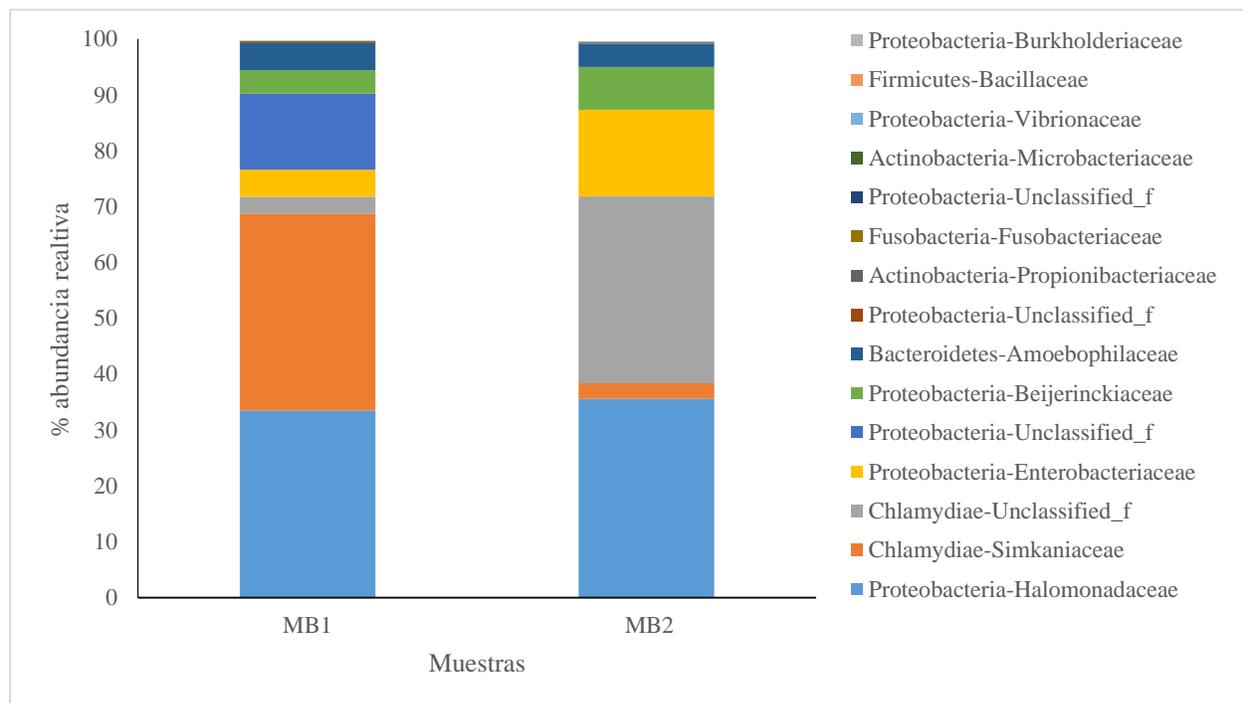


Figura 3. 3 Abundancia relativa de Phylum y familias en MB1 y MB2. Las secuencias que no podían estar en ningún grupo conocido se asignaron como "Unclassified".

Los OTU's más abundante en MB1 fue una *Candidatus* Portiera no clasificado, seguido de dos OTU's no clasificadas pertenecientes a las familias Simkaniacea y Enterobacteriales. En MB2 los OTU's más abundantes son los no clasificados pertenecientes a las familias Chlamydiales, Halomonadaceae y Enterobacteriaceae (Figura 3.5). En total, se encontraron 172 OTU en MB1 en este estudio, mientras que 164 se encontraron en MB2. Se encontraron un total de 12 OTU's de *Candidatus* Portiera, nueve de ellos en MB1 y 11 de ellos en MB2. Se encontraron 12 OTU's de *Candidatus* Cardinium, nueve de ellos presentes en MB1 mientras que en MB2 se encontraron 11. Se encontraron 12 OTU's de *Candidatus* Hamiltonella, 11 de ellos en MB1 y nueve en MB2, y 11 OTU's de *Candidatus* Fritschea, de las cuales todos estaban presentes en MB1, mientras que en MB2 se encontraron ocho. En MB1 el OTU correspondiente al filo Acidobacteria fue una bacteria no cultivada del subgrupo 6, mientras que para MB2 en Verrumicrobia solo se identificó como una bacteria no cultivada del género *Akkermansia*.

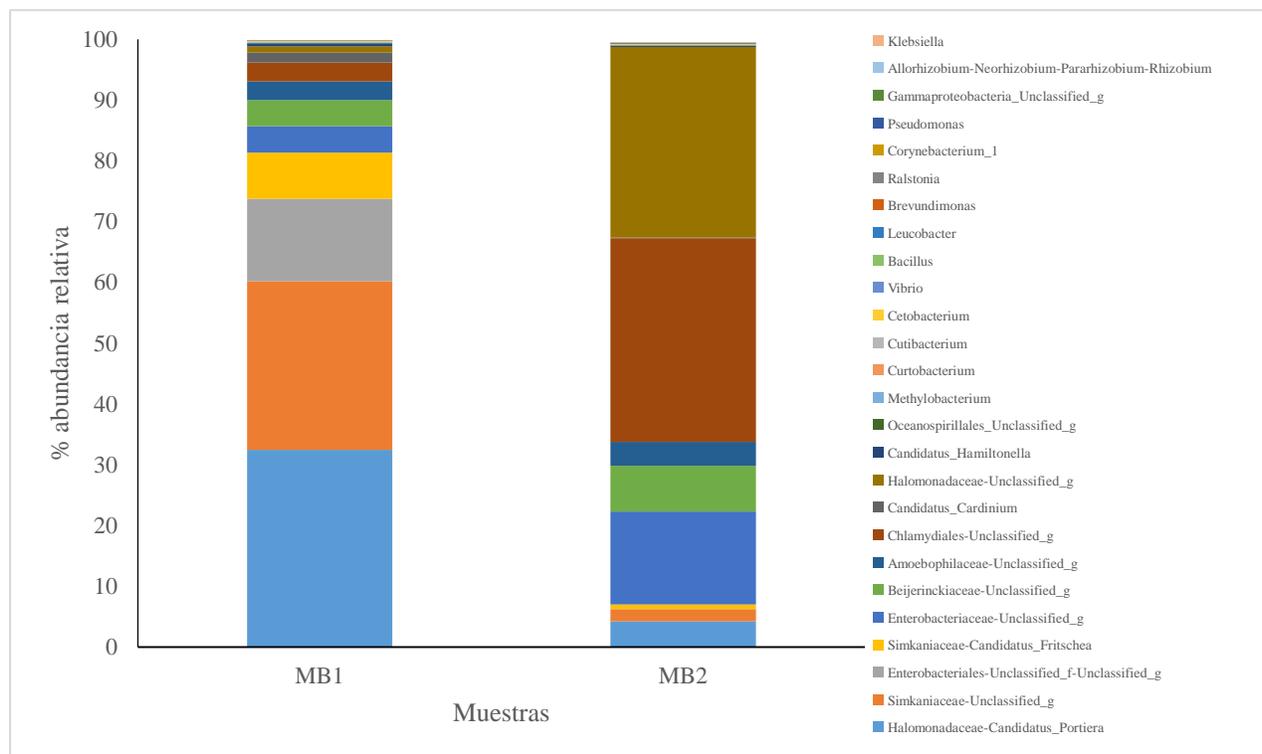


Figura 3. 4 Abundancia relativa de géneros en MB1 y MB2.

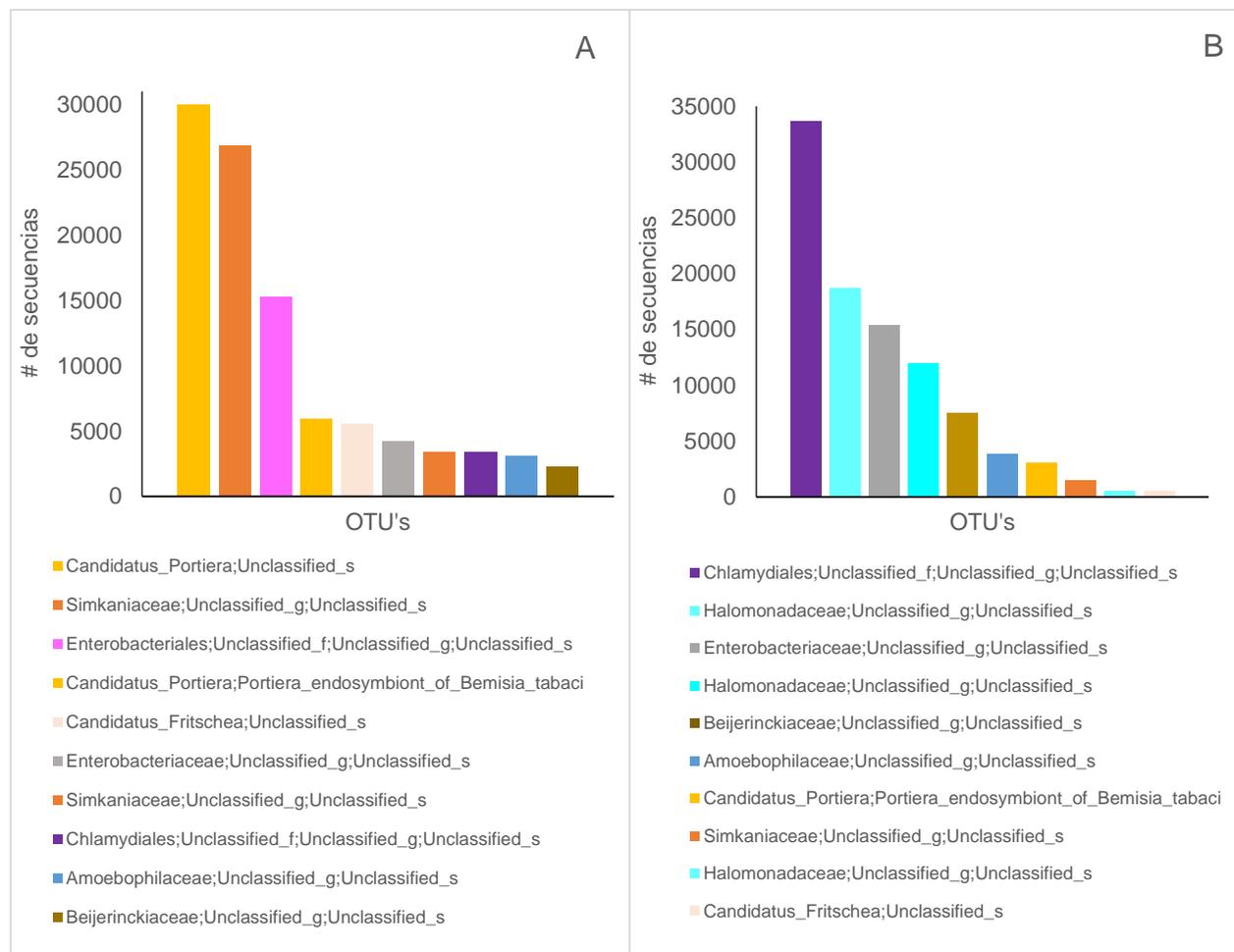


Figura 3. 5 OTUs más abundantes en las muestras analizadas A) MB1, B) MB2.

3.4 DISCUSIÓN

Los biotipos B y Q de mosquita blanca son considerados los más dañinos e invasivos a nivel mundial (De Barro *et al.*, 2011), ambos presentan amplia gama de hospederos, transmisión de virus fitopatógenos, mayor potencial biótico, resistencia a insecticidas, entre otros (Yao *et al.*, 2017, Carnero *et al.*, 2021). En cambio, el biotipo A, que es nativo del Nuevo Mundo, se considera el menos dañino (De Barro *et al.*, 2011). En Baja California Sur se han reportado los biotipos A y B en tomate, chile habanero, pimiento morrón, calabaza y coles de Bruselas (Holgún *et al.*, 2010; Caamal-Chan *et al.*, 2021). En Sinaloa se han reportado los tres biotipos A, B y Q en cultivo de tomate (Carnero-Avilés *et al.*, 2021). Torres-Trujillo *et al.* (2017) reportaron biotipo B para los estados de Coahuila y Durango en cultivos de calabaza, melón, pepino y sandía.

Los valores de diversidad alfa obtenidos de la base de datos SILVA132 son bajos y similares a los ya reportados en mosquita blanca; sin embargo, en el presente trabajo solo se evaluaron dos hospedantes. Jing *et al.* (2013) evaluaron nueve cultivos diferentes y Wang *et al.* (2019) 16 cultivos diferentes. En su trabajo encontraron índices de diversidad por debajo de 1.59 en el índice de Shannon y por debajo de 0.97 para el índice de Simpson; mientras que Caamal-Chan *et al.* (2019) de poblaciones de mosquita blanca colectadas en cinco cultivos diferentes en las zonas áridas del noroeste de México, reportaron diversidad promedio según los índices de Shannon (2.5) y Simpson (0.94). En este estudio, se identificaron nueve filos bacterianos, Caamal-Chan *et al.* (2019) analizaron muestras de mosquita blanca biotipo B colectadas en el norte de México (Baja California Sur) y reportaron 10 filos, de los cuales Chloroflexi, Planctomycetes y Tenericutes no fueron encontrados en este trabajo; sin embargo, dos filos reportados en el presente trabajo y no reportados por Caamal-Chan *et al.* (2019) ya se han encontrado en análisis metagenómicos en otros países. Everett *et al.* (2005) y Wang *et al.* (2019) informan que el filo Chlamydiae y el filo Fusobacteria fueron reportados por Shah *et al.* (2020) de mosquitas blancas recolectadas en cultivos de algodón en Pakistán.

El filo Acidobacteria se identificó con solo 4 lecturas en MB1, así mismo, Verrucomicrobiaceae se identificó con solo 6 lecturas en MB2. Shah *et al.*, (2020) reportaron resultados similares en mosquitas blancas, donde solo se encontró el género *Akkermansia* del phylum Verrumicrobia, mientras que para el phylum Acidobacteria, se reportó un género no asignado, sin familia asignada que corresponde al orden Solibacterales. Caamal-Chan *et al.*, (2019) reportaron la presencia de los filos Verrumicrobia y Acidobacteria. Para el filo Verrumicrobia solo reportaron la familia Verrucomicrobiaceae, y para el filo Acidobacteria solo reportaron la familia Blastocatellaceae.

El phylum Proteobacteria es el más abundante en las dos muestras analizadas (abundancia relativa del 56 al 59%) en este trabajo. Este resultado es similar a otros estudios en microbiomas de mosquita blanca, donde se ha estimado que este filo es el más abundante. Sha *et al.* (2020) reportaron una abundancia de 71 a 80%, mientras que en el estudio de Caamal-Chan *et al.* (2019), este filo fue dominante (96 a 99% de abundancia). En el caso del filo Chlamydiae, desde su primer reporte en mosquita blanca (Thao *et al.* 2003; Everett *et al.* 2005), se ha reportado su presencia como parte del microbioma de este insecto en diferentes trabajos (Ragab 2013; Shi *et al.* 2018; Wang *et al.* 2019). En el presente trabajo se encontró que el filo Chlamydiae es el segundo más abundante, con un 36 a 38%. En ambas muestras se observó una abundancia similar de este filo, lo que concuerda con trabajos donde se ha observado que la aplicación de

insecticidas en mosquitos no afecta al microbioma central (Scolari *et al.*, 2019; Arévalo-Cortés *et al.*, 2020). En nuestro trabajo, los phylum Proteobacteria, Chlamydiae y Bacteroidetes constituyeron el 99 % de la comunidad total de microbiota.

En ambas muestras, la familia más abundante fue Halomonadacea con alrededor del 30% del total de lecturas. En MB1 la segunda familia más abundante fue Simkinaceae, perteneciente al phylum Chlamydiae con un 30%, mientras que en MB2 se encontró una familia no clasificada del phylum Chlamydiae, también con un 30% de abundancia. Caamal-Chan *et al.* (2019) reportaron a la familia Halomanadaceae como la más abundante con un 44% del total y en segundo lugar a la familia Enterobacteriaceae con un 30%. En la mayoría de los estudios del microbioma de insectos, las diferencias se observan en el taxón de familia; sin embargo, estas diferencias se pueden encontrar incluso en grupos de insectos que comparten características similares. Arévalo-Cortés *et al.* (2020) reportaron variación interindividual a nivel de familia en mosquitos resistentes a insecticidas, donde en un grupo de insectos la familia Mitochondria estuvo presente en 51%, mientras que en otro grupo esta familia se encontró en solo 3.5% del total. Debido a los resultados anteriores, no es posible atribuir la diferencia entre MB1 y MB2 a nivel de familia al uso de insecticidas. Del mismo modo, el filo Chlamydia ha sido reportado en unos pocos ejemplares de mosquita blanca, por lo que hasta la fecha no se ha aclarado el papel de estos simbiontes en las mosquitas blancas (Andreason *et al.*, 2020).

Caamal-Chan *et al.* (2019), reportaron para mosquita blanca biotipo B a *Portiera* como el género más abundante, con 24% a 54% y *Hamiltonella* con 17% a 44% en sus muestras analizadas. Sha *et al.* (2020) mostraron que *Portiera* fue el género más abundante con 47% en mosquita blanca biotipo B, seguido del género *Sediminibacterium* con 11% y el género *Cardinium* con 6%. En el presente trabajo, el género *Portiera* se observó en el 32% del total en MB1, mientras que en MB2 este género representó solo el 4%. En poblaciones de mosca blanca biotipo A analizadas en Brasil, se detectaron los géneros simbiontes *Portiera*, *Hamiltonella*, *Wolbachia*, *Cardinium* y *Fritschea* (Marubayashi *et al.*, 2014; de Moraes *et al.*, 2018). Caamal-Chan *et al.* (2019) identificaron las especies *Portiera aleyrodidarum* y *Hamiltonella defence*. En nuestro trabajo identificamos las especies *Portiera* endosimbionte de *Bemisia tabaci*, *Portiera aleyrodidarum*, *Fritschea bemisiae*, *Hamiltonella* endosimbionte de *Bemisia tabaci* y *Hamiltonella defence*.

En el presente estudio se observó una gran diferencia en la abundancia del endosimbionte primario *Portiera* entre las dos muestras, donde la mayor abundancia (casi seis veces más) se obtuvo en la población con aplicaciones de insecticida (MB1). En reportes previos en los que se

evaluaron el efecto de los insecticidas en endosimbiontes de mosquita blanca, las poblaciones de *Portiera* mostraron diferentes patrones en su análisis cuantitativo. Pan *et al.* (2013) evaluaron la abundancia relativa de simbiotes de poblaciones de mosquita blanca en cultivos de pepino, col y algodón con aplicaciones de tiametoxan. Los resultados mostraron que la población de pepino albergaba una mayor cantidad de *Portiera* que las poblaciones de algodón y col, lo que indica que la abundancia de *Portiera* puede variar según el huésped. En nuestro estudio se evaluaron dos hospedantes; Pan *et al.* (2013) analizaron la abundancia relativa de *Portiera* en poblaciones de mosquitas blancas resistentes y susceptibles a tiametoxan y reportaron una mayor cantidad del endosimbionte primario en la población susceptible. Barman *et al.* (2021) observaron que la abundancia de *Portiera* disminuyó cuando se aplicó tiametoxan e imidacloprid, observando una menor cantidad relativa de *Portiera* en la población tratada con imidacloprid, contrario al presente estudio, se observó una mayor abundancia relativa de *Portiera* en la población tratada con abamectina, piriproxifeno, espiromesifeno y omeotato, mientras que en la población no tratada con insecticidas la mayor abundancia relativa fue del orden Chlamydiales, del cual hay muy pocos estudios en insectos y el endosimbionte *Fritschea* pertenece a este orden. Asimismo, estudios previos reportaron que la presencia de *Wolbachia*, *Rickettsia* y *Arsenophonus* hacen que *B. tabaci* sea más susceptible a los insecticidas (Ghanim y Kontseladov 2009). En nuestro análisis, no observamos ninguno de estos simbiotes secundarios.

El estudio del microbioma de la mosquita blanca es algo complejo, considerando la cantidad de especies crípticas, biotipos, la amplia gama de hospederos y su amplia distribución en el mundo. En el presente trabajo se determinó la presencia del simbiote primario *Portiera* y los simbiotes secundarios *Cardinium*, *Hamiltonella* y *Fritschea* en ambas muestras; sin embargo, se destaca la mayor abundancia relativa del endosimbionte primario *Portiera* en la población de mosquita blanca con aplicaciones de insecticidas, lo que es similar a lo reportado en otros trabajos, donde se ha observado esta diferencia a niveles taxonómicos más bajos, por lo que es necesario continuar con el estudio del efecto de insecticidas sobre el microbioma de esta plaga, para comprender mejor el comportamiento de las bacterias bajo el efecto de la presión de selección de los agroquímicos. Asimismo, a pesar de la aplicación de la tecnología de secuenciación de alto rendimiento al estudio de los metagenomas, aquí se presentó una gran cantidad de secuencias que no se han reportado, por lo que se necesita un estudio metagenómico más sólido para aclarar estos resultados.

CAPÍTULO IV

AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DEL BACTERIOFAGO SIOPHI ESPECIFICO A *Bacillus licheniformis*.

4.1 INTRODUCCIÓN

Bacillus licheniformis pertenece a la familia Bacillaceae, la mayoría de los miembros de esta familia presentan como característica distintiva la capacidad de formar endosporas que brindan alta resistencia al calor, la radiación, los productos químicos y la sequía, lo que les permite sobrevivir en condiciones adversas durante un periodo prolongado de tiempo (He et al., 2023). *B. licheniformis* es una especie que se encuentra predominantemente en el suelo, presenta forma de bastón, gram positivo, móvil, anaerobio facultativo y formador de esporas (Logan y De Vos, 2015), pertenece al grupo de *B. subtilis* el cual comprende 2 subespecies (*B. subtilis* subsp. *subtilis* y *B. subtilis* subsp. *spizizenii*) y 12 especies (*B. mojavensis*, *B. valismortis*, *B. amyloliquefasciens*, *B. atrophaeus*, *B. pumilis*, *B. licheniformis*, *B. sonorensis*, *B. aquimaris*, *B. oleronius*, *B. sporothermodurans*, *B. carboniphilus* y *B. endophyticus*) (Mandic-Mulec et al., 2015).

Aunque los aislamientos de *B. licheniformis* principalmente se derivan del suelo, el rango de fuentes de aislamiento es muy amplio e incluye insectos, plumas de aves, tejidos internos de las plantas, cuero de animales, leche, papel y cartón (Logan y De Vos, 2015).

El género *Bacillus* se reporta que son persistentes en aplicaciones industriales como en la producción de alimentos, esto debido a su resistencia a antibióticos y a que forman esporas (Nagai y Yamasaki, 2009). Ante esto, una alternativa es la terapia preventiva con fagos para eliminar las bacterias patógenas de los productos alimenticios, principalmente porque estos son específicos del huésped e infectan solo a especies o cepas específicas (Hagens y Loessner, 2007).

Krasowska et al., (2015), estudiaron la interacción de tres fagos de la familia Myoviridae y uno de Siphoviridae contra *B. subtilis*, los fagos son morfológicamente diferentes y se caracterizan por cabezas icosaedricas y colas contráctiles (fagos SIOΦ, SUB ω y SPO σ) o no contráctiles (fago AR π), estos fagos resultaron con diferente especificidad hacia 20 cepas de *B. subtilis*.

El genoma del fago SIOΦ (SIOphi) tiene 154 kpb con solo cuatro proteínas de la cápside, este fago conserva una actividad estable después de 3 horas a temperaturas que oscilan entre -80 °C

y 50 °C, es resistente a pH ácido (4.0) y alcalino (9.0 y 10.0) y presenta un porcentaje de adsorción al huésped de alrededor del 50 %, con una liberación de partículas de ~74 de la células huésped y un título de fagos de 10^{13} , considerándolo un candidato idóneo para su uso en la industria (Krasowska *et al.*, 2015).

En el presente estudio se obtuvo al fago SIOphi teniendo un buen control hacia *B. licheniformis*, se evaluaron sus características para determinar su efectividad para esta cepa obtenida del sistema digestivo de mosquita blanca.

4.2 MATERIALES Y MÉTODOS

Toma de muestras

Las muestras se tomaron de acuerdo al hábitat del insecto en estudio. Se tomaron tres muestras: la primera fue a partir del macerado de abdómenes de mosquita blanca, la segunda se tomó de áreas que presentaron el hongo fumagina, el cual se origina a partir de la excreción del insecto, la tercera muestra se tomó a partir de hojas donde se encontró oviposición. La primera y tercera muestras se tomaron de hojas de *Piper auritum* y la segunda de *Carica papaya*, de los invernaderos del CICY. Las muestras recolectadas fueron inmediatamente llevadas al laboratorio para ser procesadas.

Para el procesamiento de la primera muestra, se realizó el macerado con un pistilo estéril en un tubo de 1.5 mL que contenía 400 uL de buffer PBS con aproximadamente 100 insectos completos, una vez completado el macerado, se lavó el pistilo sobre el tubo de 1.5 mL con 600 ul, para obtener un total de 1 mL de macerado (este procedimiento se llevó a cabo dos veces para obtener la mayor cantidad de macerado de insectos). Para la segunda y tercera muestra, se lavó con 5 mL de buffer PBS el área de la hoja que presentaba fumagina u oviposición respectivamente, el resultado del lavado se recuperó y guardó en tubos Corning de 15 mL para cada muestra.

Enriquecimiento de las muestras

Las bacterias obtenidas de la microbiota intestinal de mosquita blanca de la etapa anterior fueron reactivadas de manera individual por el método de plaqueo en placas con TSA; posteriormente se tomó una colonia de cada bacteria y de manera individual se cultivaron en TSB, se incubaron por 24 h a 37 °C. Enseguida, del cultivo anterior se mezcló 1 mL de cada bacteria en tubos Corning de 50 mL (para hacer un pool de bacterias) los cuales fueron inoculados con las tres muestras y se incubaron en condiciones aerobias a 37 °C durante 18 a 24 h. Transcurrida la

incubación, los tubos fueron agitados en vortex y centrifugados a 13,800 xg por 10 min a 4 °C; se recuperó del sobrenadante y se filtró a través de membranas de nitrocelulosa con un tamaño de poro de 0.22 μ m, este filtrado se le denominó “Lisado”.

Identificación de bacteriófagos por la prueba de “spot”

Para evidenciar la presencia de bacteriófagos líticos contra las bacterias de estudio, se realizó la prueba de goteo (spot) mediante la técnica de la doble capa agar con los lisados de cada muestra. Para ello se mezcló 1 mL de bacteria en fase de crecimiento exponencial, en un tubo que contenía 3 mL de TSB-agarosa 0.4 % (p/v) precalentado y licuado a 45 °C y se vertió el contenido sobre cajas Petri con TSA. Estas se dejaron secar y finalmente se colocó 5 μ L de cada lisado sobre la capa de agar suave; una vez que las cajas se secaron, se invirtieron y se incubaron a 37 °C durante 18-24 h (este procedimiento se repitió para cada una de las bacterias en estudio y cada lisado donde se suponía la presencia de bacteriófagos). La presencia de una placa de lisis o “calva” en donde se colocó la gota, indica la presencia de bacteriófagos líticos contra esa bacteria (Clokier y Kropinski, 2009).

Purificación del bacteriófago

Se utilizó la técnica de la doble capa agar. La cepa *Bacillus licheniformis* obtenida del abdomen de mosquitos blancos presentó placas de lisis, por lo que fue utilizada como bacteria huésped para el aislamiento del bacteriófago. Esta cepa fue cultivada en caldo Tripticosa de soya a 37 °C por 24 horas. La evaluación de los parámetros se realizó con *B. licheniformis* en fase logarítmica de su crecimiento (5 horas). Enseguida, se mezcló 1 mL de bacteria y 100 μ L del lisado que contenía bacteriófagos, en un tubo que contenía 3 mL de TSB-agarosa 0.8 % (p/v) precalentado y licuado a 45 °C; se homogenizó la muestra y se vertió sobre cajas Petri con TSA, se dejó secar y se incubaron las cajas a 37 °C durante 18-24 h. Transcurrido el tiempo, se seleccionaron placas con base a su tamaño y claridad, se transfirieron a tubos eppendorf de 1.5 mL conteniendo 1 mL de extracto de carne al 1.5 % (BIOXON, México). El procedimiento de doble capa agar y recuperación de placas individuales se repitió cuatro veces para obtener fagos únicos y purificados (Clokier y Kropinski, 2009).

Propagación de Bacteriófagos

Para la propagación de los bacteriófagos se utilizó la metodología propuesta por Carey-Smith et al. (2006), con algunas modificaciones. Brevemente, se mezcló 1 mL de la cepa hospedadora en

su fase de crecimiento exponencial con 100 μ L del bacteriófago purificado, en un tubo de ensayo que contenía 3 mL de TSB-Agarosa 0.8 % (p/v) licuado a 45 °C; el contenido se vertió en cajas de Petri con TSA (BIOXON, México) y se dejaron secar. Las cajas se incubaron a 37 °C durante 18-24 h. Una vez desarrolladas las placas (replicación de los bacteriófagos), se recuperó la capa suave utilizando un raspador de células estéril, se colocó en tubos de 1.5 mL que contenían extracto de carne, el eluido final se centrifugó a 8, 500 rpm durante 10 min a 4 °C para eliminar células bacterianas y residuos del medio de cultivo. El sobrenadante fue filtrado por membranas de nitrocelulosa con tamaño de poro de 0.45 μ m de diámetro. El filtrado se almacenó a 4 °C protegido de la luz.

Concentración y titulación del Bacteriófago

Para la concentración y titulación del fago, se tomaron 40 mL del bacteriófago propagado en el paso anterior y se centrifugó a 40,000 xg durante 2 h. El sobrenadante fue decantado y el sedimento se resuspendió en 10 mL de buffer de extracto de carne y finalmente se filtró a través de un acrodisco de tamaño de poro de 0.22 μ m de diámetro. El título de los bacteriófagos se determinó mediante el método propuesto por Clokie y Kropinski (2009); brevemente, se prepararon diluciones decimales seriadas en buffer extracto de carne al 1.5 % (10^{-1} a 10^{-10}) del bacteriófago concentrado y se realizó la técnica de la doble capa de agar. Finalmente, fueron seleccionadas las diluciones en donde se pudo contar entre 30 y 300 placas y se calculó la concentración mediante la siguiente fórmula:

$$\underline{\text{UFP}} = \text{Número de placas} \times 10 \times \text{recíproco de la dilución contada (1)}$$

mL

Microscopio de transmisión por electrones

La morfología del fago se determinó mediante microscopía electrónica de transmisión (TEM) para observar preparaciones teñidas (Luo et. al. 2012). Las partículas del fago purificadas se suspendieron en ácido fosfotungstico al 2 % (peso/volumen) (pH 7.2), posteriormente se colocaron en la superficie de la rejilla cubierta de carbón/descargado con brillo (rejilla de cobre de malla 200).

Prueba de rango de hospederos

La determinación del rango de hospederos se realizó por medio de la prueba de spot mencionada anteriormente.

Estabilidad térmica y de pH

La estabilidad de fagos se llevó a cabo como lo describe Luo *et al.* (2012) con algunas modificaciones. Brevemente, para examinar la estabilidad térmica, se incubó reservas de fagos (1×10^8 ufp/ml en buffer de extracto de carne al 1.5 %) por separado durante 60 min a rangos de temperatura de 20 a 60 ° C. Para la estabilidad del pH, se utilizó 1×10^8 ufp/ml de suspensión de fagos a un buffer de extracto de carne a diferentes pH (pH 3–10) y luego se incubó a 37 °C durante 24 h. Después de la incubación, los fagos supervivientes se contaron mediante el método de agar de doble capa. Todas las pruebas fueron realizadas por triplicado.

Extracción de ADN del fago y análisis del genoma

Para la extracción de ADN de los bacteriófagos se utilizó la metodología propuesta por Sambrook y Rusell (2001), con algunas modificaciones. Para ello, se colocó 1 ml de suspensión de bacteriófagos concentrados en un tubo para microcentrifuga de 1.5 ml, al cual se adicionó 2 U de DNasa I (Sigma-Aldrich, USA) y 2 U de RNasa A (Sigma-Aldrich, USA), enseguida se incubó a 37 °C, durante 30 min. Después de la incubación se adicionó 40 μ l de EDTA (Sigma, USA) 0.5 M (pH 8.0), 25 μ l de proteinasa K (Qiagen, Alemania) (20 mg ml⁻¹) y 50 μ l de dodecil sulfato de sodio (SDS) (Sigma, USA) al 10 % mezclándose por inversión de 5 a 10 veces. Después los tubos con las mezclas se incubaron a 56 °C durante 2 h. Finalizada la incubación, se agregó un volumen de fenol equilibrado (Sigma-Aldrich, USA) y se mezcló por inversión hasta que se observó la mezcla completamente emulsificada. Posteriormente se centrifugó a 3,500 rpm durante 10 min a 25 °C. La fase acuosa se transfirió a un tubo para microcentrifuga de 1.5 ml. Posteriormente se añadió un volumen equilibrado de fenol-cloroformo 1:1 (v/v) (Sigma Aldrich, USA) y se repetió la centrifugación bajo las mismas condiciones tres veces más. Finalizada la centrifugación, se transfirió la fase acuosa a un tubo para centrifuga de 1.5 mL y se adicionó 200 μ l de acetato de sodio 3M y alcohol etílico absoluto hasta llenar el tubo. A continuación, se incubó a -20 °C, durante toda la noche. Concluida la incubación, se centrifugará a 13,000 rpm por 30 min, se retiró el sobrenadante y se adicionó un volumen de alcohol etílico al 70 % y se centrifugó nuevamente a

13,000 rpm por 15 min. Se retiró el sobrenadante y se dejó secar la pastilla a temperatura ambiente, se resuspendió en 100 µl de agua libre de nucleasas. La concentración y pureza se verificaron en un espectrofotómetro.

Secuenciación del Genoma

La secuenciación del ADN se realizó en el Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo (CIAD) unidad Mazatlán, usando el sistema de secuenciación MiniSeq (Illumina, Inc.). Cada genoma secuenciado fue ensamblado *de novo* utilizando el programa bioinformático Iterative Virus Assembler (IVA) (v1.0.9). Para remover las secuencias de los adaptadores que puedan ser acarreadas del proceso de secuenciación y hacer un filtrado de los “reads” de acuerdo a su calidad, se utilizó la opción Trimmomatic (v0.38).

Los marcos de Lectura Abiertos (ORFs, por sus siglas en inglés) mayores a 100 pb fueron identificados en GeneMark (<http://exon.gatech.edu/GeneMark/>) y en ORF finder (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/orffinder/>). Los ORFs, predichos en GeneMark, fueron analizados por alineamiento local (BLAST) mediante la base de datos del Centro Nacional para la Información Biotecnológica (NCBI, por sus siglas en inglés) contra la base de datos de secuencias de proteínas no redundantes; mientras que para ORF finder se utilizó la identificación automática mediante SmartBlast del NCBI; además se realizó la búsqueda de dominios de proteínas conservadas utilizando la base de datos InterProScan (<https://www.ebi.ac.uk/interpro/search/sequence-search>).

4.3 RESULTADOS

Aislamiento del fago

La prueba del spot, utilizando la cepa bacteriana *B. licheniformis*, dio positivo a la presencia de bacteriófagos. Mediante el método de la doble capa, se aisló el bacteriófago al cual se le nombró en un principio como MB4 (Figura 4.1).

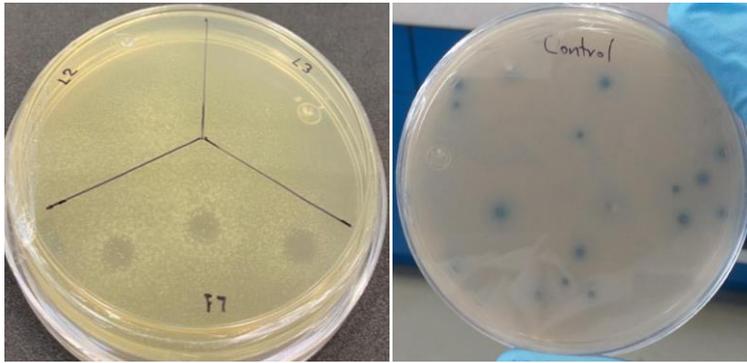


Figura 4. 1 Placas de lisis, uniformes, de forma circular de aproximadamente 0.1-0.5 mm de diámetro.

Identificación del fago

Al analizar la secuencia obtenida del fago (147,395 pb) presentó un porcentaje de identidad de 96.2 % con el fago SIOphi (146,698 pb, número de acceso: KC699836) obtenido de *Bacillus subtilis*. Los viriones de nuestro fago obtenido tienen morfología de Myovirus, es decir, una estructura cabeza-cola con una cola larga y contráctil y una cabeza icosaédrica (Figura 4.2). Este fago tiene ADN polimerasa I (EC 2.7.7.7).

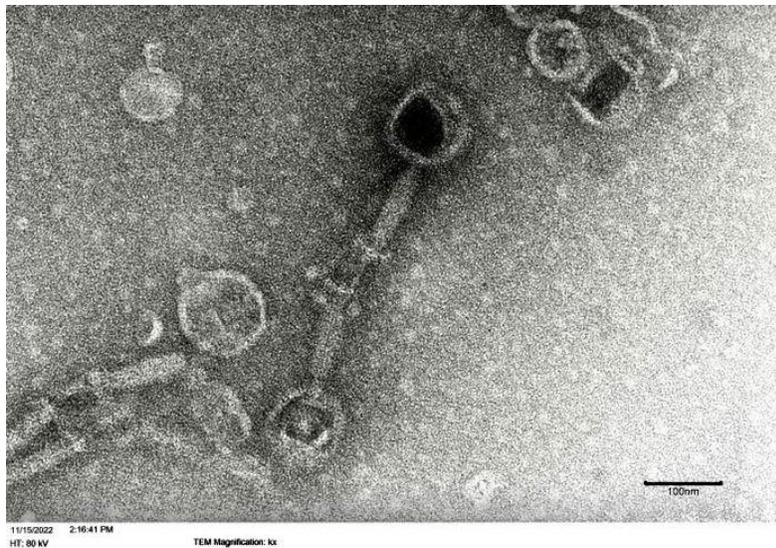


Figura 4. 2 Microfotografía electrónica del fago SIOphi.

Evaluación de la termoestabilidad

Los resultados mostraron que el bacteriófago SIOphi presentó la mayor supervivencia a los 20° C por 60 minutos, disminuyendo su viabilidad a medida que la temperatura aumenta (Figura 4.3).

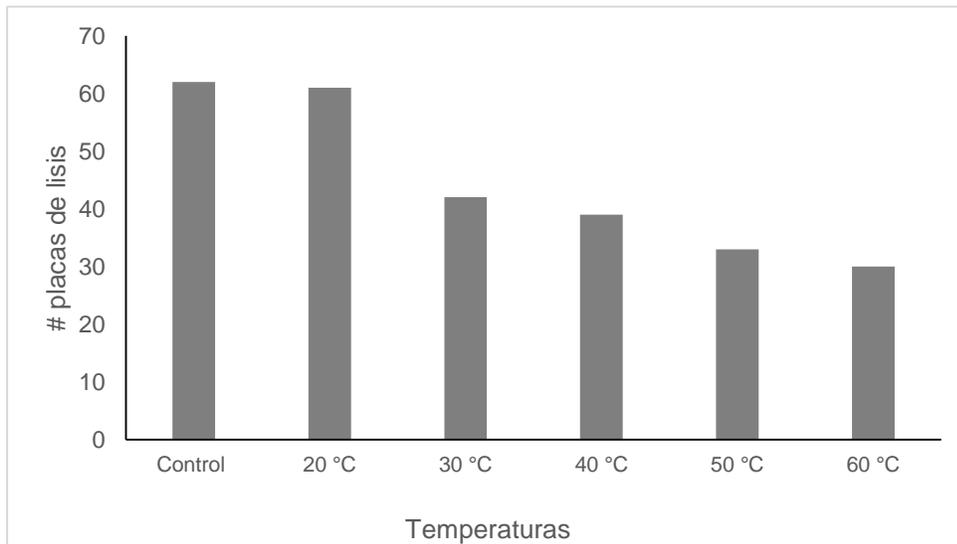


Figura 4. 3 Estabilidad del fago SIOphi a diferentes temperaturas.

Evaluación a diferentes pH

El fago SIOphi presenta su máxima viabilidad en pH de 7, a medida que aumenta o disminuye el pH, disminuye la viabilidad del fago (Figura 4.4).

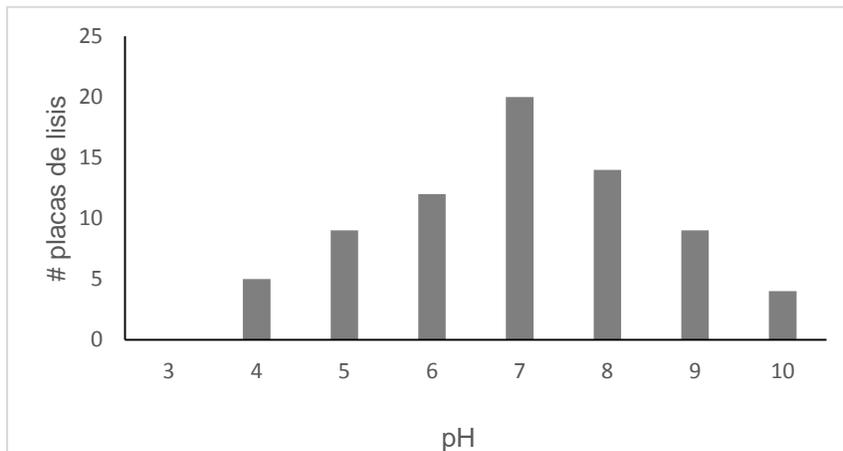


Figura 4. 4 Viabilidad de fago SIOphi a diferentes pH.

Espectro de hospederos.

Se sometieron a la prueba del "spot test" cuatro cepas obtenidas del sistema digestivo de mosqueta blanca (Tabla 4.1), *B. licheniformis* fue la única cepa que presentó placas de lisis.

Tabla 4. 1 Cepas sometidas al rango de hospederos del fago SIOphi

Muestra	Organismo	Fago SIOphi
MB3	<i>Streptomyces</i> sp.	-
MB4	<i>Bacillus licheniformis</i>	+
MB8	<i>Solibacillus silvestris</i>	-
MB11	<i>Bacillus isronensis</i>	-
MB12	<i>Paenibacillus lautus</i>	-

Cinética de crecimiento de la cepa *B. licheniformis*

La cinética de crecimiento evidenció que a partir de la segunda hora y hasta la quinta hora la cepa se encuentra en la fase logarítmica de su crecimiento (Figura 4.5).

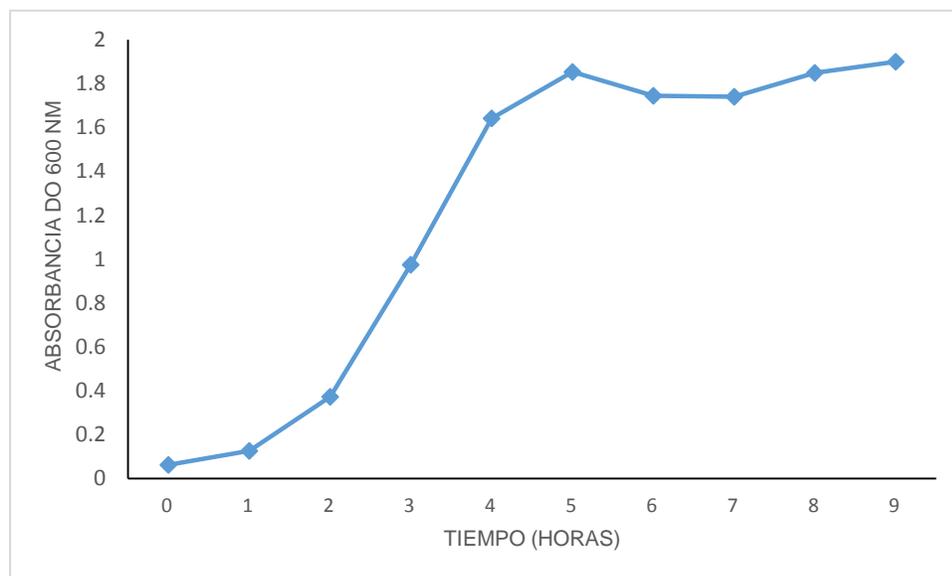


Figura 4.5 Cinética de crecimiento de la cepa *Bacillus licheniformis*.

Reducción del crecimiento bacteriano.

La infección de *B. licheniformis* con el fago SIOphi (7×10^8 UFP.ml⁻¹) fue evaluada por 9 horas. Se observó que el bacteriófago SIOphi es capaz de lisar a *B. licheniformis* impidiendo su normal crecimiento (Figura 4.6).

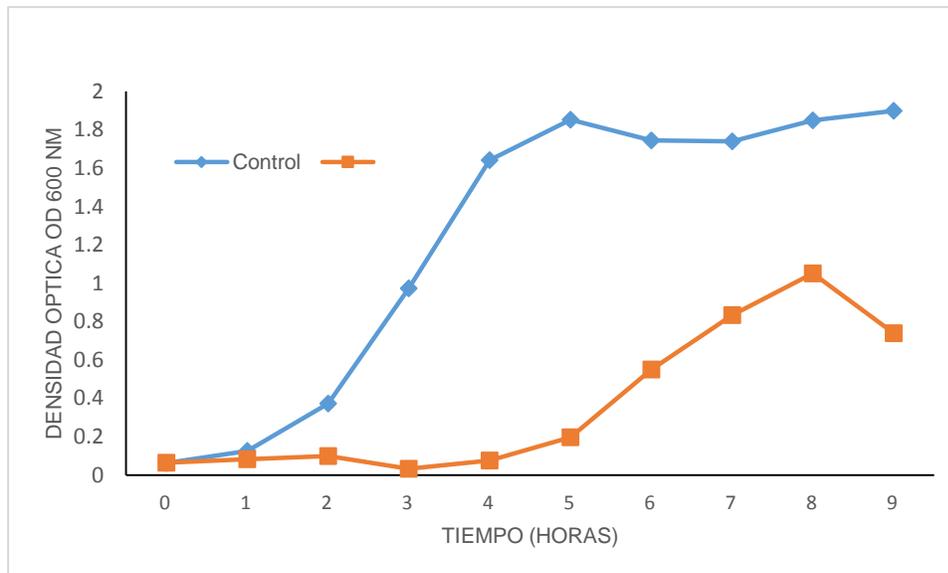


Figura 4. 6 Efecto del fago SIOphi sobre la cepa *Bacillus licheniformis*.

4.4 DISCUSIÓN

En el presente trabajo se aisló al bacteriófago SIOphi virulento contra la cepa *Bacillus licheniformis*. El fago SIOphi pertenece a la familia Herelleviridae, es la única especie del género Siophivirus, cuenta con 206 secuencias de codificación de proteínas únicas predichas, no se han localizado ARNt ni repeticiones terminales (Krasowska *et al.*, 2015). Los miembros de la familia Herelleviridae son virus bacterianos que infectan a miembros del filo Firmicutes. En el Noveno Informe del ICTV, este grupo fue reportado como el género SPO1-likevirus (https://ictv.global/taxonomy/taxondetails?taxnode_id=202100268). Los genomas son dsDNA de 125-170 kbp (Barylski *et al.*, 2020).

Los genomas de los miembros de la familia Herelleviridae consisten en dsDNA lineal con repeticiones terminales largas de 2 a 16 kbp (Perkus y Shub 1985, Klumpp *et al.*, 2008, Łobocka *et al.*, 2012, Cadungog *et al.*, 2015). Los genomas tienen entre 106 y 170 kbp (según los registros

del NCBI con genomas de miembros conocidos de la familia). Los tRNA están codificados por algunos miembros. El genoma del fago SPO1 de *Bacillus* tiene timidina reemplazada por 5-hidroximetiluridina. Las modificaciones del ADN también están presentes en algunos miembros de la familia (Okubo *et al.*, 1972, Parker y Eiserling 1983, Klumpp *et al.*, 2010).

La microscopia electrónica reveló que el fago SIOphi concuerda morfológicamente por el reportado por Krasowska *et al.*, (2015), ellos reportan al fago SIOphi morfológicamente perteneciente a la familia Myoviridae debido a la aparición de cabeza icosaedrica, cola contráctil con cuello, collar y placa base, la longitud de la cabeza y cola también les indicó una relación con los Myoviridae.

Con respecto a la estabilidad a diferentes temperaturas, nuestros resultados muestran que a medida que se aumenta la temperatura disminuye la viabilidad del fago, lo cual concuerda con Krasowska *et al.*, (2015), quienes reportaron que el fago SIOphi perdió la actividad total después de 2 min a 80 °C, 30 min a 70 °C y a 60 °C solo se observó el 1 % de la actividad original después de un periodo de incubación de 3 h. La temperatura juega un papel crucial en la supervivencia de los bacteriófagos, la capacidad de fijación y la duración del período de latencia, de acuerdo con Krasowska *et al.*, (2015) y a nuestros resultados, el fago SIOphi retienen una actividad estable después de 1 hora a temperaturas que oscilan entre -80 °C y 60 °C.

La acidez y la alcalinidad del medio ambiente son otros factores importantes que influyen en la estabilidad de los fagos. En el presente trabajo el pH idóneo para el fago SIOphi fue el 7, Krasowska *et al.*, (2015) reportaron que el fago SIOphi después de 1 hora incubado a pH 2 pierde su capacidad infectiva, así también presento su mayor capacidad infectiva en el rango de pH de 6 a 8, sin embargo, a pH de 4 y 10 nuestro fago presentó viabilidad.

CAPÍTULO V

5.1 DISCUSIÓN GENERAL

En el presente estudio se realizó la búsqueda de bacterias simbiotes del sistema digestivo de dos plagas importantes en nuestro país, trips del aguacate y mosquita blanca. El cultivo del aguacate es uno de los más importantes en México, los trips han pasado a ser una de las plagas más importantes, y Michoacán figura como el principal estado productor de este fruto. La mosquita blanca es considerada una plaga polífaga que se presenta en varias especies de hortalizas en México, pero su principal importancia es que transmite virus fitopatógenos principalmente Begomovirus, por lo que nuestro objetivo fue la obtención de bacterias cultivables para las cuales se pudiera realizar la búsqueda de fagos virulentos de dichas bacterias, en el caso de trips la limitante fue la distancia de los lugares de muestro por lo que únicamente se pudo llegar a la etapa de obtención de los cultivos de bacterias, para mosquita blanca se obtuvo un fago virulento para la cepa de *B. licheniformis* aislada de sus sistema digestivo.

Para el caso de trips en aguacate no hay literatura publicada sobre las bacterias presentes en el sistema digestivo de poblaciones en México; sin embargo, en Colombia se reportan a las bacterias de los géneros *Bacillus*, *Serratia*, *Moraxella*, *Pantoea*, *Sphingomonas* y *Wolbachia* (Cano-Calle *et al.*, 2022), en el presente trabajo se encontró a *Bacillus* y *Weissella*, estos géneros ya han sido reportados en insectos plaga como *O. nubilalis*, *T. pityocpampa* y *D. ponderosae* (Adams *et al.*, 2011; Belda *et al.*, 2011; Ince *et al.*, 2008) sin embargo, no se conoce si estas bacterias son de vital importancia por lo que es necesario estudiar el papel que desempeñan estas bacterias en el sistema digestivo de estos insectos, ya que se conoce que las bacterias desempeñan funciones importantes en los insectos, como el crecimiento, la aptitud física, la nutrición, el desarrollo, la protección contra patógenos y parasitoides, la transmisión de virus y la supervivencia en ambientes hostiles (Dickey *et al.*, 2014; Douglas, 2009; Engel y Moran, 2013).

En mosquita blanca existen diversos estudios sobre la microbiota del sistema digestivo, se reporta al endosimbionte primario *Candidatus* Portiera y los secundarios *Hamiltonella*, *Arsenophonus*, *Cardinium*, *Wolbachia*, *Fritschea*, *Rickettsia* y *Hemipteriphilus* en las especies crípticas y biotipos analizados en varias regiones del mundo (Wang *et al.*, 2019); sin embargo, el simbiote primario que se presentó en mayor abundancia en el presente trabajo es una bacteria no cultivable. Se ha dilucidado que *Candidatus* Portiera aleyrodidarum puede aportar tanto aminoácidos esenciales como carotenoides a mosquita blanca (Luan *et al.* 2015; Santos-Garcia *et al.*, 2012, 2015; Sloan

y Moran 2012; Xie *et al.*, 2012), sin la presencia de este endosimbionte no pueden sobrevivir, como se demostró en varios estudios de eliminación con antibióticos (Zhao *et al.*, 2019; Shan *et al.*, 2016; Zhang *et al.*, 2015). Con respecto a los simbioses secundarios, se ha reportado que ejercen un papel en la biología y desempeño de mosquita blanca; estudios comparativos entre mosquitas blancas infectadas con *Hamiltonella* y libres de *Hamiltonella* nos muestran claros beneficios de este endosimbionte: *Hamiltonella* parece ser capaz de aumentar la fecundidad, la supervivencia y el tamaño corporal adulto de la mosca blanca al tiempo que disminuye el tiempo de desarrollo (Su *et al.*, 2013). Por otra parte, *Rickettsia* es costosa para su huésped y, si proporciona algún beneficio, es poco probable que sea nutricional (Milenovic *et al.*, 2022). También se ha estudiado el papel de estos endosimbiontes en la supervivencia a insecticidas, Ting *et al.* (2021) reportaron que en mosquitas blancas infectadas con *Cardinium* influía significativamente en la tolerancia a tiameotoxan e imidacloprid y esta influencia variaba entre sus diferentes poblaciones.

5.2 CONCLUSIÓN

En el estudio de las bacterias simbioses presentes en el sistema digestivo de trips (*Frankliniella* y *Scirtothrips*) del cultivo de aguacate se obtuvieron a las bacterias cultivables *Bacillus simplex* y *Weissella cibaria*, si bien es el primer trabajo publicado en estas plagas en México, se requiere conocer el papel que desempeñan en estos insectos. Para *Bemisia tabaci* se determinó la presencia del simbioses primario *Portiera* y los simbioses secundarios *Cardinium*, *Hamiltonella* y *Fritschea* en muestras analizadas con y sin aplicación de insecticidas en mosquita blanca, esto es una aportación de las bacterias y el biotipo que se presenta en el estado de Yucatán. Se identificó y caracterizó un bacteriófago lítico, el cual en ensayos de laboratorio demostró una alta supresión al crecimiento de la bacteria *B. licheniformis*. La búsqueda de fagos que se puedan utilizar para suprimir bacterias que desempeñan funciones importantes en los insectos es una herramienta novedosa y una alternativa amigable con el medio ambiente, ante el inminente escenario de más casos de resistencia a insecticidas y al papel que desarrollan las bacterias en esta problemática, la interacción entre estos organismos debe seguir siendo estudiada.

5.3 PERSPECTIVAS

El estudio de bacterias en el sistema digestivo de trips como insectos plaga del cultivo de aguacate Hass y mosquita blanca de diversas hortalizas, es una línea de investigación muy

prometedora, debido a la amplia gama de insecticidas que son aplicadas para suprimir las poblaciones de estos insectos, por lo que conocer la abundancia de bacterias presentes y el papel que desempeñan estas en la biología y hábitos fitófagos de la plaga, puede proporcionar herramientas y ofrecer alternativas de control, principalmente ante la presencia de resistencia a insecticidas. El bacteriófago aislado en este estudio, presenta características potenciales para su utilización contra *B. licheniformis*, por lo que se requiere continuar el estudio del papel que desarrolla esta bacteria en el sistema digestivo de la mosquita blanca.

LITERATURA CITADA

Ackerman HW. 1998. Tailed bacteriophages: the Caudovirales. *Advances Virus Research*, 51: 135-201.

Adams AS, Adams SM, Currie CR, Gillette NE, Raffa KF. 2010. Geographic Variation in Bacterial Communities Associated With the Red Turpentine Beetle (Coleoptera: Curculionidae). *Environmental Entomology*, 39: 406-414.

Adams A, Jordan M, Adams S, Suen G, Goodwin L, Davenport K, Currie C, Raffa K. 2011. Cellulose-degrading bacteria associated with the invasive woodwasp *Sirex noctilio*. *ISME J* 5:1323–1331. <https://doi.org/10.1038/ismej.2011.14>

AINIA. 2016. Bacteriófagos para el control microbiológico de la agricultura. En línea <https://www.ainia.es/tecnoalimentalia/tecnologia/bacteriofagos-para-el-control-microbiologico-de-la-agricultura/> Fecha de consulta 27 de febrero de 2020.

Andreason SA, Shelby EA, Moss JB, Moore PJ, Moore AJ, Simmons AM. 2020. Whitefly Endosymbionts: Biology, Evolution, and Plant Virus Interactions. *Insects* 11:775 <https://doi.org/10.3390/insects11110775>

Ankrah NYD, Luan J, Douglas AE. 2017. Cooperative metabolism in a three-partner insect-bacterial symbiosis revealed by metabolic modeling. *J Bacteriol* 199:15 : e00872-16 DOI 10.1128/JB.00872-16

Arévalo-Cortés A, Mejía-Jaramillo AM, Granada Y, Coatsworth H, Lowenberger C, Triana-Chavez O. 2020. The Midgut Microbiota of Colombian *Aedes aegypti* Populations with Different Levels of Resistance to the Insecticide Lambda-cyhalothrin. *Insects* 11(9): 584. <https://doi.org/10.3390/insects11090584>

Ascensión BG, Bravo MH, González HH, Johansen NRM, Becerril REA. 1999. Fluctuación poblacional y daño de trips en aguacate cv. Hass. *Revista Chapingo Serie Horticultura* 5: 291-296.

Ascensión BG. 2000. Fluctuación poblacional, daño e identificación de trips del aguacate cv. Hass en Michoacán, México. Tesis de Maestría en Ciencias. Colegio de Postgraduados en Ciencias Agrícolas, Montecillo, Texcoco, Edo. México. 82 p.

- Ballina-Gómez H, Ruiz-Sánchez E, Chan-Cupul W, Latournerie-Moreno L, Hernández-Alvarado L, Islas-Flores I, Zuñiga-Aguilar JJ. 2013.** Response of *Bemisia tabaci* Genn. (Hemiptera: Aleyrodidae) biotype B to genotypes of pepper *Capsicum annuum* (Solanales: Solanaceae). *Neotrop Entomol* 42(2):205-10 doi: 10.1007/s13744-012-0106-0
- Barman M, Samanta S, Thakur H, Chakraborty S, Samanta A, Ghosh A, Tarafdar J. 2021.** Effect of neonicotinoids on bacterial symbionts and insecticide-resistant gene in whitefly, *Bemisia tabaci*. *Insects* 12(8): 742 10.3390/insects12080742
- Baumann P, Moran NA, Baumann L. 2006.** Bacteriocyte-Associated Endosymbionts of Insects. In: Dworkin M, Falkow S, Rosenberg E, Schleifer KH, Stackebrand E (eds) *The Prokaryotes*. Springer, New York, NY. https://doi.org/10.1007/0-387-30741-9_16
- Barylski et al. 2020.** ICTV Virus Taxonomy Profile: Herelleviridae, *Journal of General Virology*, 101, 362–363.
- Beitia F, Sabater-Muñoz B, Tormos J, Santos-García D, Silva FJ. 2015.** Influencia del cambio climático y de las bacterias simbiotes en brotes poblacionales de la mosca blanca *Bemisia tabaci*. *Agricola Vergel*, 5 p.
- Bennett KL, Gómez-Martínez C, Chin Y, Saltonstall K, McMillan WO, Rovira JR, Loaiza JR. 2019.** Dynamics and diversity of bacteria associated with the disease vectors *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus*. *Sci Rep* 9:12160. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-48414-8>
- Blanton AG, Peterson BF. 2020.** Symbiont-Mediated Insecticide Detoxification as an Emerging Problem in Insect Pests. *Front Microbiol* 11:547108. doi: 10.3389/fmicb.2020.547108
- Boucher DH, James S, Keeler KH. 1982.** The ecology of mutualism. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 13: 315–347.
- Boykin LM, Shatters RG, Rosell RC, McKenzie CL, Bagnall RA, De Barro P, Frohlich DR. 2007.** Global relationships of *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae) revealed using Bayesian analysis of mitochondrial COI DNA sequences. *Mol Phylogenet Evol* 44: 1306-1319
- Bronstein JL. 1994.** Conditional outcomes of mutualistic interactions. *Trends in Ecology and Evolution*, 9: 214–217.

Caamal-Chan MG, Loera-Muro A, Castellanos T, Aguilar-Martinez CJ, Marfil-Santana MD, Barraza A. 2019. Analysis of the bacterial communities and endosymbionts of natural populations of *Bemisia tabaci* in several crops fields from Mexico semi-arid zone. *Ann Microbiol* 69:909-922. <https://doi.org/10.1007/s13213-019-01483-6>

Caamal-Chan MG, Loera-Muro A, Barraza A, Holguín-Peña RJ, Marfil-Santana MD, Aguilar-Martínez CJ, Sánchez-Sotelo IS. 2021. Identificación de la especie basada en el gen Citocromo Oxidasa I mitocondrial y detección de Begomovirus de *Bemisia tabaci* en cultivos de Baja California Sur, México. *Southwestern Entomologist* 45(4):873-884. <https://doi.org/10.3958/059.045.0404>

Cadungog JN, Khatemi BE, Hernandez AC, Kutty Everett GF. 2015. Complete Genome Sequence of *Bacillus megaterium* Myophage Moonbeam. *Genome Announc.* 2015 Jan 15;3(1):e01428-14. doi: 10.1128/genomeA.01428-14.

Carnero-Avilés L, Cerna-Chavez E, Ochoa-Fuentes YM. 2021. Análisis morfométrico de los biotipos A, B y Q de *Bemisia tabaci* del estado de Sinaloa, México. *Ecosistemas y Recursos Agropecuarios* 8(3): e22753

CESAVEM (Comité Estatal de Sanidad Vegetal del Estado de México). 2010. Campaña manejo fitosanitario del aguacate: Manejo integrado de los barrenadores del hueso y de ramas. SAGARPA-SENASICA, Folleto técnico. 8 p.

CESAVEG (Comité Estatal de Sanidad Vegetal de Guanajuato). 2008. Campaña de Manejo Fitosanitario del Aguacatero. SAGARPA-SENASICA. Folleto técnico. 12 p.

CESAVESON (Comité Estatal de Sanidad Vegetal de Sonora). 2020. Mosquita Blanca. Junta Local de Sanidad Vegetal del Valle del Yaqui. En línea http://jlsvyaqui.org.mx/?page_id=25 Fecha de consulta 11 de abril de 2020.

Chanbusarakum L, Ullman D. 2008. Characterization of bacterial symbionts in *Frankliniella occidentalis* (Pergande), Western flower thrips. *Journal of Invertebrate Pathology*, 99: 318-325.

Coria VM. 2009. Tecnología para la producción de aguacate. 2ª ed. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales y Agrícolas. Michoacán. México. 222 p.

Cruz LDF, Caamal C I, Pat F VG, Reza SJ. 2022. Competitividad de las exportaciones de aguacate Hass de México en el mercado mundial. *Revista mexicana de ciencias agrícolas*. 10.29312/remexca.v13i2.2885

Cuellar ME, Morales MJ. 2006. La mosca blanca *Bemisia tabaci* (Gennadius) como plaga y vectora de virus en frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.). *Revista Colombiana de Entomología*, 32(1): 1-9.

De Barro PJ, Liu SS, Boykin LM, Dinsdale AB. 2011. *Bemisia tabaci*: a statement of species status. *Annu Rev Entomol* 56: 1-19

De Moraes LA, Muller C, Bueno RCOdF et al. 2018. Distribution and phylogenetics of whiteflies and their endosymbiont relationships after the Mediterranean species invasion in Brazil. *Sci Rep* 8:14589 <https://doi.org/10.1038/s41598-018-32913-1>

De Vries E, Van der wulf AWG, Jacobs G, Breeuwer JAJ. 2008. Onion thrips, *Thrips tabaci*, have gut bacteria that are closely related to the symbionts of the western flower thrips, *Frankliniella occidentalis*. *Journal of Insect Science*, 8(1): 1-11.

Díaz CR. 2021. El mercado mundial del aguacate: 60 años del liderazgo de México y su impacto en la próxima década. *The Anahuac Journal*, 21(2): 12-49. <https://doi.org/10.36105/theanahuacjour.2021v21n2.01>

Dillon, RJ, Dillon, VM. 2004. The Gut Bacteria of Insects: Nonpathogenic Interactions. *Annual Review of Entomology*, 49:71–92.

Douglas AE. 2009. The microbial dimension in insect nutritional ecology. *Functional Ecology*, 23: 38-47.

Edgar RC. 2010. Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST. *Bioinformatics* 26(1):2460–2461. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btq461>

El Economista. 2018. México principal productor de aguacate. En línea <https://www.eleconomista.com.mx/empresas/Mexico-principal-productor-de-aguacate-20180131-0111.html> Fecha de consulta 03 de junio de 2019.

Elfekih S, Etter P, Tay WT, Fumagalli M., Gordon K, Johnson E, De Barro P. 2018. Genome-wide analyses of the *Bemisia tabaci* species complex reveal contrasting patterns of admixture and complex demographic histories. PloS ONE 13: e0190555

Everett KDE, Thao M, Horn M, Dyszynski GE, Baumann P. 2005. Novel Chlamydiae in whiteflies and scale insects: endosymbionts '*Candidatus Fritschea bemisiae*' strain Falk and '*Candidatus Fritschea eriococci*' strain Elm. Int J Syst Evol Microbiol 55:1581-1587. 10.1099/ijs.0.63454-0

FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations). 2021. FAO'S Statistical Database En línea: <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC> Fecha de consulta 30 de mayo de 2019.

Folmer O, Black M, Hoeh W, Lutz R, Vrijenhoek R. 1994. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. Mol Mar Biol Biotechnol 3:294-299

Ghanim M, Kontsedalov S. 2009. Susceptibility to insecticides in the Q biotype of *Bemisia tabaci* is correlated with bacterial symbiont densities. Pest Manag Sci 65:939-942.

Ghosh S, Ghanim M. 2021. Factors Determining Transmission of Persistent Viruses by *Bemisia tabaci* and Emergence of New Virus-Vector Relationships. Viruses 13(9):1808. doi: 10.3390/v13091808.

Goldarazena, A. s.f. Contribución al conocimiento de la fauna del Orden Thysanoptera (Clase insecta, Orden Thysanoptera) en Euskal Herria. Instituto Vasco de Investigación y Desarrollo Agrario. Neiker. Disponible en: http://www.ingurumena.ejgv.euskadi.net/contenidos/informe_estudio/thysanoptera/es_doc/adjuntos/thrips.pdf Fecha de consulta 03 de junio de 2019.

González HH, Johansen NRM, Mojica GA, Valle de la Paz AR, Castañeda GEL, Ávila QG, Sosa TCM. 2007. Trips asociados con el aguacate en México, pp: 146-153. En: Téliz D. y Mora A. El Aguacate y su Manejo Integrado. Ed. Mundi Prensa. 2a ed. México, D.F.

Haq IU, Chaudhry WN, Akhtar MN, Andleeb S, Qadri I. 2012. Bacteriophages and their implications on future biotechnology: a review. Virology Journal, 9:9.

Häusler T. 2006. Viruses vs. Superbugs: A Solution to the Antibiotics Crisis? London: Macmillan.

Holguín RJ, Hernández LG, Latisnere H. 2010. Identification and geographical distribution of *Bemisia tabaci* Gennadius and its relationship with begomovirales diseases in tomato (*Solanum lycopersicum* L.) in the Baja California Peninsula, Mexico. *Rev Mex Fitopatol* 28: 58-60.

Huse SM, Dethlefsen L, Huber JA, Welch DM, Relman DA Sogin ML. 2008. Exploring microbial diversity and taxonomy using SSU rRNA hypervariable tag sequencing. *PLoS Genetics* 4 e1000255

ICA (Instituto Colombiano Agropecuario). 2012. Manejo fitosanitario del cultivo del aguacate Hass (*Persea americana* Mill). Medidas para la temporada invernal. Línea agrícola. 72 p.

Inal JM. 2003. Phage therapy: a reappraisal of bacteriophages as antibiotics. *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis*, 51(4): 237–244.

Itoh H, Tago K, Hayatsu M, Kikuchi Y. 2018. Detoxifying symbiosis: Microbe-mediated detoxification of phytotoxins and pesticides in insects. *Nat.Prod Rep* 35: 434-454.

Jing X, Wong A, Chaston JM, Colvin J, McKenzie C, Douglas AE. 2013. The bacterial communities in plant phloem-sap-feeding insects. *Mol Ecol* 23:1433-1444.

Johansen, NRM, Mojica-Guzmán A, Ascensión-Betanzos G. 1999. Introducción al conocimiento de los insectos tisanópteros mexicanos en el aguacatero (*Persea americana* Miller). *Revista Chapingo, serie Horticultura*, 5: 279-285.

Klumpp J, Lavigne R, Loessner MJ, Ackermann HW. 2010. The SPO1-related bacteriophages. *Arch Virol*. 2010 Oct;155(10):1547-61. doi: 10.1007/s00705-010-0783-0.

Klumpp J, Dorscht J, Lurz R, Biemann R, Wieland M, Zimmer M, Calendar R, Loessner MJ. 2008. The terminally redundant, nonpermuted genome of *Listeria* bacteriophage A511: a model for the SPO1-like myoviruses of gram-positive bacteria. *J Bacteriol*. 190(17):5753-65. doi: 10.1128/JB.00461-08.

Krasowska A, Biegalska A, Augustyniak D, Łoś M, Richert M, Łukaszewicz M. 2015. Isolation and characterization of phages infecting *Bacillus subtilis*. *BioMed Res Int Hindawi*. 2015:e179597.

Kumar S, Stecher G, Li M, Knyaz C, Tamura K. 2018. MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across computing platforms. *Mol Biol Evol* 35:1547-1549

Lacasa PA, Lloréns CJM. 1996. Trips y su control biológico. Vol. I. Ed. Pisa Ediciones. Alicante. 218 p.

Li H, Jiang Z, Zhou J, Liu X, Zhang Y, Chu D. 2023. Ecological Factors Associated with the Distribution of *Bemisia tabaci* Cryptic Species and Their Facultative Endosymbionts. *Insects* 14(3): 252. <https://doi.org/10.3390/insects14030252>

Łobočka M, Hejnowicz MS, Dąbrowski K, Gozdek A, Kosakowski J, Witkowska M, Ulatowska MI, Weber-Dąbrowska B, Kwiatek M, Parasion S, Gawor J, Kosowska H, Głowacka A. 2012. Genomics of staphylococcal Twort-like phages--potential therapeutics of the post-antibiotic era. *Adv Virus Res.* 83:143-216. doi: 10.1016/B978-0-12-394438-2.00005-0.

Luan JB, Chen W, Hasegawa DK, Simmons AM, Wintermantel WM, Ling KS, Fei Z, Liu SS, Douglas AE. 2015. Metabolic coevolution in the bacterial symbiosis of whiteflies and related plant sap-feeding insects. *Genome Biol Evol* 7:2635-2647.

Mariño YA, Rodrigues JCV, Bayman P. 2017. *Wolbachia* affects reproduction and population dynamics of the coffee Berry borer (*Hypothenemus hampei*): implications for biological control. *Insects* 8(1): 8. doi: 10.3390/insects8010008

Martin M. 2011. Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads. *EMBnet.journal*, 17(1), 10– 12. <https://doi.org/10.14806/ej.17.1.200>

Marubayashi JM, Kliot A, Yuki VA, Rezende JAM, Krause-Sakate R, Pavan MA, Ghanim M. 2014. Diversity and Localization of Bacterial Endosymbionts from Whitefly Species Collected in Brazil. *PLoS ONE* 9(9): e108363. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0108363>

Mikonranta L, Buckling A, Jalasvuori M, Raymond B. 2019. Targeting antibiotic resistant bacteria with phage reduces bacterial density in an insect host. *Biology letters*, 15: 20180895 <http://dx.doi.org/10.1098/rsbl.2018.0895>

Mound LA, Marullo R. 1996. The Thrips of Central and South America: An Introduction. *Memoirs on Entomology International*, 6:1-488.

- Mound, LA, Teulon DAJ. 1995.** Thysanoptera as phytophagous opportunist. In: Parker, B. L., Skinner, M. y Lewis (Eds.). Thrips biology and management. Plenum, New York, pp: 3-19.
- Mugerwa H, Rey MEC, Alicai T, Ateka E, Atuncha H, Ndunguru J, Sseruwagi P. 2012.** Genetic diversity and geographic distribution of *Bemisia tabaci* (Gennadius) (Hemiptera: Aleyrodidae) genotypes associated with cassava in East Africa. *Ecol Evol* 2:2749-2762
- Mugerwa H, Seal S, Wang HL, Patel M, Kabaalu R, Omongo CA, Alicai T, Tairo F, Ndunguru J, Sseruwagi P, Colvin J. 2018.** African ancestry of New World *Bemisia tabaci*-whitefly species. *Sci Rep* 8: 2734. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-20956-3>
- Okubo S, Yanagida T, Fujita DJ, Olsson-Wilhelm BM. 1972.** The genetics of bacteriophage SPO1. *Biken.* 15(2):81-97.
- Pan PH, Chu D, Liu MB, Xie W, Wang LS, Wu JQ, Xu YB, Zhang JY. 2013.** Relative Amount of Symbionts in Insect Hosts Changes with Host-Plant Adaptation and Insecticide Resistance. *Environ Entomol* 42(1): 74-78 <https://doi.org/10.1603/EN12114>
- Parker ML, Eiserling FA. 1983.** Bacteriophage SPO1 structure and morphogenesis. III. SPO1 proteins and synthesis. *J Virol.* 1983 Apr;46(1):260-9. doi: 10.1128/JVI.46.1.260-269.
- Perkus ME, Shub DA. 1985.** Mapping the genes in the terminal redundancy of bacteriophage SPO1 with restriction endonucleases. *J Virol.* 56(1):40-8. doi: 10.1128/JVI.56.1.40-48.1985.
- Perring TM, Stansly PA, Liu TX, Smith HA, Andreason SA. 2018.** Whiteflies: Biology, ecology, and management. In: Wakil W, Brust GE, Perring TM (Eds) Sustainable Management of Arthropod Pests of Tomato, 1st ed. Academic Press: Cambridge, MA, USA, pp. 73-110.
- Quast C, Pruesse E, Yilmaz P, Gerken J, Schweer T, Yarza P, Glöckner FO. 2013.** The SILVA ribosomal RNA gene database project: Improved data processing and web-based tools. *Nucleic Acids Res* 41: 590-596. <https://doi.org/10.1093/nar/gks1219R>
- Rabag A. 2013.** Genetic variability of the whitefly *Bemisia tabaci* and its secondary endosymbionts in the Arabian Peninsula. King Abdullah University of Science and Technology Thuwal, Kingdom of Saudi Arabia
- Rao Q, Rollat-Farnier PA, Zhu DT, Santos-García D, Silva FJ, Moya A, Latorre A, Klein CC, Vavre F, Sagot MF et al. 2015.** Genome reduction and potential metabolic complementation of

the dual endosymbionts in the whitefly *Bemisia tabaci*. BMC Genom 16:226 DOI 10.1186/s12864-015-1379-6

Sambrook J, Russell D. 2001. Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3rd edn. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Santos-Garcia D, Juravel K, Freilich S, Zchori-Fein E, Latorre A, Moya A, Morin S, Silva FJ. 2018. To B or not to B: Comparative genomics suggests *Arsenophonus* as a source of B vitamins in whiteflies. Front Microbiol 9:2254.

Scolari F, Casiraghi M, Bonizzoni, M. 2019. *Aedes* spp. and Their Microbiota: A Review. Front Microbiol 10: 2036. doi: 10.3389/fmicb.2019.02036

Sela G. 2018. La mosca blanca. Agricultura, plagas y enfermedades. Croipaia. En línea <https://croipaia.com/es/blog/mosca-blanca/> Fecha de consulta 08 de abril de 2020.

SENASICA (Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria). 2019. Plagas Reglamentadas del Aguacatero. Disponible en <https://www.gob.mx/senasica/documentos/plagas-reglamentadas-del-aguacatero-110847> Fecha de consulta 02 de junio de 2019.

Shah MMR, Liu TX. 2013. Feeding Experience of *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae) Affects Their Performance on Different Host Plants. Plos One 8(10): e77368. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0077368>

Shah SHJ, Malik AH, Zhang B, Bao Y, Qazi J. 2020. Metagenomic analysis of relative abundance and diversity of bacterial microbiota in *Bemisia tabaci* infesting cotton crop in Pakistan. Infection, Genetics and Evolution. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2020.104381>

Shatters RG, Powell C, Boykin LM, Liansheng H, McKenzie CL. 2009. Improved DNA barcoding method for *Bemisia tabaci* and related Aleyrodidae: development of universal and *Bemisia tabaci* biotype specific mitochondrial cytochrome c oxidase I polymerase chain reaction primers. J Econ Entomol 102: 750-758

Shi P, Wang L, Liu Y, An X, Chen X, Ahmed MZ, Qiu BL, Sang W. 2018. Infection dynamics of endosymbionts reveal three novel localization patterns of Rickettsia during the development of whitefly *Bemisia tabaci*. Microb Ecol 94(11). doi: 10.1093/femsec/fiy165

SIAP (Servicio Nacional de Información Agroalimentaria y pesquera). 2023. Anuario Estadístico de la Producción Agrícola del año 2023. Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural (SADER). Gobierno de México. En línea: <https://nube.siap.gob.mx/cierreagricola/> Fecha de consulta 30 de mayo de 2019.

Sloan DB, Moran NA. 2012. Endosymbiotic bacteria as a source of carotenoids in whiteflies. *Biol Lett*, 8:986-989.

Su MM, Guo L, Tao YL, Zhang YJ, Wan FH, Chu D. 2016. Effect of host plant factor on the bacterial communities associated with two whitefly sibling species. *Plos One* 11: e0152183. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0152183>

Sulakvelidze A, Alavidze Z, Morris JG Jr. 2001. Bacteriophage therapy. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*, 45(3): 649–659.

Syromyatnikov MY, Isuwa MM, Savinkova OV, Derevshchikova MI, Popov VN. 2020. The Effect of Pesticides on the Microbiome of Animals. *Agriculture*. 10(3): 79. <https://doi.org/10.3390/agriculture10030079>

Téliz, D. y Mora A. 2007. El aguacate y su manejo integrado. 2a Ed. Ediciones Mundi-Prensa. México. 321 p.

Thao ML, Baumann L, Hess JM, Falk BW, Ng JCK, Gullan P, Baumann P. 2003. Phylogenetic evidence for two new insect associated Chlamydia of the family Simkaniaceae. *Curr Microbiol* 47:46-50

Thao ML, Baumann P. 2004. Evolutionary relationships of primary prokaryotic endosymbionts of whiteflies and their hosts. *Appl Environ Microbiol* 70:3401-3406.

Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ. 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res* 22(22): 4673-4680. doi: 10.1093/nar/22.22.4673

Torres-Trujillo PB, Alvarado-Gomez OG, Estrada-Hernández MG, Ojeda-Zacarias MC, Avila-Rodríguez V, Nava-Camberos U, González-Garza R. 2017. Identification of *Bemisia tabaci* L.

Biotypes and Their Associated Begomovirus in Coahuila and Durango, Mexico. *Southwest Entomol* 42(2): 523-530. <https://doi.org/10.3958/059.042.0221>

Wang HL, Lei T, Xia WQ et al. 2019. Insight into the microbial world of *Bemisia tabaci* cryptic species complex and its relationships with its host. *Sci Rep* 9: 6568. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-42793-8>

Wilson AC, Ashton PD, Calevro F, Charles H, Colella S, Febvay G, Jander G, Kushlan PF, Macdonald SJ, Schwartz JF, Thomas GH, Douglas AE. 2010. Genomic insight into the amino acid relations of the pea aphid, *Acyrtosiphon pisum*, with its symbiotic bacterium *Buchnera aphidicola*. *Insect Mol Biol* 19:249-258. doi: 10.1111/j.1365-2583.2009.00942.x

Yao FL, Zheng Y, Huang XY et al. 2017. Dynamics of *Bemisia tabaci* biotypes and insecticide resistance in Fujian province in China during 2005–2014. *Sci Rep* 7:40803 <https://doi.org/10.1038/srep40803>

Zchori-Fein E, Brown JK. 2002. Diversity of Prokaryotes Associated with *Bemisia tabaci* (Gennadius) (Hemiptera: Aleyrodidae). *Ann Entomol Soc Am* 95:711-718

Zchori-Fein E, Bourtzis K. (eds). 2011. Manipulative tenants - Bacteria associated with arthropods. CRC Press, Boca Raton, FL, 268 pp