

MICROBIOMA Y POLIFAGIA EN FITÓFAGOS: CARACTERIZACIÓN DE LOS GENOMAS DE LA COMUNIDAD MICROBIANA ASOCIADA A LARVAS DE *ANASTREPHA OBLIQUA* MACQUART (DIPTERA: TEPHRITIDAE: TEPHRITINAE).

Valentina Cárdenas Hernández

Universidad del Valle, Apartado Aéreo 25360, Cali, Colombia.
correo electrónico: valentina.cardenas.hernandez@correounivalle.edu.co

Nelson Toro Perea

Universidad del Valle, Apartado Aéreo 25360, Cali, Colombia.
correo electrónico: nelson.toro@correounivalle.edu.co

Sandra Marcela Velasco Cuervo

Universidad del Valle, Apartado Aéreo 25360, Cali, Colombia.
correo electrónico: sandra.velasco@correounivalle.edu.co

RESUMEN

La interacción entre insectos fitófagos y microorganismos es una estrategia que permite a los primeros aprovechar el tejido vegetal como recurso alimenticio, a pesar de ser éste nutricionalmente deficiente y abundante en metabolitos tóxicos. La mosca de la fruta *Anastrepha obliqua* es una especie polífaga que se alimenta, en su instar larval, de los frutos de plantas de diferentes familias. En Colombia, algunos de sus hospederos son las especies *Spondias purpurea* (Ciruela), *Averrhoa carambola* (Carambolo) y *Mangifera indica* (Mango). En este trabajo se empleó la secuenciación de metagenomas completos (WMS) para caracterizar y comparar la microbiota y el microbioma de las larvas de esta especie, cuando se alimentan de los frutos de ciruela, carambolo o mango. La composición de la microbiota y el microbioma mostró diferencias dependiendo de la planta hospedera infestada. De los grupos dominantes se logró reconstruir el genoma de *Acetobacter persici*, *Gluconobacter sphaericus*, *Tatumella ptyseos* y *Weissella confusa*, localizando genes asociados con metabolismo de aminoácidos y carbohidratos, importantes para el uso del recurso alimenticio. Nuestros resultados representan un punto de partida para entender el rol de los microorganismos en la fitofagia de *A. obliqua*, sus implicaciones evolutivas y posibles aplicaciones para el control de este insecto plaga.

Palabras clave: Anotación funcional, Diversidad microbiana, Insecto plaga, Metagenoma completo, Planta hospedera.

ABSTRACT

The interaction between phytophagous insects and microorganisms allows the former to take advantage of plant tissue as a food resource, despite being nutritionally deficient and abundant in toxic metabolites. The fruit fly *Anastrepha obliqua* is a polyphagous species that feeds, in its larval instar stage, on the fruits of plants of different families. In Colombia, some of its hosts are the species *Spondias purpurea* (Red mombin), *Averrhoa carambola* (Star fruit) and *Mangifera indica* (Mango). In this work, whole metagenome sequencing (WMS) was used to characterize and compare the microbiota and microbiomes of the larvae of this species when they fed on red mombin, star fruit or mango fruits. The compositions of the microbiota and the microbiomes showed differences depending on the host plant the larvae infested. Of the dominant microbial groups, *Acetobacter persici*, *Gluconobacter sphaericus*, *Tatumella ptyseos* and *Weissella confusa* had their genomes reconstructed by locating the genes associated with amino acid and carbohydrate metabolism that are important to the use of food resources. Our results represent a starting point for understanding the role of microorganisms in the phytophagy of *A. obliqua*, the evolutionary implications and possible applications for the control of this insect pest.

Key words: Functional annotation, microbial diversity, Pest insect, Whole metagenome, Host plant.

INTRODUCCIÓN

La interacción entre microorganismos e insectos fitófagos se ha estudiado en diferentes modelos (Chen *et al.*, 2016; Akami *et al.*, 2019; Qin *et al.*, 2021; Shan *et al.*, 2021), determinando que los insectos proporcionan a los microorganismos diferentes nichos y, que a su vez, los microorganismos proveen a los insectos ventajas de tipo nutricional y no nutricional, como síntesis de aminoácidos, esteroides, vitaminas y metabolitos secundarios, incremento en la eficacia biológica, protección contra enemigos naturales y resistencia a diferentes ambientes y condiciones (Douglas, 2015). Los grupos de microorganismos que han establecido relaciones con insectos fitófagos incluyen arqueas, bacterias, hongos, protozoos y complejos moleculares como los virus (Gurung *et al.*, 2019). Esta interacción puede resultar ventajosa para el fitófago, puesto que, el tejido vegetal proporciona, en baja cantidad, elementos esenciales como el nitrógeno y el fósforo (Fagan *et al.*, 2002), además de ser una dieta potencialmente tóxica para el insecto (Sánchez-Sánchez & Morquecho-Contreras, 2017). Los microorganismos asociados representan un mecanismo importante para suplir las deficiencias nutricionales de la dieta (Douglas, 2009) y a su vez como vía de desintoxicación de los metabolismos de origen vegetal (Hammer & Bowers, 2015).

Para caracterizar las comunidades microbianas asociadas a los insectos fitófagos, es necesario realizar una descripción a nivel de microbiota y microbioma. La microbiota hace referencia a todos los microorganismos que se encuentran asociados con un huésped y el microbioma es el conjunto de genomas de la microbiota (Zapata & Quagliarello, 2015). Para el estudio de la microbiota y el microbioma se han aplicado diferentes aproximaciones, una de estas es la metagenómica, que permite describir los microorganismos que constituyen una comunidad y sus genes (Knight *et al.*, 2018), lo cual es muy útil para realizar inferencias funcionales sobre el rol de los microorganismos dentro de la interacción insecto-microorganismos (Krishnan *et al.*, 2014). Con la metagenómica

desarrollada a través de la metodología denominada “Secuenciación de metagenoma completo, (Whole Metagenome Sequencing - WMS)” o “Shotgun sequencing”, se obtiene la secuenciación no dirigida de todos los genomas microbianos presentes en una muestra (Jovel *et al.*, 2016; Quince *et al.*, 2017). Los estudios metagenómicos en insectos fitófagos son relevantes desde el punto de vista evolutivo, ya que los microorganismos asociados podrían influir en procesos de diversificación de este gremio (Moran *et al.*, 2008; Sudakaran *et al.*, 2015). Además, el conocimiento acerca de la diversidad de microorganismos y sus funciones es útil en la agricultura, brindando herramientas en estrategias de control como el manejo integrado de plagas (Douglas, 2015; Van den Bosch & Welte, 2017) ya que, diferentes grupos de fitófagos representan pérdidas económicas por el daño generado en cultivos.

Dentro de los insectos fitófagos que se consideran plagas de importancia económica se encuentran algunas especies de dípteros de la familia Tephritidae (Soloneski & Larramendy, 2012). Los miembros de esta familia, denominados moscas de la fruta, se alimentan de los frutos de diferentes especies de plantas, lo cual ocasiona daño en los cultivos (Virgilio *et al.*, 2014). Dentro de esta familia, los géneros que se consideran plagas más relevantes son *Bactrocera*, *Ceratitis*, *Rhagoletis*, *Dacus* y *Anastrepha* (Sally *et al.*, 2016). Si bien, el 98% de los insectos fitófagos son especialistas, debido a su estrecha relación con una planta hospedera o algunas relacionadas, dentro de la familia Tephritidae, se han reportado diferentes casos de grupos que se alimentan de plantas de diferentes familias (Clarke, 2017), consideradas especies polífagas (Bernays & Chapman, 1994). Este comportamiento alimenticio se ha observado en grupos como *Bactrocera* (Clarke, 2017) y *Anastrepha* (Boykin *et al.*, 2006).

La especie *Anastrepha obliqua* (Macquart), conocida como la mosca de la fruta de las Indias Occidentales, es una especie polífaga de importancia cuarentenaria en diferentes países del neotrópico (Fu *et al.*, 2014). En el suroccidente colombiano se ha reportado infestando plantas

pertenecientes a 24 familias (Carrejo & González, 1994). Para *A. obliqua* se han registrado diversos microorganismos asociados, principalmente bacterias pertenecientes a los géneros, *Escherichia*, *Enterobacter*, *Raoultella*, *Klebsiella* y *Citrobacter* (Noman *et al.*, 2020). Para larvas y adultos se ha identificado mediante meta-códigos de barras (Gallo-Franco & Toro-Perea, 2020; Ventura *et al.*, 2018) que la comunidad bacteriana se encuentra conformada, principalmente, por organismos del Phylum proteobacteria.

La caracterización de los microorganismos asociados a la especie *A. obliqua* se ha enfocado principalmente en las comunidades bacterianas, dejando de lado grupos como protozoos, hongos, arqueas y virus. Además, las descripciones disponibles hasta el momento abarcan la diversidad a nivel de individuo, pero no a nivel genómico. Con el fin de abordar las comunidades de microorganismos con un enfoque más completo, y teniendo en cuenta que el instar larval es la etapa del ciclo de vida donde los individuos se alimentan activamente de los frutos (Perez-Staples *et al.*, 2019) en nuestro estudio se comparó la microbiota y el microbioma de larvas de *A. obliqua* que infestan *Spondias purpurea*, *Mangifera indica* y *Averrhoa carambola*, empleando la secuenciación de metagenomas completos. Esta información contribuye en la comprensión del rol de los microorganismos en la capacidad de *A. obliqua* de aprovechar diferentes plantas hospederas, conocimiento útil para enfoques aplicados y evolutivos.

MÉTODOS

Colecta de muestras.

Las larvas de *Anastrepha obliqua* empleadas en este estudio fueron obtenidas a partir de un muestreo de frutos realizado en noviembre del 2020. Estos frutos se colectaron en Chagres (03°07'27"N, 76°36'20"W) y Robles (03°07'45.8"N, 76°35'44.9"W), localidades ubicadas en la zona sur del departamento del Valle del Cauca. Los frutos colectados pertenecen a las plantas

hospederas *Spondias purpurea*, *Mangifera indica* y *Averrhoa carambola*. Para la colecta se seleccionaron frutos con signos de infestación y se tomaron directamente del árbol. Estos frutos fueron trasladados al laboratorio de pruebas biológicas del Departamento de Biología de la Universidad del Valle en Cali, Colombia. Durante el traslado, los frutos permanecieron a 4°C. Una vez en el laboratorio los frutos fueron abiertos y se buscaron las larvas de tercer instar, que se caracterizan por presentar un esqueleto cefalofaríngeo completamente esclerotizado (Castañeda *et al.*, 2015). Estas larvas fueron almacenadas según el hospedero, el árbol y la fecha de colecta y almacenadas a -20 °C en etanol.

Extracción de ADN, secuenciación del gen COI e identificación molecular

De las larvas de tercer instar colectadas, se seleccionaron un total de 90 individuos, 30 provenientes de *Spondias purpurea*, 30 de *Mangifera indica* y 30 de *Averrhoa carambola*. A estas muestras se les realizó la extracción de ADN usando el kit comercial DNeasy® Blood & Tissue (QIAGEN, Hilden, Alemania), siguiendo el protocolo para insectos recomendado por el proveedor. Para la cuantificación del ADN se utilizó el espectrofotómetro NanoDrop™ 2000 (Thermo scientific). El ADN extraído y cuantificado fue almacenado a -20°C .

Para realizar la identificación molecular de las larvas se llevó a cabo la amplificación y secuenciación del gen que codifica para la subunidad I de la enzima citocromo c oxidasa (COI). La amplificación se realizó empleando los cebadores universales LCO1490: 5'-GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG-3' y HCO2198: 5'-TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA-3 (Folmer *et al.*, 1994), que amplifican una región de aproximadamente 700 Pb, de acuerdo al protocolo reportado por Aguirre-Ramirez *et al.*, (2017). Los amplificados obtenidos se evaluaron en geles de agarosa al 1.5% y posteriormente fueron purificados y secuenciados utilizando los servicios de la empresa PSOMAGEN (MD, EE. UU). Las secuencias obtenidas para el gen COI se editaron usando el algoritmo Sequencher v 5.4.6 (Gene

codes corporation, MI, EE. UU). Se obtuvo para cada individuo una secuencia consenso con longitud final de 658 pb, a partir de esta secuencia se realizó un BLAST contra el NCBI logrando establecer que 88 de las 90 muestras pertenecían a la especie *Anastrepha obliqua*. De estos 88 individuos que dieron un resultado positivo en la identificación molecular, 30 fueron obtenidos de la planta *Spondias purpurea*, 29 de *Mangifera indica* y 29 de *Averrhoa carambola*. Las dos larvas que dieron una identificación negativa fueron excluidas del diseño experimental.

Preparación de réplicas y secuenciación de metagenomas.

El diseño experimental de este trabajo consistió en 3 réplicas biológicas por planta hospedera, cada una de las réplicas representada por una agrupación de ADN de los individuos identificados como *A. obliqua*. La distribución de los individuos en las agrupaciones se realizó de la siguiente manera: Para *S. purpurea* cada una de las tres réplicas contenía ADN de 10 individuos. Por otra parte, para *M. indica* y *A. carambola* dos de las réplicas se conformaron con el ADN de 10 individuos y una tercera con el ADN de 9 individuos. Cada réplica contenía 1.000 ng totales de ADN, garantizando que los individuos estuvieran igualmente representados con el fin de disminuir el efecto de la variación individual de los microorganismos asociados sobre los resultados (Dada *et al.*, 2018). Una vez elaboradas las 9 réplicas biológicas del experimento se cuantificaron, nuevamente, haciendo uso del NanoDrop™ 2.000 (Thermo Fisher) para evaluar la cantidad de ADN total en cada una. Las agrupaciones mencionadas anteriormente se enviaron al proveedor de servicio, MACROGEN (Seúl, Corea del sur), dónde fueron secuenciados mediante el método “Shotgun sequencing”. Para esto, se construyeron librerías de 350 Pb y posteriormente se realizó la secuenciación “paired-end” de fragmentos de 150 Pb, empleando el sistema NovaSeq de la plataforma Illumina.

Análisis bioinformático.

Las secuencias obtenidas de los microorganismos asociados a las larvas de *A. obliqua* se analizaron mediante el pipeline MetaWRAP (Uritskiy *et al.*, 2018). El análisis metagenómico realizado con este pipeline se divide en los siguientes módulos: “READ_QC”, “KRAKEN”, “ASSEMBLY”, “BINNING”, “BIN_REFINEMENT”, “BLOBOLOGY”, “QUANT_BINS”, “REASSEMBLE_BINS”, “CLASSIFY_BINS” y “ANNOTATE_BINS”. Cada uno de estos módulos se enfoca en uno de los pasos del análisis de secuencias metagenómicas (Uritskiy *et al.*, 2018).

El módulo READ_QC se empleó para procesar e incrementar la calidad de las lecturas crudas, obteniendo lecturas limpias con las cuales se trabajó. Para la eliminación de las lecturas del hospedero se utilizó el genoma de *A. obliqua* proporcionado por el investigador Scott Geib del USDA-ARS (HI, EE. UU). Con el módulo KRAKEN se asignaron las lecturas limpias a un grupo taxonómico. El módulo ASSEMBLY se empleó para construir contigs a partir de las lecturas limpias. En el módulo BINNING se utilizaron diferentes softwares metagenómicos para formar contenedores iniciales, que contenían los ensamblajes genómicos de un mismo microorganismo, es decir una reconstrucción del genoma de una especie microbiana en particular (Alneberg *et al.*, 2018). Con los módulos BIN_REFINEMENT y REASSEMBLE_BINS se unificaron los contenedores en genomas finales de mejor calidad, basado en los parámetros de completación y contaminación. Ambos parámetros se fundamentan en los genes de copia única (Single copy genes, SCG), es decir aquellos genes que presentan copia única en el genoma y que son altamente conservados entre especies (Creevey *et al.*, 2011). La completación estima si se encuentran todos los SCG esperados y la contaminación indica si hay más de una copia de un SCG (Chen *et al.*, 2020). El módulo BLOBOLOGY permitió identificar cuantos contigs constituían cada uno de los genomas reconstruidos. Con el módulo QUANT_BINS se estimó en cada una de las muestras la abundancia de las lecturas que constituían cada uno de los genomas reconstruidos. Mediante los

módulos CLASSIFY_BINS y ANNOTATE_BINS se realizó la identificación taxonómica y la anotación funcional respectivamente, de cada uno de los genomas reconstruidos (Uritskiy *et al.*, 2018).

Por otro lado, se tomaron los archivos de anotación funcional resultantes del módulo ANNOTATE_BINS, dónde se encontraba la información asociada a las secuencias codificantes de los genomas reconstruidos, y se contrastaron contra las siguientes bases de datos: la enciclopedia de genes y genomas de Kioto (KEGG) y la base de agrupaciones de grupos ortólogos de proteínas (COG). Para esto se emplearon los softwares MinPath (Ye & Doak, 2009) y webMGA (Wu *et al.*, 2011), con el fin de inferir rutas metabólicas a partir de las secuencias codificantes observadas y establecer un vínculo entre las comunidades microbianas de *A. obliqua* con posibles funciones relacionadas con el aprovechamiento del recurso alimenticio.

Análisis estadístico.

Para realizar los análisis estadísticos correspondientes a la diversidad alfa y beta, la tabla de frecuencia de OTUs y los metadatos fueron importados al software R v.4.1.2, dónde se trabajó con el paquete Phyloseq (McMurdie & Holmes, 2013). Las OTUs (unidades taxonómicas operativas) son un grupo de secuencias estrechamente relacionadas, con una similitud igual o superior al 97% (Knight *et al.*, 2018), esta tabla de OTUs se obtuvo de los análisis realizados con el módulo KRAKEN (Uritskiy *et al.*, 2018). Mediante la función “estimate_richness” se estimaron los índices de riqueza, dominancia y uniformidad, para cada una de las réplicas. Además, con las funciones “distance” y “ordinate” se generó una matriz de similitud con el método Bray-Curtis y se visualizó mediante un PCoA. Por último, a través de una PERMANOVA, se evaluó si existían diferencias, en la composición de la microbiota, asociadas a la especie de planta que infesta la larva.

RESULTADOS

La secuenciación de alto rendimiento de las nueve réplicas generó 742.357.192 lecturas crudas y 28.618.045 lecturas procesadas (Apéndice A). Esta cantidad de secuencias representó un esfuerzo de muestreo suficiente para realizar una buena caracterización de los microorganismos asociados a las larvas analizadas, tal y como lo demostraron las curvas de rarefacción obtenidas de todas las réplicas (Fig. 1). Una evaluación inicial de las réplicas mostró que la réplica 2 de carambolo no se agrupaba con las otras réplicas del mismo fruto, y en su lugar, se agrupaba con las réplicas de mango. Sumado a esto, en esta réplica se contabilizaron entre 900.000 y 2.000.000 de lecturas menos, en comparación con las otras réplicas. Debido a que la librería de esta réplica presentó una cantidad baja de lecturas y a que no se agrupó con las otras réplicas de la misma planta hospedera, no se incluyó en los análisis posteriores (Apéndice B).

Caracterización de la microbiota de A. obliqua

Del total de secuencias de cada réplica se pudo asignar a un grupo taxonómico entre el 5.1 y el 17.3% de las lecturas procesadas. La asignación taxonómica mostró que la microbiota de *A. obliqua* está constituida principalmente por organismos procariotas de los Phyla Proteobacteria, Firmicutes y Bacteroidetes y organismos eucariotas del Phylum Ascomycota (Fig. 2). Para cada uno de estos Phyla, se identificaron los géneros más representativos (Fig. 3). Para el Phylum Proteobacteria se observó que los principales géneros fueron *Acetobacter*, *Gluconobacter*, *Komagataeibacter*, *Pseudomonas* y *Tatumella* (Fig. 3a). Dentro del Phylum Firmicutes los géneros más abundantes fueron *Clostridium*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Staphylococcus* y *Weissella* (Fig. 3b). Del Phylum Bacteroidetes, los géneros dominantes fueron *Chryseobacterium* y *Flavobacterium* (Fig. 3c). Y, para el Phylum Ascomycota los géneros más abundantes fueron *Candida*, *Pichia* y *Tetrapisispora* (Fig. 3d). Igualmente, pero en menor abundancia, se identificaron microorganismos del dominio Arquea, representados por los Phyla Crenarchaeota, Euryarchaeota y Thaumarchaeota (Fig. 4a). A su vez, para el Phylum Crenarchaeota los géneros más abundantes fueron *Acidianus* y *Sulfolobus*

(Fig. 4b). Del Phylum Euryarchaeota los géneros dominantes fueron *Methanobrevibacter*, *Methanocaldococcus*, *Methanosarcina* y *Natronorubrum* (Fig. 4c). Y, para el Phylum Thaumarchaeota, los géneros más abundantes fueron Candidatus *Nitrosocosmicus*, *Nitrosopumilus* y *Nitrososphaera* (Fig. 4d).

Los índices de diversidad alfa mostraron que las larvas que infestan plantas de carambolo presentan una mayor riqueza, en términos de OTUS observadas (Tabla 1). En cuanto a la uniformidad, el índice de Shannon permitió identificar que la microbiota asociada a larvas de ciruela presenta una distribución más equitativa en términos de abundancia, en comparación a la microbiota de las larvas de carambolo y mango (Tabla 1). Respecto a la diversidad en términos de dominancia, el índice de Simpson evidenció que la microbiota de las larvas de *A. obliqua* está representada por diferentes especies con una abundancia similar (Tabla 1).

En relación con la diversidad beta, la comparación entre réplicas mostró que la microbiota de las larvas de *A. obliqua* presenta diferencias dependiendo de la planta hospedera que infesten las larvas. Esto se pudo observar en el análisis de componentes principales basado en la matriz de distancias de Bray-Curtis, donde se observan tres agrupamientos, los cuales corresponden a las larvas que infestan ciruela, mango y carambolo, respectivamente (Fig. 5). Adicional a esto, el PERMANOVA mostró que existen diferencias significativas en la microbiota de las larvas que infestan estas tres plantas hospederas ($F=53,915$ $P=0,004$).

Caracterización del microbioma de A. obliqua

El ensamblaje de las lecturas generó 67.434 contigs con una longitud máxima de 347.367 Pb. Los genomas que se pudieron reconstruir a partir de este ensamblaje correspondieron a las especies *Acetobacter persici*, *Gluconobacter sphaericus*, *Tatumella ptyseos* y *Weissella confusa*. Además, se reconstruyeron otros tres genomas que fueron asignados a los siguientes taxa: A la clase Gammaproteobacteria, a la familia Acetobacteraceae y al Género *Leuconostoc*. Los genomas

reconstruidos presentaron un nivel de completación o cobertura que varió entre el 54,02 y el 96,91% y una contaminación inferior al 5% (Tabla 2).

Los siete genomas reconstruidos presentaron una abundancia diferencial en cada una de las réplicas, es decir que la cantidad de lecturas con las que se formaron estos genomas fluctuó en cada réplica, por ejemplo, el genoma de *Gluconobacter sphaericus* se encontró representado en todas las réplicas, independientemente de la planta que infesta la larva (Fig. 6). Los genomas de las especies *Acetobacter persici* y *Tatumella ptyseos* estuvieron representados en las réplicas que corresponden a las larvas que infestan frutos de mango y carambolo (Fig. 6). El genoma de *Weissella confusa* fue exclusivo de una de las réplicas de las larvas que infestan mango (Fig. 6). Respecto a los genomas que no se lograron llevar hasta el nivel de especie, los correspondientes a la familia Acetobacteraceae y al género *Leuconostoc* se encontraron en todas las réplicas de mango y carambolo (Fig. 6). El genoma de la clase Gammaproteobacteria estuvo representado en todas las réplicas de mango y carambolo y en una réplica de ciruela (Fig. 6).

La anotación estructural y funcional de los genomas (Fig. 7, Apéndices C-E) permitió inferir posibles proteínas y rutas metabólicas bacterianas. En los genomas de las especies *Acetobacter persici*, *Gluconobacter sphaericus*, *Tatumella ptyseos* y *Weissella confusa* se logró identificar secuencias de genes asociadas a proteínas de diferentes grupos ortólogos (Fig. 8). Para las larvas de ciruela, mango y carambolo los genes microbianos asociados con el transporte y metabolismo de aminoácidos fueron los más prevalentes dentro del microbioma reconstruido (Fig. 6 y 8). En el genoma de *Gluconobacter sphaericus* se identificó que la categoría más prevalente eran los genes relacionados con biogénesis de membrana y pared celular (Fig. 8), estando este genoma presente en las réplicas de ciruela, mango y carambolo (Fig. 6). Los genes de *Acetobacter persici* asociados en la producción y conversión de energía y transporte y metabolismo de iones inorgánicos fueron la categoría más prevalente (Fig. 8). En el genoma de *Tatumella ptyseos* los genes relacionados

con el proceso de transcripción representaron la categoría más prevalente (Fig. 8). Encontrándose los genomas de *Acetobacter persici* y *Tatumella ptyseos* en larvas de mango y carambolo (Fig. 6). Por último, para *Weissella confusa* los genes asociados con transporte y metabolismo de carbohidratos fueron la categoría más prevalente (Fig. 8), siendo este genoma exclusivo de las larvas de mango (Fig. 6).

DISCUSIÓN

En este estudio caracterizamos y comparamos la microbiota y el microbioma de larvas de *A. obliqua* que infestan ciruela, mango y carambolo empleando la metodología WMS. Además, abordamos el posible efecto de la planta hospedera sobre la comunidad de microorganismos asociados y sus genomas.

Se encontró que las larvas de *A. obliqua* establecen vínculos con microorganismos procariotas y eucariotas independientemente de la planta hospedera infestada. Dentro de estos grupos de microorganismos fue posible evidenciar que los eucariotas tienen una mayor incidencia en las larvas que infestan ciruela, lo cual tiene un efecto sobre la diversidad beta de la microbiota de las larvas, presentando diferencias en su composición dependiendo de la planta hospedera que infestan. Adicional a la caracterización de la microbiota se reconstruyó el genoma de las especies bacterianas *Acetobacter persici*, *Gluconobacter sphaericus*, *Tatumella ptyseos* y *Weissella confusa*, logrando describir parte del microbioma asociado a las larvas de *A. obliqua*. La abundancia de las cuatro especies bacterianas ya mencionadas se encontró influenciada por la planta hospedera, además, esto también se reflejó en las secuencias de genes asociadas a proteínas, siendo algunos de los genomas reconstruidos exclusivos y otros compartidos entre las diferentes plantas hospederas. Estos resultados en conjunto permiten inferir que la microbiota y el microbioma de las larvas de *A.*

obliqua presenta variaciones según la planta hospedera empleada por la larva como recurso alimenticio.

La microbiota de las larvas de *A. obliqua* se encontró constituida por procariotas y eucariotas. Estudios previos basados en meta-códigos de barras han mostrado que la comunidad microbiana de *A. obliqua* se encuentra principalmente constituida por microorganismos procariotas del Phylum proteobacteria (Gallo-Franco & Toro-Perea, 2020; Ventura *et al.*, 2018). En cuanto a los grupos de arqueas, los reportes para individuos de la familia Tephritidae son escasos, se conoce que la especie *Methanococcus vanniellii* se encuentra en baja abundancia como parte de la microbiota intestinal de la mosca *Bactrocera carambolae* (Yong *et al.*, 2017). Respecto a los microorganismos eucariotas, la caracterización en Tephritidos es limitada, se han reportado organismos del Phylum Ascomycota constituyendo la microbiota intestinal de *Bactrocera tryoni* (Deutscher *et al.*, 2017). Los géneros bacterianos encontrados como *Acetobacter*, *Gluconobacter*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Pseudomonas*, *Staphylococcus*, *Tatumella* y *Weisella*; los géneros de arqueas como *Methanococcus* y los géneros fúngicos como *Candida* y *Pichia* han sido registrados estableciendo asociaciones con insectos de la familia Tephritidae (De Cock *et al.*, 2020; Malacrinò *et al.*, 2018; Raza *et al.*, 2020). Esto muestra una concordancia entre los grupos taxonómicos caracterizados en este trabajo y los reportados por diferentes autores para otros organismos de la familia Tephritidae y del género *Anastrepha*. Igualmente, los grupos bacterianos mostraron correspondencia entre lo descrito por meta-códigos de barras y WMS para individuos de la misma región, infestando ciruela, mango o carambolo (Gallo-Franco & Toro-Perea, 2020), lo que respalda las observaciones desde dos metodologías diferentes, secuenciando masivamente una región hipervariable y secuenciando fragmentos de todos los genomas de los microorganismos.

Enfocándonos en el componente eucariota de la microbiota, la mayor incidencia de estos grupos en las larvas que infestan ciruela fue consistente en las tres réplicas biológicas de esta planta hospedera. Este hecho es interesante, debido a la escasa caracterización de estos grupos y a que los resultados sugieren que podrían estar desempeñando un papel importante en las larvas que emplean la ciruela como recurso alimenticio. Diferentes autores han reportado que simbiontes similares a levaduras confieren ventajas a los insectos, dentro de las cuales se encuentran: facilitar la alimentación, protección ante patógenos y suministro de nutrientes esenciales como aminoácidos, proteínas, vitaminas y esteroides (Malassigné *et al.*, 2021). Es posible que el medio que representan los frutos sea un factor significativo que influye en la comunidad de levaduras asociadas con *A. obliqua*.

Continuando con la estructura de la microbiota, los índices de diversidad alfa obtenidos en este estudio son superiores a los reportados para *A. obliqua* mediante secuenciación de alto rendimiento del gen 16s (Gallo-Franco & Toro-Perea, 2020), también para los índices registrados de especies relacionadas como *Bactrocera tryoni*, *Bactrocera neohumeralis*, *Bactrocera jarvisi*, *Bactrocera cacuminata*, *Ceratitis capitata* y *Dirioxa pornia*, los cuales se estimaron mediante pirosecuenciación del gen 16s (Morrow *et al.*, 2015). Esto se atribuye a la efectividad de la secuenciación de genomas completos en comparación a otras aproximaciones como los meta-códigos de barras (Cattonaro *et al.*, 2018), lo que permite obtener mejores resultados en la caracterización taxonómica y funcional de las comunidades microbianas. Con el gen 16s solo se obtiene información de bacterias y archaeas (Jovel *et al.*, 2016), mientras que con información obtenida de todo genoma se incluyen otros grupos como hongos, protozoos y virus (Cattonaro *et al.*, 2018). Un ejemplo de las ventajas de esta técnica, es que permitió llegar hasta el nivel de especie y de genoma, lo que influye directamente en los índices de diversidad puesto que hay una

mayor resolución para discriminar las OTUs y esto se ve directamente reflejado en propiedades de la diversidad como la riqueza y la abundancia de la microbiota (Jovel *et al.*, 2016, Ranjan *et al.*, 2016).

Una vez caracterizada la comunidad de microorganismos de las larvas, planteamos que la composición de los frutos de cada planta hospedera podría estar dando las condiciones para entender las variaciones observadas en la microbiota de larvas de *A. obliqua*. Lo anterior se ve reflejado en el hecho de que los grupos de microorganismos procariotas tuvieron una mayor representación en las larvas que infestan mango y carambolo, mientras que, en ciruela, los microorganismos eucariotas se destacaron por su abundancia. Los frutos de las plantas hospederas representan para los insectos una fuente de microorganismos, en *Bactrocera tryoni* se ha observado que los frutos proveen bacterias de los géneros *Acetobacter*, *Gluconobacter*, *Leuconostoc* y *Tatumella* (Majumder *et al.*, 2019); consistente con lo encontrado en nuestro análisis. La composición de los frutos de ciruela, mango y carambolo es diferente en macronutrientes, el 19% de los frutos de ciruela corresponde a carbohidratos, siendo representativos monosacáridos como la glucosa y la fructosa, 0,7% del fruto representa proteína y 0,2% grasa (Kozioł & Macía, 1998). Para el mango, los carbohidratos constituyen el 13% del fruto, la proteína el 0,6% y las grasas el 0,3% (Kozioł & Macía, 1998). Por último, para carambolo los porcentajes del fruto son 0,9, 0,5 y 0,3% para carbohidratos, proteínas y grasas, respectivamente. Además, los frutos de carambolo se caracterizan porque el 90% de su contenido es agua (Soliz Malaga, 2010). Teniendo en cuenta la composición de cada uno de los frutos es evidente que los retos nutricionales enfrentados por las larvas que infestan diferentes plantas hospederas son variables, si bien, para todos los frutos es consistente una deficiencia en proteínas, la ciruela provee más azúcares a la larva, en comparación con el mango y el carambolo (Kozioł & Macía, 1998; Soliz Malaga, 2010).

Las diferencias en la composición de los frutos de las plantas de ciruela, mango y carambolo expuestas anteriormente podrían relacionarse con las variaciones observadas en la estructura de la microbiota. En otros estudios se ha observado que la dieta vegetal y la alternancia de plantas hospederas puede desencadenar cambios en la composición de la microbiota en áfidos (He *et al.*, 2021; Ma *et al.*, 2021) y en lepidópteros (Näsvall *et al.*, 2021). Asimismo, la comunidad bacteriana de *A. obliqua* cambia cuando las larvas infestan ciruela, mango o carambolo (Gallo-Franco & Toro-Perea, 2020). Por otro lado, variaciones en los grupos fúngicos se han descrito previamente en saltamontes y saltahojas, donde la calidad nutricional de la planta hospedera se refleja en la disminución de simbiontes similares a levaduras (Malassigné *et al.*, 2021). El hecho de alimentarse de frutos de diferentes plantas hospederas podría representar una presión de selección que actúa sobre la microbiota de las larvas (Wang *et al.*, 2020). Las diferentes oportunidades ecológicas dadas por los frutos podrían explicar la abundancia de procariotas en mango y carambolo y la de eucariotas en ciruela.

Respecto al microbioma, la reconstrucción de genomas fue un reto en las réplicas de ciruela, dada la composición de la microbiota, abundante en levaduras. No fue posible reconstruir genomas de levaduras, resultado que asociamos con el tamaño de su genoma, que es varias veces más grande en comparación a genomas procariotas (Fraser-Liggett, 2005). En el caso de las arqueas, su baja representación dentro de la comunidad fue un factor que dificultó la reconstrucción de genomas de genomas de este grupo (Lapidus & Korobeynikov, 2021). Por otro lado, la reconstrucción de los genomas de *Acetobacter persici*, *Gluconobacter sphaericus*, *Tatumella ptyseos* y *Weissella confusa* permitió identificar características metabólicas de estas bacterias. Previamente se ha reportado que las bacterias del ácido acético de los géneros *Acetobacter* y *Gluconobacter*

establecen asociaciones simbióticas con insectos del orden díptera (Crotti *et al.*, 2010), siendo *Acetobacter* un grupo dominante en Tephritidos de los géneros *Bactrocera*, *Zeugodacus* y *Ceratitis* (De Cock *et al.*, 2020). La interacción entre insectos y bacterias del ácido acético se ha atribuido a la dieta rica en carbohidratos que representa el tejido vegetal, también, se ha descrito que estas bacterias se ubican en el intestino medio, ya que el pH ácido es óptimo para su desarrollo (Mazzetto *et al.*, 2016). Los géneros *Acetobacter* y *Gluconobacter* podrían estar desempeñando funciones asociadas a procesos digestivos, en la síntesis de compuestos para el desarrollo larval y en la regulación de patógenos (Vacchini *et al.*, 2017). En cuanto al género *Tatumella* se ha identificado que participan en el metabolismo del nitrógeno, presentando enzimas para degradación de urea y síntesis de aminoácidos esenciales y no esenciales en *Bactrocera olgae* (Blow *et al.*, 2020). Por último, *Weissella confusa* es una bacteria del ácido láctico que podría cumplir funciones relacionadas con el metabolismo de carbohidratos, proporcionar aminoácidos y digerir nutrientes como se ha reportado en *Bactrocera minax* (Yao *et al.*, 2019). Tanto los genomas reconstruidos como la identificación taxonómica de arqueas y hongos nos permitieron realizar inferencias nutricionales sobre la función de estos microorganismos en su interacción con las larvas.

En síntesis, los resultados obtenidos indican que la microbiota de este insecto incluye grupos procariotas y eucariotas, siendo estos últimos un componente significativo en las larvas que infestan frutos de ciruela. Esto resalta la importancia de realizar una caracterización de los microorganismos asociados mediante metodologías robustas, que permitan tener en cuenta a otros grupos diferentes a bacterias que podrían estar cumpliendo diferentes roles dentro de la interacción insecto-microorganismo. También, posicionan a las levaduras como grupo de interés para aplicar diferentes enfoques que permitan una caracterización y comprensión más completa de las funciones desempeñadas por los taxa fúngicos. Sumado a esto, los resultados sugieren que las propiedades metabólicas de la microbiota podrían estar contribuyendo a la capacidad de *A. obliqua* de utilizar

diferentes especies de plantas como recurso alimenticio. Estos resultados son importantes como punto de inicio para la comprensión de la interacción fitófago-microorganismo en procesos de diversificación de este gremio y para la aplicación en estrategias de manejo integrado de plagas. Por último, en este estudio se lograron identificar posibles rutas metabólicas de cuatro genomas bacterianos, pero aún no se conocen los niveles de expresión del microbioma en respuesta a cada planta hospedera, lo que permitiría establecer de forma más clara el rol de la comunidad microbiana asociada, para lo cual a futuro se pueden desarrollar estudios metatranscripómicos en *A. obliqua*.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a la Universidad del Valle por el apoyo financiero brindado mediante el proyecto “Análisis de la huella genómica en la mosca de la fruta *Anastrepha obliqua*, asociada con su condición de insecto polífago”. Agradezco a César Lemos, Daniel Castro y Elkin Aguirre por la asistencia en campo. A Diana López y Nelson Rivera por su orientación en el análisis de datos. Al Laboratorio de Cómputo Científico de CIBioFi y a Compute Canada por el acceso a sus recursos computacionales. A mis amigos y familia por todo el apoyo que me han brindado siempre y durante el desarrollo de este trabajo.

LITERATURA CITADA

- Aguirre-Ramirez, E.J., Velasco-Cuervo, S.M., Gallo-Franco, J.J., Gonzáles, R., Carrejo, N.S. y Toro-Perea, N. (2017), “Genetic diversity and population structure of *Anastrepha obliqua* in southwestern Colombia”, *Entomologia Experimentalis et Applicata*, Blackwell Publishing Ltd, Vol. 164 No. 3, pp. 291–304.
- Akami, M.A., Andongma, A.A., Zhengzhong, C., Nan, J., Khaeso, K., Jurkevitch, E., Niu, C.-Y., *et al.* (2019), “Intestinal bacteria modulate the foraging behavior of the oriental fruit fly *Bactrocera dorsalis* (Diptera: Tephritidae)”, doi:<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0210109>.

- Alneberg, J., Karlsson, C.M.G., Divne, A.M., Bergin, C., Homa, F., Lindh, M. V., Hugerth, L.W., *et al.* (2018), “Genomes from uncultivated prokaryotes: A comparison of metagenome-assembled and single-amplified genomes 06 Biological Sciences 0604 Genetics”, *Microbiome*, BioMed Central Ltd., Vol. 6 No. 1, p. 173.
- Bernays, E.A. y Chapman, R.E. (1994), “Introduction”, *Host-Plant Selection by Phytophagous Insects*, Springer US, pp. 1–3.
- Blow, F., Gioti, A., Goodhead, I.B., Kalyva, M., Kampouraki, A., Vontas, J. y Darby, A.C. (2020), “Functional Genomics of a Symbiotic Community: Shared Traits in the Olive Fruit Fly Gut Microbiota”, *Genome Biology and Evolution*, Oxford Academic, Vol. 12 No. 2, pp. 3778–3791.
- Boykin, L.M., Shatters, R.G., Hall, D.G., Burns, R.E. y Franqui, R.A. (2006), “Analysis of host preference and geographical distribution of *Anastrepha suspensa* (Diptera: Tephritidae) using phylogenetic analyses of mitochondrial cytochrome oxidase I DNA sequence data”, *Bulletin of Entomological Research*, Cambridge University Press, Vol. 96 No. 5, pp. 457–469.
- Carrejo, N.S. y González, R. (1994), *LISTA PRELIMINAR DE LAS MOSCAS DE LA FRUTA DEL GENERO Anastrepha (DIP.: TEPHRITIDAE) EN EL DEPARTAMENTO DEL VALLE DEL CAUCA CALI, COLOMBIA*, *Bol. Mus. Ent. Univ. Valle*, Vol. 2.
- Castañeda, M.R., Selivon, D., Hernández-Ortiz, V., Soto, A. y Canal, N.A. (2015), “Morphometric divergence in populations of *Anastrepha obliqua* (Diptera, tephritidae) from Colombia and some neotropical locations”, *ZooKeys*, Pensoft Publishers, Vol. 2015 No. 540, pp. 61–81.
- Cattonaro, F., Spadotto, A., Radovic, S. y Marroni F. (2018), “Do you cov me? Effect of coverage reduction on metagenome shotgun sequencing studies”, *F1000Research*, F1000Res, Vol. 7, doi:<https://doi.org/10.12688/F1000RESEARCH.16804.4>.
- Chen, B., Teh, B.-S., Sun, C., Hu, S., Lu, X., Boland, W. y Shao, Y. (2016), “Biodiversity and Activity of the Gut Microbiota across the Life History of the Insect Herbivore *Spodoptera littoralis*”, *Nature Publishing Group*, doi:<https://doi.org/10.1038/srep29505>.

- Chen, L.-X., Anantharaman, K., Shaiber, A., Eren, A.M. y Banfield, J.F. (2020), “Accurate and complete genomes from metagenomes”, *Genome Research*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Vol. 30 No. 3, pp. 315–333.
- Clarke, A.R. (2017), “Why so many polyphagous fruit flies (Diptera: Tephritidae)? A further contribution to the ‘generalism’ debate”, *Biological Journal of the Linnean Society*, Oxford University Press, 1 febrero.
- Creevey, C.J., Doerks, T., Fitzpatrick, D.A., Raes, J. y Bork, P. (2011), “Universally distributed single-copy genes indicate a constant rate of horizontal transfer”, *PLoS ONE*, Public Library of Science, Vol. 6 No. 8, doi:<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0022099>.
- Crotti, E., Rizzi, A., Chouaia, B., Ricci, I., Favia, G., Alma, A., Sacchi, L., *et al.* (2010), “Acetic acid bacteria, newly emerging symbionts of insects”, *Applied and Environmental Microbiology*, American Society for Microbiology, Vol. 76 No. 21, pp. 6963–6970.
- Dada, N., Sheth, M., Liebman, K., Pinto, J. y Lenhart, A. (2018), “Whole metagenome sequencing reveals links between mosquito microbiota and insecticide resistance in malaria vectors OPEN”, *SCiEntifiC RePoRtS* |, Vol. 8, doi:<https://doi.org/10.1038/s41598-018-20367-4>.
- De Cock, M., Virgilio, M., Vandamme, P., Bourtzis, K., De Meyer, M. y Willems, A. (2020), “Comparative Microbiomics of Tephritid Frugivorous Pests (Diptera: Tephritidae) From the Field: A Tale of High Variability Across and Within Species”, *Frontiers in Microbiology*, Frontiers, Vol. 0, p. 1890.
- Deutscher, A.T., Reynolds, O.L. y Chapman, T.A. (2017), “Yeast: An Overlooked Component of *Bactrocera tryoni* (Diptera: Tephritidae) Larval Gut Microbiota”, *Journal of Economic Entomology*, Oxford Academic, Vol. 110 No. 1, pp. 298–300.
- Douglas, A.E. (2009), “The microbial dimension in insect nutritional ecology”, *Functional Ecology*, John Wiley & Sons, Ltd, Vol. 23 No. 1, pp. 38–47.

- Douglas, A.E. (2015), “Multiorganismal Insects: Diversity and Function of Resident Microorganisms”, doi: <http://dx.doi.org/10.1146/annurev-ento-010814-020822>, Annual Reviews , Vol. 60, pp. 17–34.
- Fagan, W.F., Siemann, E., Mitter, C., Denno, R.F., Huberty, A.F., Woods, H.A. y Elser, J.J. (2002), “Nitrogen in insects: implications for trophic complexity and species diversification.”, *The American naturalist*, The University of Chicago Press , Vol. 160 No. 6, pp. 784–802.
- Folmer, O., Black, M., Hoeh, W., Lutz, R. y Vrijenhoek, R. (1994), "DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates", *Molecular Marine Biology and Biotechnology*, Vol. 3. No 5, pp. 294-299.
- Fraser-Liggett, C.M. (2005), “Insights on biology and evolution from microbial genome sequencing”, *Genome Research*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Vol. 15 No. 12, pp. 1603–1610.
- Fu, L., Li, Z.H., Huang, G.S., Wu, X.X., Ni, W.L. y Qü, W.W. (2014), “The current and future potential geographic range of West Indian fruit fly, *Anastrepha obliqua* (Diptera: Tephritidae)”, *Insect Science*, Blackwell Publishing Ltd, Vol. 21 No. 2, pp. 234–244.
- Gallo-Franco, J.J. y Toro-Perea, N. (2020), “Variations in the Bacterial Communities in *Anastrepha obliqua* (Diptera: Tephritidae) According to the Insect Life Stage and Host Plant”, *Current Microbiology*, Springer, pp. 1–9.
- Gurung, K., Wertheim, B. y Falcao Salles, J. (2019), “The microbiome of pest insects: it is not just bacteria”, *Entomologia Experimentalis et Applicata*, Blackwell Publishing Ltd, 1 marzo.
- Hammer, T.J. y Bowers, M.D. (2015), “Gut microbes may facilitate insect herbivory of chemically defended plants”, *Oecologia* 2015 179:1, Springer, Vol. 179 No. 1, pp. 1–14.
- He, B., Chen, X., Yang, H. y Cernava, T. (2021), “Microbiome Structure of the Aphid *Myzus persicae* (Sulzer) Is Shaped by Different Solanaceae Plant Diets”, *Frontiers in Microbiology*, Frontiers, Vol. 0, p. 1765.

- Jovel, J., Patterson, J., Wang, W., Hotte, N., O’Keefe, S., Mitchel, T., Perry, T., *et al.* (2016), “Characterization of the gut microbiome using 16S or shotgun metagenomics”, *Frontiers in Microbiology*, Frontiers Media S.A., Vol. 7 No. APR, p. 459.
- Knight, R., Vrbanac, A., Taylor, B.C., Aksenov, A., Callewaert, C., Debelius, J., Gonzalez, A., *et al.* (2018), “Best practices for analysing microbiomes”, *Nature Reviews Microbiology*, Nature Publishing Group, 1 julio.
- Kozioł, M.J. y Macía, M.J. (1998), “Chemical composition, nutritional evaluation, and economic prospects of *Spondias purpurea* (anacardiaceae)”, *Economic Botany*, Vol. 52 No. 4, pp. 373–380.
- Krishnan, M., Bharathiraja, C., Pandiarajan, J., Prasanna, V.A., Rajendhran, J. y Gunasekaran, P. (2014), “Insect gut microbiome – An unexploited reserve for biotechnological application”, *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, No longer published by Elsevier, Vol. 4, pp. S16–S21.
- Lapidus, A.L. y Korobeynikov, A.I. (2021), “Metagenomic Data Assembly – The Way of Decoding Unknown Microorganisms”, *Frontiers in Microbiology*, Frontiers, Vol. 0, p. 653.
- Ma, Y.-J., He, H.-P., Zhao, H.-M., Xian, Y.-D., Guo, H., Liu, B. y Xue, K. (2021), “Microbiome diversity of cotton aphids (*Aphis gossypii*) is associated with host alternation”, *Scientific Reports* |, Vol. 11, p. 5260.
- Majumder, R., Sutcliffe, B., Taylor, P.W. y Chapman, T.A. (2019), “Next-Generation Sequencing reveals relationship between the larval microbiome and food substrate in the polyphagous Queensland fruit fly”, *Scientific Reports*, Vol. 9 No. 1, pp. 1–12.
- Malacrinò, A., Campolo, O., Medina, R.F. y Palmeri, V. (2018), “Instar- and host-associated differentiation of bacterial communities in the Mediterranean fruit fly *Ceratitis capitata*”, *PLOS ONE*, Public Library of Science, Vol. 13 No. 3, p. e0194131.

- Malassigné, S., Minard, G., Vallon, L., Martin, E., Moro, C.V. y Luis, P. (2021), “Diversity and Functions of Yeast Communities Associated with Insects”, *Microorganisms* 2021, Vol. 9, Page 1552, Multidisciplinary Digital Publishing Institute, Vol. 9 No. 8, p. 1552.
- Mazzetto, F., Gonella, E., Crotti, E., Vacchini, V., Syrpas, M., Pontini, M., Mangelinckx, S., *et al.* (2016), “Olfactory attraction of *Drosophila suzukii* by symbiotic acetic acid bacteria”, *Journal of Pest Science* 2016 89:3, Springer, Vol. 89 No. 3, pp. 783–792.
- McMurdie, P.J. y Holmes, S. (2013), “phyloseq: An R Package for Reproducible Interactive Analysis and Graphics of Microbiome Census Data”, *PLOS ONE*, Public Library of Science, Vol. 8 No. 4, p. e61217.
- Moran, N.A., McCutcheon, J.P. y Nakabachi, A. (2008), “Genomics and Evolution of Heritable Bacterial Symbionts”, *Annual Review of Genetics*, Annual Reviews, Vol. 42 No. 1, pp. 165–190.
- Morrow, J.L., Frommer, M., Shearman, D.C.A. y Riegler, M. (2015), “The Microbiome of Field-Caught and Laboratory-Adapted Australian Tephritid Fruit Fly Species with Different Host Plant Use and Specialisation”, *Microbial Ecology* 2015 70:2, Springer, Vol. 70 No. 2, pp. 498–508.
- Näsvall, K., Wiklund, C., Mrazek, V., Künstner, A., Talla, V., Busch, H., Vila, R., *et al.* (2021), “Host plant diet affects growth and induces altered gene expression and microbiome composition in the wood white (*Leptidea sinapis*) butterfly”, *Molecular Ecology*, John Wiley & Sons, Ltd, Vol. 30 No. 2, pp. 499–516.
- Noman, M.S., Liu, L., Bai, Z. y Li, Z. (2020), “Tephritidae bacterial symbionts: Potentials for pest management”, *Bulletin of Entomological Research*, Cambridge University Press, 1 febrero.
- Perez-Staples, D., Díaz-Fleischer, F., Montoya, P. y Vera, M.T. (2019). "Area-wide management of fruit fly pests". *CRC Press*, 13:978-1-138-47745-2.

- Qin, M., Jiang, L., Bakhtiyor, , Kholmatov, R., Gexia Qiao, · y Chen, J. (2021). “Phylosymbiotic Structures of the Microbiota in *Mollitrichosiphum tenuicorpus* (Hemiptera: Aphididae: Greenideinae)”, *Microbial Ecology*, Vol. 1, p. 3.
- Quince, C., Walker, A.W., Simpson, J.T., Loman, N.J. y Segata, N. (2017), “Shotgun metagenomics, from sampling to analysis”, *Nature Biotechnology*, Nature Publishing Group, 12 septiembre.
- Ranjan, R., Rani, A., Metwally, A., McGee, H.S. y Perkins, D.L. (2016), “Analysis of the microbiome: Advantages of whole genome shotgun versus 16S amplicon sequencing”, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, Academic Press, Vol. 469 No. 4, pp. 967–977.
- Raza, M.F., Yao, Z., Bai, S., Cai, Z. y Zhang, H. (2020), “Tephritidae fruit fly gut microbiome diversity, function and potential for applications”, *Bulletin of Entomological Research*, Cambridge University Press, Vol. 110 No. 4, pp. 423–437.
- Sánchez-Sánchez, H. y Morquecho-Contreras, A. (2017), “Chemical Plant Defense Against Herbivores”, *Herbivores*, IntechOpen, doi:<https://doi.org/10.5772/67346>.
- Scally, M., Into, F., Thomas, D.B., Ruiz-Arce, R., Barr, N.B. y Schuenzel, E.L. (2016), “Resolution of inter and intra-species relationships of the West Indian fruit fly *Anastrepha obliqua*”, *Molecular Phylogenetics and Evolution*, Academic Press Inc., Vol. 101, pp. 286–293.
- Shan, H., Wu, W., Sun, Z., Chen, J. y Li, H. (2021), “The Gut Microbiota of the Insect Infraorder Pentatomomorpha (Hemiptera: Heteroptera) for the Light of Ecology and Evolution”, *Microorganisms 2021*, Vol. 9, Page 464, Multidisciplinary Digital Publishing Institute, Vol. 9 No. 2, p. 464.
- Soliz Malaga, C.L.S. (2010), *Modelamiento matemático de la transferencia de sacarosa en la deshidratación osmótica del fruto de la carambola*. Tesis de pregrado. Universidad Nacional Amazónica de Madre de Dios.

- Soloneski, S.S., Larramendy, M. (2012), "Integrated Pest Management and Pest Control: Current and Future Tactics". Rijeka: *InTechOpen*.
- Sudakaran, S., Retz, F., Kikuchi, Y., Kost, C. y Kaltenpoth, M. (2015), "Evolutionary transition in symbiotic syndromes enabled diversification of phytophagous insects on an imbalanced diet", *ISME Journal*, Nature Publishing Group, Vol. 9 No. 12, pp. 2587–2604.
- Uritskiy, G. V., DiRuggiero, J. y Taylor, J. (2018), "MetaWRAP—a flexible pipeline for genome-resolved metagenomic data analysis", *Microbiome* 2018 6:1, BioMed Central, Vol. 6 No. 1, pp. 1–13.
- Vacchini, V., Gonella, E., Crotti, E., Prosdocimi, E.M., Mazzetto, F., Chouaia, B., Callegari, M., *et al.* (2017), "Bacterial diversity shift determined by different diets in the gut of the spotted wing fly *Drosophila suzukii* is primarily reflected on acetic acid bacteria", *Environmental Microbiology Reports*, John Wiley & Sons, Ltd, Vol. 9 No. 2, pp. 91–103.
- Van den Bosch, T.J.M. y Welte, C.U. (2017), "Detoxifying symbionts in agriculturally important pest insects", *Microbial Biotechnology*, John Wiley and Sons Ltd, 1 mayo.
- Ventura, C., Briones-Roblero, C.I., Hernández, E., Rivera-Orduña, F.N. y Zúñiga, G. (2018), "Comparative Analysis of the Gut Bacterial Community of Four *Anastrepha* Fruit Flies (Diptera: Tephritidae) Based on Pyrosequencing", *Current Microbiology*, Springer New York LLC, Vol. 75 No. 8, pp. 966–976.
- Virgilio, M., White, I. y De Meyer, M. (2014), "A set of multi-entry identification keys to African frugivorous flies (Diptera, Tephritidae)", *ZooKeys*, Pensoft Publishers.
- Wang, Z.-L., Pan, H., Wu, W., Li, M.-Y. y Yu, X.-P. (2020), "The gut bacterial flora associated with brown planthopper is affected by host rice varieties", *Archives of Microbiology* 2020 203:1, Springer, Vol. 203 No. 1, pp. 325–333.
- Wu, S., Zhu, Z., Fu, L., Niu, B. y Li, W. (2011), "WebMGA: a customizable web server for fast metagenomic sequence analysis", *BMC Genomics* 2011 12:1, BioMed Central, Vol. 12 No. 1, pp. 1–9.

- Yao, Z., Ma, Q., Cai, Z., Raza, M.F., Bai, S., Wang, Y., Zhang, P., *et al.* (2019), “Similar Shift Patterns in Gut Bacterial and Fungal Communities Across the Life Stages of *Bactrocera minax* Larvae From Two Field Populations”, *Frontiers in Microbiology*, Frontiers, Vol. 0, p. 2262.
- Ye, Y. y Doak, T.G. (2009), “A Parsimony Approach to Biological Pathway Reconstruction/Inference for Genomes and Metagenomes”, *PLOS Computational Biology*, Public Library of Science, Vol. 5 No. 8, p. e1000465.
- Yong, H.-S., Song, S.-L., Chua, K.-O. y Lim, P.-E. (2017), “High Diversity of Bacterial Communities in Developmental Stages of *Bactrocera carambolae* (Insecta: Tephritidae) Revealed by Illumina MiSeq Sequencing of 16S rRNA Gene”, *Current Microbiology* 2017 74:9, Springer, Vol. 74 No. 9, pp. 1076–1082.
- Zapata, H.J. y Quagliarello, V.J. (2015), “The microbiota and microbiome in aging: Potential implications in health and age-related diseases”, *Journal of the American Geriatrics Society*, Blackwell Publishing Inc., Vol. 63 No. 4, pp. 776–781.

TABLAS

Tabla 1. Índices de diversidad alfa de la microbiota de las larvas de *A. obliqua*.

Muestra	Número de lecturas	Riqueza	Shannon	Simpson
Ciruela 1	3.342.569	7.302	6.98	0.99
Ciruela 2	3.180.657	7.289	7.12	1.00
Ciruela 3	2.472.039	6.988	7.33	1.00
Mango 1	2.498.064	6.372	5.12	0.94
Mango 2	2.829.169	6.843	4.10	0.88
Mango 3	2.537.132	6.926	5.51	0.97
Carambolo 1	3.187.913	7.397	4.99	0.90
Carambolo 3	3.579.196	7.555	5.22	0.97

Tabla 2. Taxonomía y calidad de los genomas ensamblados en cada contenedor

Contenedor	Taxonomía	Completación (%)	Contaminación (%)
2	<i>Gluconobacter sphaericus</i>	57.47	5.17
3	Acetobacteraceae	78.69	2.03
4	Gammaproteobacteria	92.93	1.41
5	<i>Leuconostoc</i>	92.15	0.33
6	<i>Tatumella ptyseos</i>	84.84	7.10
7	<i>Weissella confusa</i>	96.91	1.72
9	<i>Acetobacter persici</i>	86.94	3.23

LEYENDAS DE LAS FIGURAS

Figura 1. Curvas de rarefacción para cada una de las réplicas. Cantidad de especies en función del esfuerzo de muestreo.

Figura 2. Abundancia relativa de los Phyla que constituyen la microbiota de las larvas de *A. obliqua*. Los Phyla que presentaron una abundancia relativa menor al 5% se agruparon en una sola categoría.

Figura 3. Abundancia relativa de los Géneros pertenecientes a los cuatro Phyla más abundantes que constituyen la microbiota de las larvas de *A. obliqua*. a) Géneros del Phylum Proteobacteria b) Géneros del Phylum Firmicutes c) Géneros del Phylum Bacteroidetes d) Géneros del Phylum Ascomycota. Los Géneros que presentaron una abundancia relativa menor al 10% se agruparon en una sola categoría.

Figura 4. Abundancia relativa de los microorganismos del dominio Arquea asociados con las larvas de *A. obliqua*. . a) Phyla más abundantes del dominio Arquea. Los Phyla que presentaron una abundancia relativa menor al 5% se agruparon en una sola categoría. b) Géneros del Phylum Crenarchaeota c) Géneros del Phylum Euryarchaeota d) Géneros del Phylum Thaumarchaeota. Los Géneros que presentaron una abundancia relativa menor al 10% se agruparon en una sola categoría.

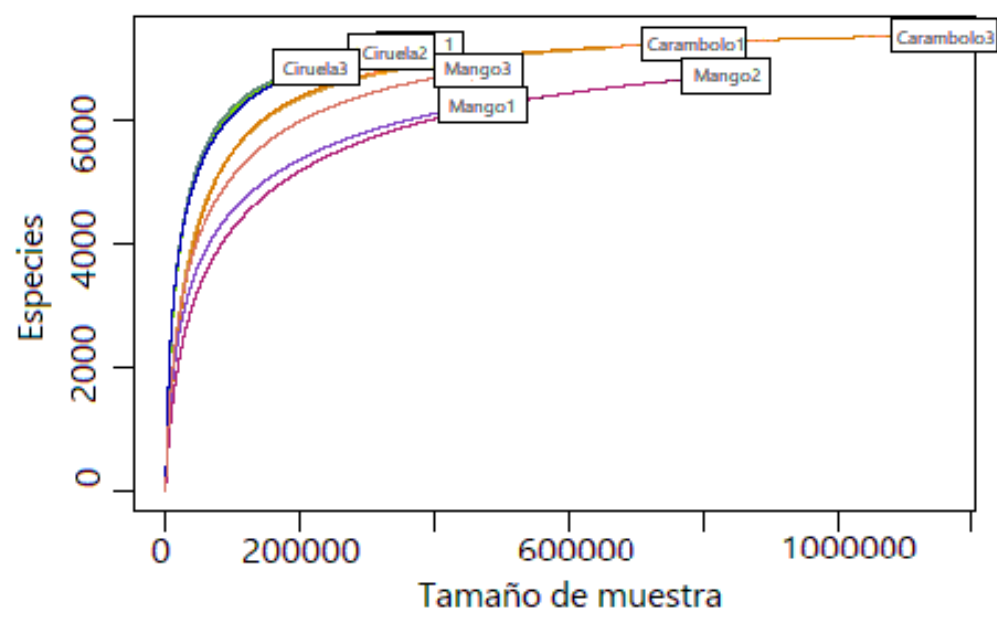
Figura 5. Análisis de coordenadas principales (PCoA), basado en distancias de Bray-Curtis, de la microbiota de *A. obliqua* en relación con la planta hospedera.

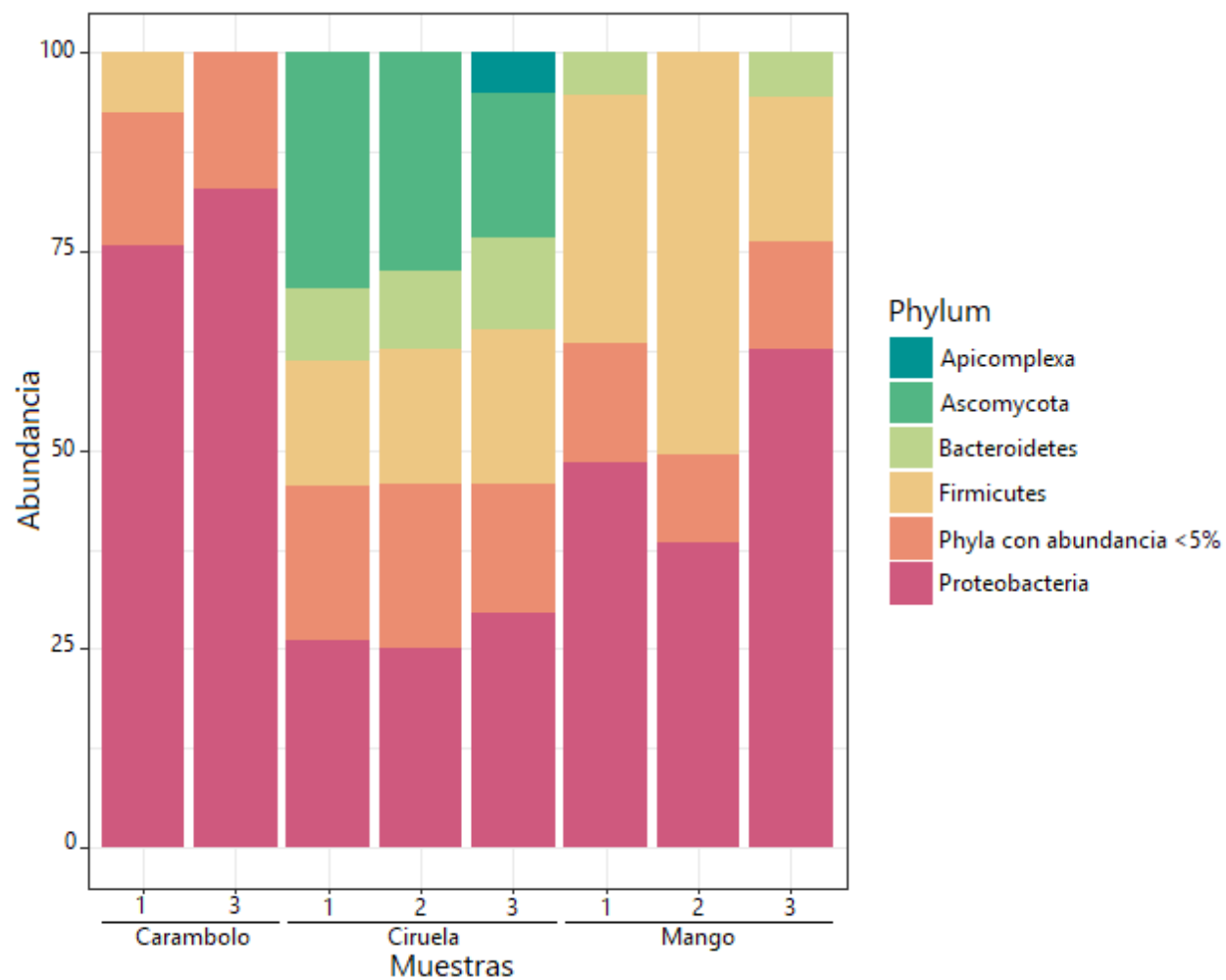
Figura 6. Abundancia de los genomas reconstruidos por réplica. Los colores representan la cantidad de lecturas por réplica que se mapean contra cada genoma. En la escala, los colores amarillos simbolizan una mayor cantidad de lecturas asociadas a los genomas reconstruidos; los colores negros simbolizan ausencia de lecturas de los genomas reconstruidos en la réplica. Los dendrogramas representan la relación entre las réplicas biológicas.

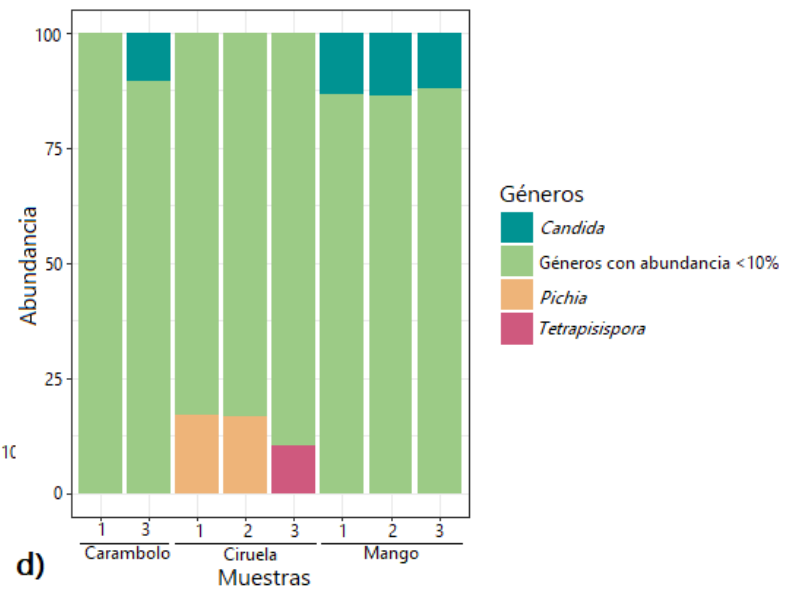
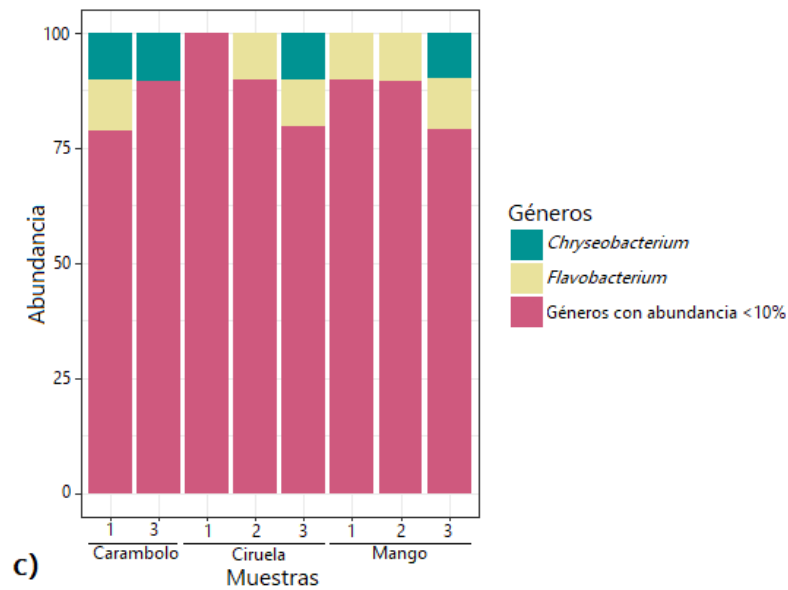
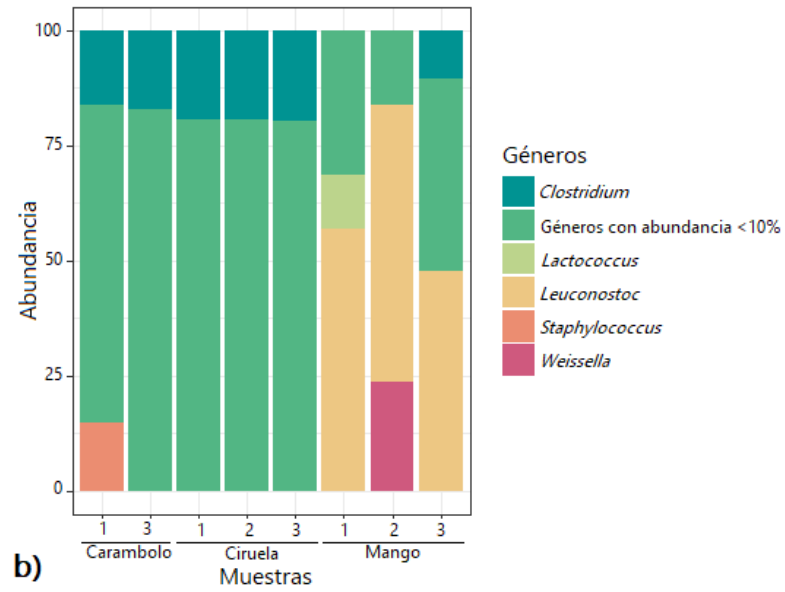
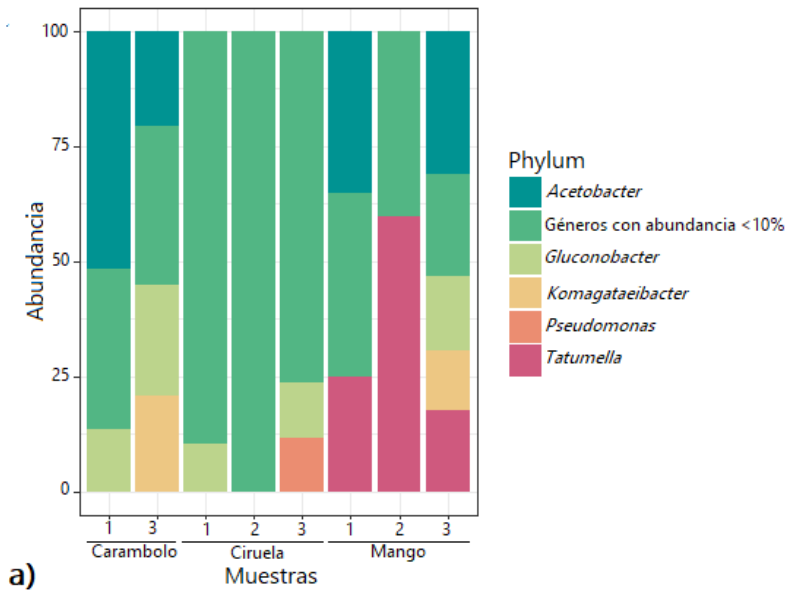
Figura 7. Representación del genoma de la especie *Gluconobacter sphaericus*. CDS: Región codificante. BLAST: Comparación del genoma reconstruido contra el genoma de referencia del gen bank (NZ_CP068419). Misc_feature: Región de interés biológico que no se puede ubicar en otra categoría.

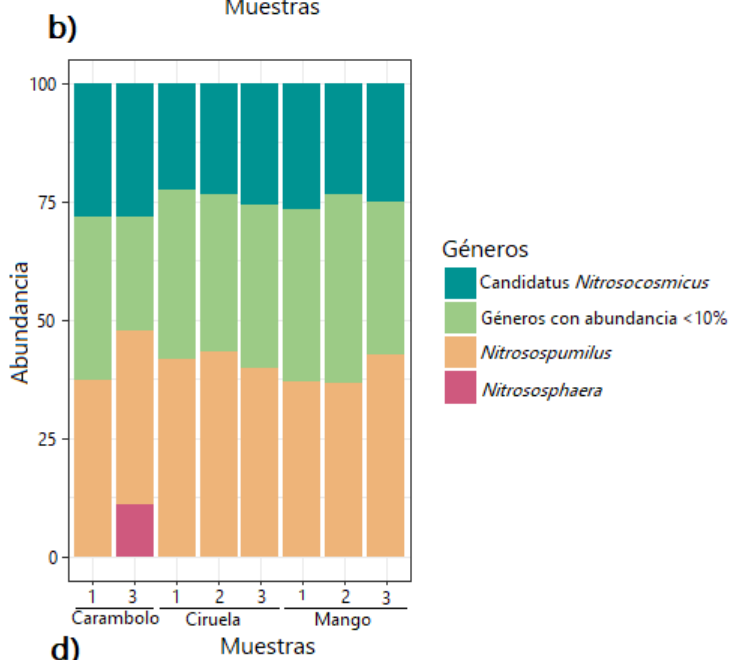
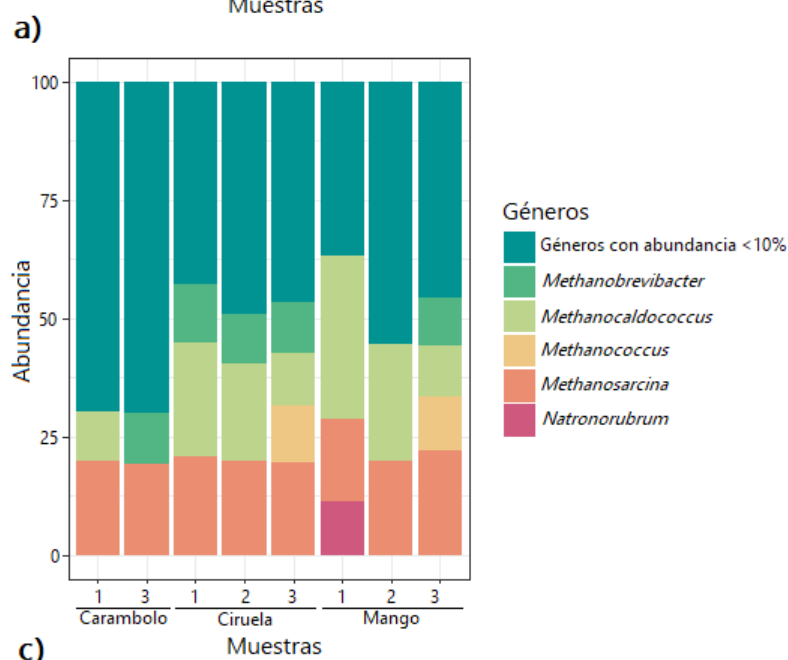
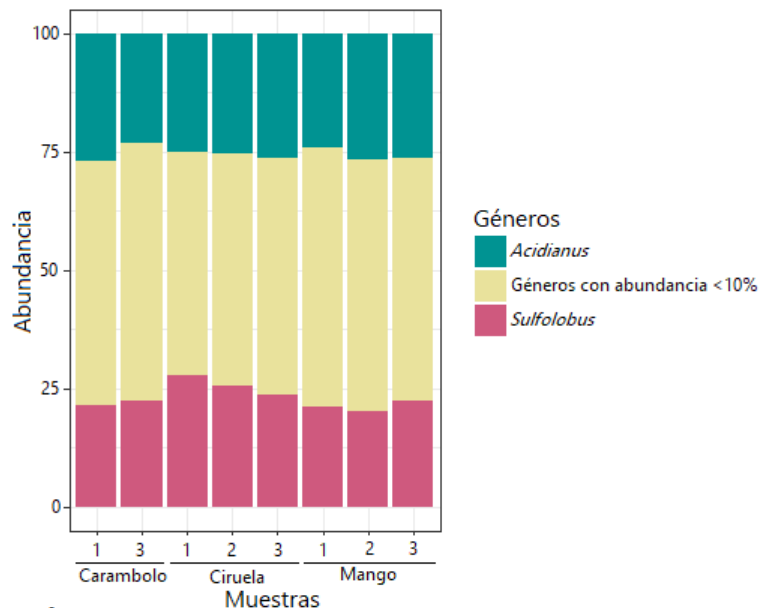
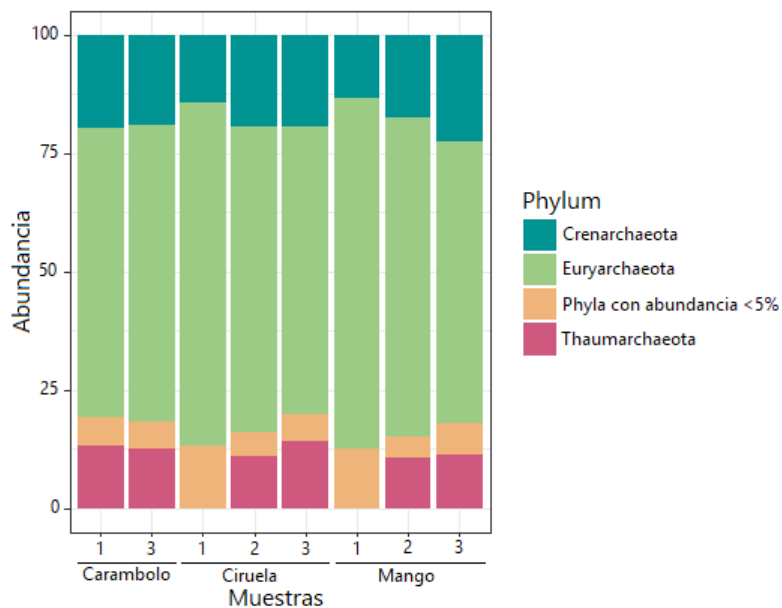
Figura 8. Prevalencia de los grupos ortólogos de proteínas inferidos de los genomas microbianos reconstruidos. Los colores representan la cantidad de secuencias codificantes que fueron asociadas a un identificador de la base de datos COG. En la escala, los colores azules representan una mayor prevalencia de secuencias codificantes asociadas con identificadores COG dentro de cada categoría; los colores amarillos simbolizan la ausencia de secuencias codificantes asociadas a identificadores COG en las diferentes categorías funcionales.

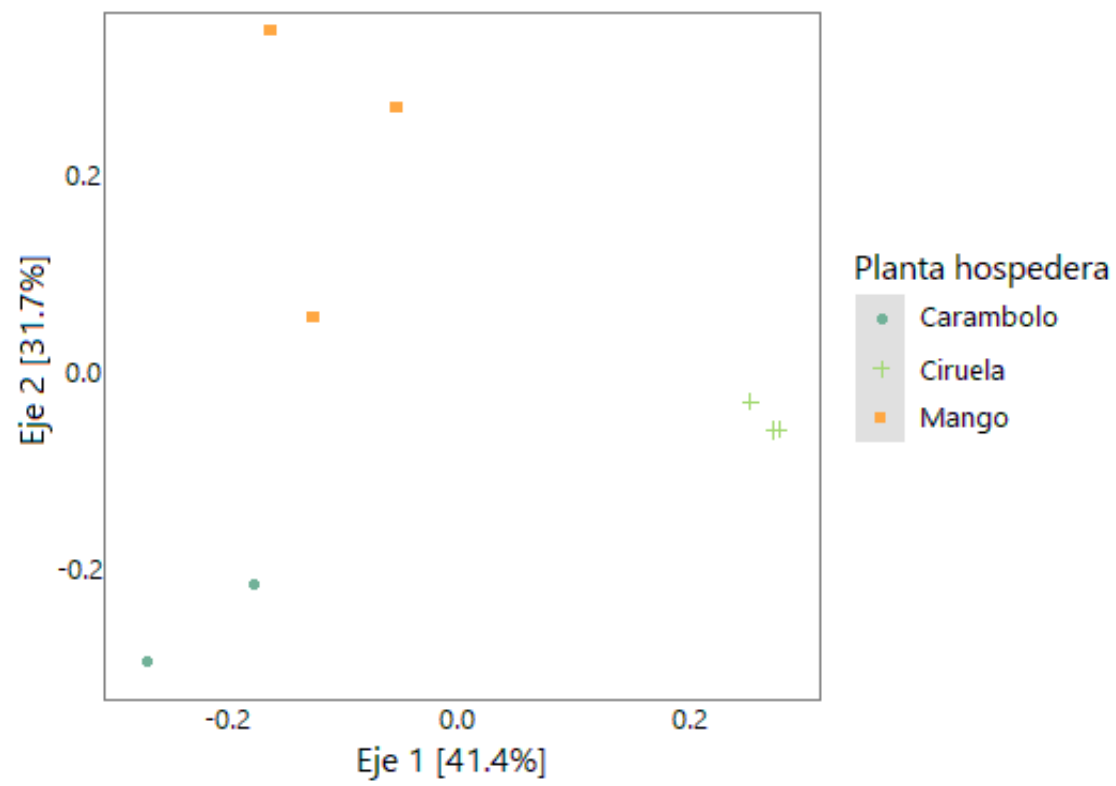
FIGURAS

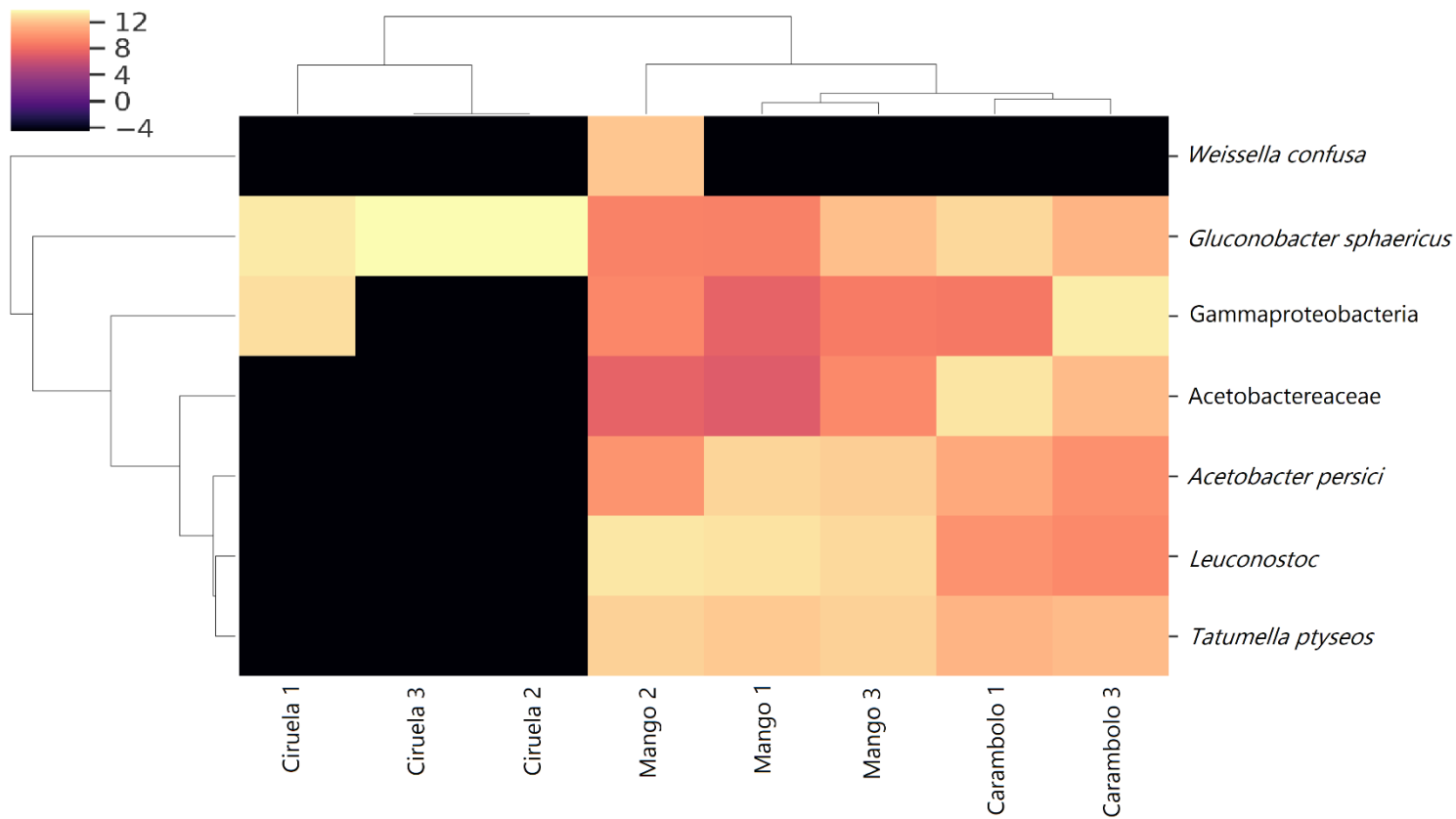


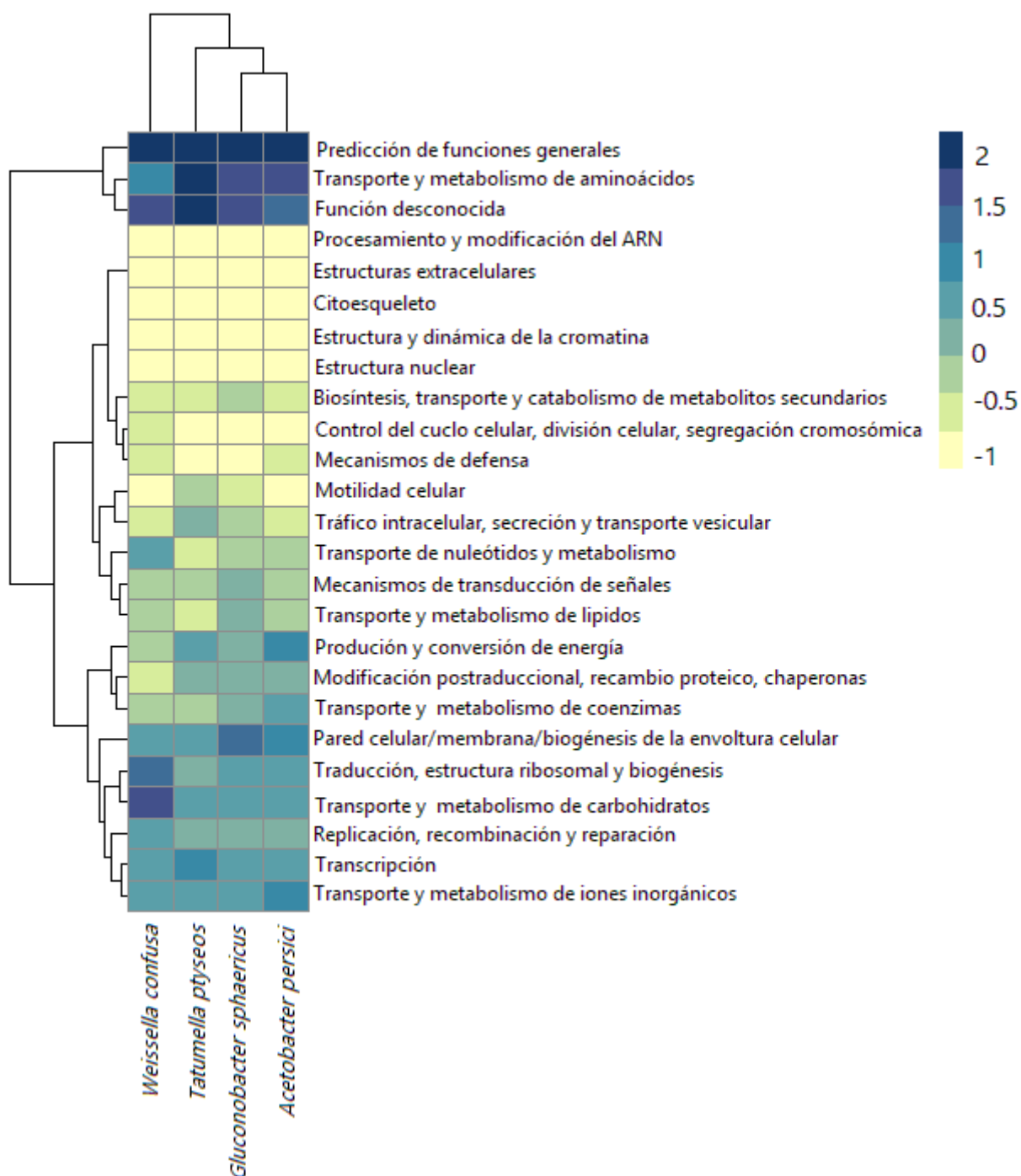










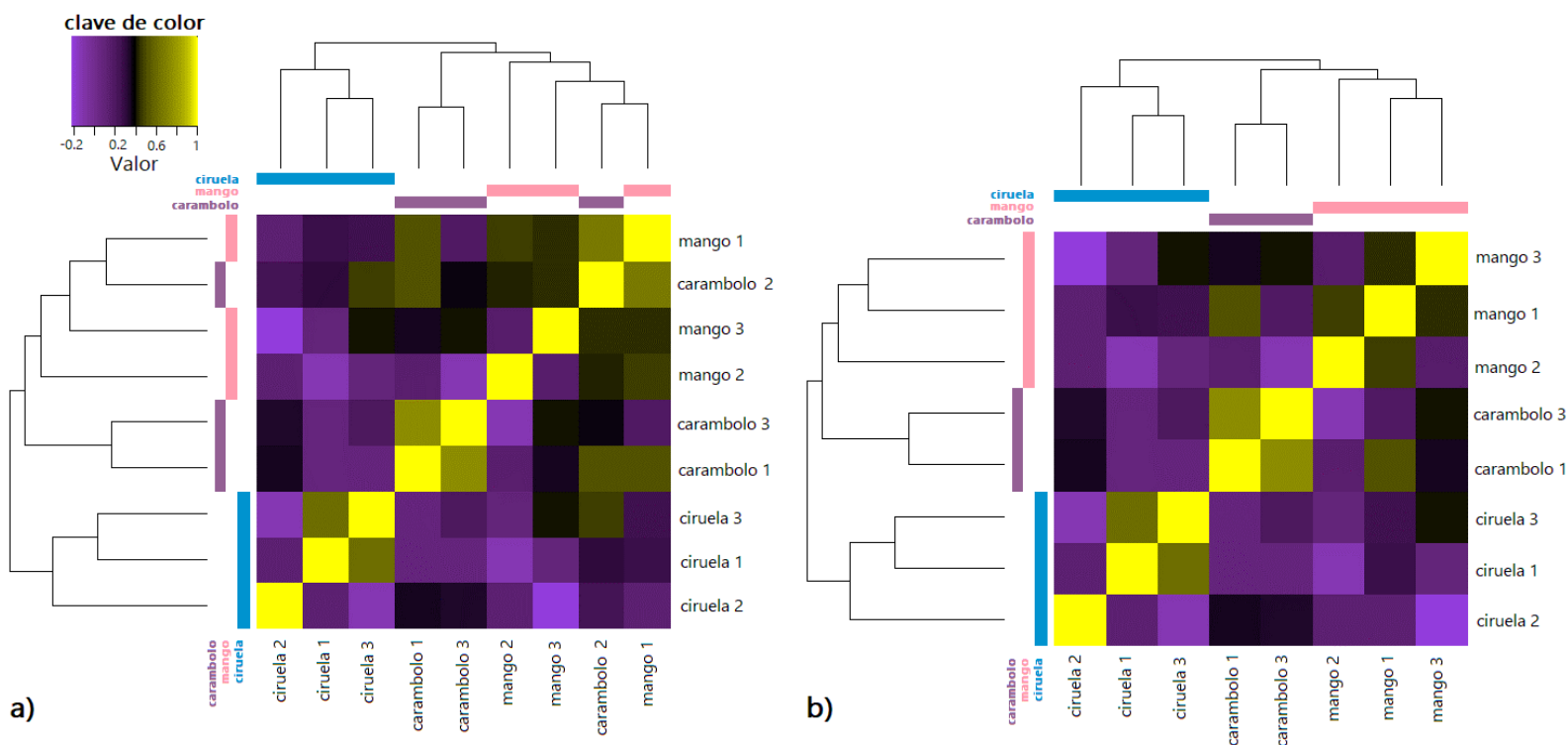


APÉNDICES

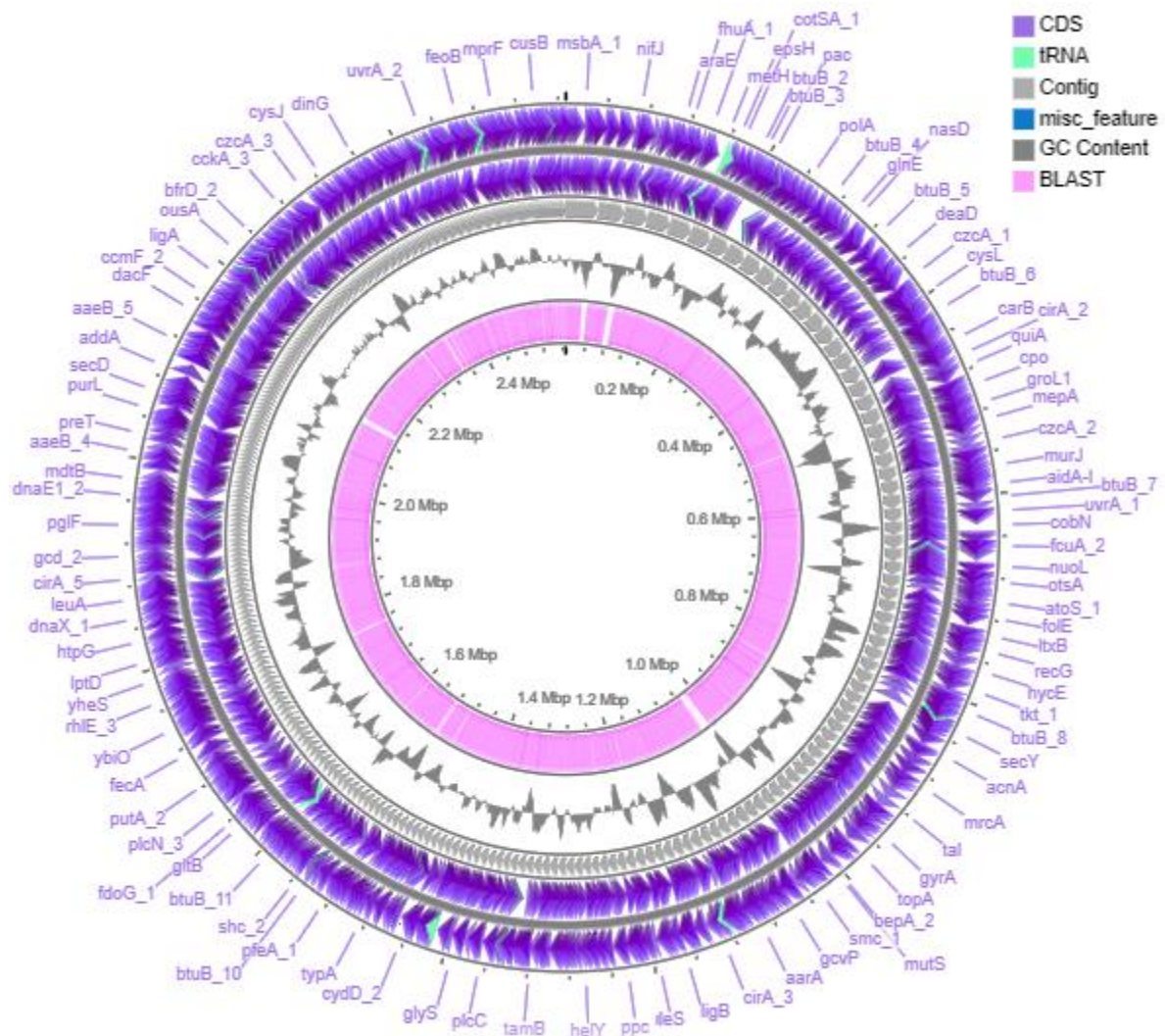
Apéndice A: Cantidad de lecturas obtenidas mediante la secuenciación de alto rendimiento.

*Lecturas crudas obtenidas por réplica, estas lecturas corresponden al ADN de *A. obliqua* y al ADN de sus microorganismos asociados. **Lecturas procesadas por réplica, estas lecturas son exclusivas de la comunidad microbiana.

Muestra	Cantidad de lecturas crudas*	Cantidad de lecturas procesadas**
Ciruela 1	65.687.782	3.342.569
Ciruela 2	75.477.373	3.180.657
Ciruela 3	73.532.461	2.472.039
Mango 1	72.880.096	2.498.064
Mango 2	77.681.314	2.829.169
Mango 3	82.108.406	2.537.132
Carambolo 1	77.339.978	3.187.913
Carambolo 2	75.423.788	1.648.737
Carambolo 3	76.538.212	3.579.196



Apéndice B: Agrupamiento de las réplicas basado en una valoración taxonómica inicial. a) Análisis realizado con las 9 réplicas iniciales. b) Análisis realizado excluyendo la réplica 2 de carambolo. La escala representa el coeficiente de correlación de Pearson, los colores amarillos simbolizan una mayor correlación y los morados un menor grado de correlación entre las muestras.



Apéndice E: Representación del genoma de la especie *Acetobacter persici*. CDS: Región codificante. BLAST: Comparación del genoma reconstruido contra el genoma de referencia del gen bank (NZ_CP014687). Misc_feature: Región de interés biológico que no se puede ubicar en otra categoría.