



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS

Microbiota de la mosca mexicana de la fruta *Anastrepha ludens* y su papel en la nutrición y elección femenina

T E S I S

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

Maestro en Ciencias

PRESENTA:

VICTOR MANUEL HIGAREDA ALVEAR

TUTOR PRINCIPAL

Dra. ESPERANZA MARTÍNEZ ROMERO
CENTRO DE CIENCIAS GENÓMICAS, UNAM

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

Dr. EDMUNDO CALVA MERCADO
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA, UNAM

Dr. JORGE CONTRERAS GARDUÑO
MAESTRIA Y DOCTORADO EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS

Cuernavaca, Morelos. Febrero, 2015



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

ÍNDICE

RESUMEN	1
INTRODUCCIÓN	2
Simbiosis.....	2
Simbiosis en insectos.....	3
Clasificación de los simbioses.....	4
Microbiota intestinal	6
Contribución de la microbiota intestinal a su hospedero.....	8
Relación de las bacterias con el comportamiento	9
Importancia de las bacterias en la selección sexual	10
Importancia de las bacterias en la adecuación	11
ANTECEDENTES	12
Mosca mexicana de la fruta	12
Ciclo de vida	12
Comportamiento sexual de <i>Anastrepha ludens</i>	13
Relaciones simbióticas en Tefritidos.....	14
Papel de las bacterias asociadas a moscas de la fruta.....	14
Transmisión de las bacterias asociadas a moscas de la fruta.....	15
Bacterias asociadas con <i>A. ludens</i>	16
Función de las bacterias asociadas con <i>A. ludens</i>	17
HIPOTESIS	18
OBJETIVO GENERAL	18
OBJETIVOS PARTICULARES	18
MATERIALES Y METODOS	19
Insectos.....	19
Alimentación	19
Desinfección de huevo, larva, pupa y adultos	20
Obtención de huevo silvestre	20
Dissección de moscas	20
Obtención de bacterias y medios de cultivo.....	20
Aislamiento de colonias	21

Tinción de Gram	21
Determinación de las capacidades uricolítica y pectinolítica de los aislados.....	21
Ensayo de reducción de acetileno.....	22
Extracción de ADN.....	22
Huella molecular de los aislados bacterianos	23
Amplificación del gen 16S rARN	24
Identificación de las moscas silvestres.....	25
Análisis de las secuencias	26
Análisis filogenético.....	26
Antibiogramas	27
Ensayos de inhibición bacteriana	27
Determinación de ácido úrico en los insectos	27
Alimentación de los machos con antibiótico	28
Eficacia del tratamiento con antibiótico	28
Pruebas de elección femenina	29
Hibridación Fluorescente <i>in situ</i> (FISH)	29
Inclusión en parafina y cortes	30
Hibridación y observación en microscopio	30
Análisis estadístico	30
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	31
Sección I: Identificación de bacterias asociadas con <i>A. ludens</i>	31
Identificación de las moscas silvestres.....	31
Bacterias presentes en <i>A. ludens</i>	33
Huevo	34
Larva.....	37
Pupa	40
Hembra	43
Macho	46
Identificación molecular por el 16S rARN	48

Sección II: Contribución nutricional de las bacterias asociadas con <i>A. ludens</i>	54
Capacidad pectinolítica	54
Capacidad uricolítica	57
Fijación de nitrógeno de las bacterias asociadas con <i>A. ludens</i>	60
Sección III: Importancia de las bacterias asociadas con <i>A. ludens</i> en la elección	
femenina	64
Selección de antibióticos.....	64
Alimentación con antibióticos.....	65
Pruebas de elección femenina	71
Otros microorganismos asociados	74
CONCLUSIONES	76
PERSPECTIVAS	77
Anexo 1.....	78
REFERENCIAS	81

DEDICATORIA

A mis padres Francisco y Elena y mi hermana América por su apoyo.

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Esperanza Martínez por aceptarme en su grupo de investigación y así conocer la importancia de las interacciones microbianas.

A la Dra. Monica Rosenblueth, por su apoyo académico y personal así como por su contribución y observaciones al proyecto.

Al Dr. Jorge Contreras y Dr. Edmundo Calva, por su evaluación y observaciones realizadas al proyecto.

A los revisores de tesis, Dr. Juan Miranda, Dr. Adelfo Escalante, Dr. Christopher Wood, Dr. Guillermo y Dra. Martha Vázquez. Por sus correcciones para la buena redacción de este proyecto.

A Arturo Vera por su enseñanza microbiológica y amistad.

A Tonalli García por sus atinados comentarios.

Al grupo de endosimbiontes de insectos, Tabita, Bere, Luis y Tania por sus comentarios.

A todos los integrantes del grupo de ecología genómica por hacer del laboratorio un lugar ameno.

A mis compañeros y amigos de la maestría por hacer del salón de clases un lugar agradable.

Al P.A.E.P. por el apoyo recibido y al donativo del CONACyT 154453.

“We must bring all the cases where two different species live on or in one another under a comprehensive concept which does not consider the role which the two individuals play but is based on the mere coexistence and for which the term Symbiosis [Symbiotismus] is to be recommended” (Frank, 1877)

ABREVIATURAS

cm	Centímetro
DMSO	Dimetilsulfóxido
dNTP	Deoxinucleótido
g	Gramo
Kb	Kilobase
Mb	Megabase
rARN	Ácido Ribonucleico Ribosomal
UFC	Unidades Formadoras de Colonia

RESUMEN

La simbiosis, interacción ecológica y fuente de cambio evolutivo fue durante mucho tiempo ignorada. Esto cambió cuando se determinó que la célula eucarionte surgió como resultado de una asociación simbiótica. A partir de este momento, el estudio de la simbiosis empezó a tomar gran importancia e interés para los científicos.

Actualmente se propone que todas las plantas y animales mantienen asociaciones simbióticas con microorganismos. Esto nos ha llevado a dejar de considerar a las especies como unidades independientes, en cambio se tiene una visión en donde la unidad de selección está compuesta por el hospedero más la totalidad de sus microorganismos y/o sus genomas asociados. El estudio de las interacciones entre diferentes organismos es importante para entender entre otras cosas la diversidad biológica y funcional que existe en el planeta.

En el presente trabajo, mediante un enfoque dependiente de cultivo, se identificaron las bacterias asociadas a los diferentes estadios de la mosca mexicana de la fruta *Anastrepha ludens*. Estos microorganismos pertenecen a las clases Alfa Proteobacteria, Beta Proteobacteria Gama Proteobacteria, Firmicutes y Actinobacteria.

De especial interés resultó la familia Enterobacteriaceae ya que se encontró asociada con dos poblaciones de moscas silvestres y una de laboratorio, en esta última se mantuvo desde la etapa de huevo hasta adulto.

Por otra parte algunas de los aislados identificados mostraron capacidad de fijación de nitrógeno, degradación de pectina y ácido úrico. La asociación de los insectos con estas bacterias podría contribuir en la nutrición de su hospedero.

Por último, se evaluó si la alimentación de los machos con un coctel de antibióticos tiene un efecto en la elección femenina. Este tratamiento no produjo ningún cambio en la preferencia de la hembra, pero sí modificó la identidad de las bacterias asociadas con los adultos.

INTRODUCCIÓN

Durante miles de millones de años las bacterias fueron las únicas formas de vida sobre el planeta. Durante este tiempo ellas se diversificaron y ocuparon diferentes hábitats. Sin embargo, esto cambió hace aproximadamente dos mil millones de años cuando diferentes microorganismos de vida libre se asociaron para dar origen a los primeras células eucariontes, surgiendo así el primer y más antiguo evento de una asociación simbiótica del que se tenga conocimiento (1,2).

Simbiosis

El término simbiosis fue propuesto de manera independiente por los investigadores Albert Frank y Anton de Bary entre los años 1877 y 1878 para nombrar la asociación entre organismos de diferentes especies (3). Se han propuesto distintas definiciones de simbiosis, una de ellas y la que parece ser la más completa es la de Zook; él define la simbiosis como la adquisición y mantenimiento de uno o más organismos por otros que puede resultar en la formación de nuevas estructuras o capacidades metabólicas. En la naturaleza se pueden encontrar diferentes relaciones simbióticas como son el parasitismo, comensalismo y mutualismo entre otras (4).

La investigación sobre las interacciones entre bacterias y otros organismos se ha enfocado principalmente al estudio de los patógenos. La razón de ello es el impacto que tienen estos microorganismos en la salud de plantas y animales incluyendo el humano. Sin embargo, estas interacciones representan una pequeña parte de la biodiversidad total de asociaciones bacteria-hospedero (1).

En contraste a los patógenos, existen otros microorganismos que proporcionan a su hospedero efectos benéficos ya que le permiten entre otras cosas explotar nuevos ambientes mediante la adquisición de nuevas capacidades metabólicas. Este tipo de interacciones son las responsables de la transición más importante de la vida en la tierra, ya que llevó al surgimiento de la célula eucarionte. Actualmente se propone que todos los organismos que habitan la tierra mantienen algún tipo de interacción ecológica con los microorganismos (1).

Simbiosis en insectos

Los insectos representan el clado más abundante y diverso en número de especies de entre todos los animales, habitan en casi todos los ambientes y explotan una gran variedad de recursos alimenticios. Se han planteado diferentes hipótesis para explicar el éxito de estos animales respecto a otros, ellas toman en cuenta el tiempo evolutivo de este grupo, sus tasas de especiación y extinción y sus adaptaciones morfológicas y fisiológicas (5). Recientemente se ha propuesto que las interacciones que han establecido los insectos con microorganismos benéficos (bacterias) han contribuido al éxito de este grupo (6).

Las primeras observaciones de bacterias asociadas a insectos se realizaron en el año 1880. Durante esta época no se aceptaba completamente la idea de que las bacterias pudiesen estar asociadas con insectos a pesar de que ya se había reconocido la simbiosis de algas con otros animales. Se proponía en cambio que estas formas tipo bacteria en realidad eran productos metabólicos de reserva o incluso un nuevo organelo con función desconocida. Siete años después (1887) Blochmann reportó la primera descripción de lo que denominó células peculiares distribuidas de manera regular presentes en el cuerpo graso, sobre la superficie del huevo y durante el desarrollo del embrión de cucarachas. Debido a su parecido Blochmann expresó que estas células deberían ser bacterias y que al parecer no tenían un efecto perjudicial para su hospedero (7). A partir de este año y hasta nuestros días, se han identificado diferentes bacterias en asociación con los insectos.

Los insectos representan un buen modelo para el estudio de las interacciones simbióticas ya que en comparación con los vertebrados se pueden mantener más fácilmente y de una forma más económica en el laboratorio. Además los insectos tienen ciclos de vida relativamente cortos y mantienen una microbiota reducida lo que ha permitido entender la contribución de estos simbiosis a la fisiología de su hospedero (8). Adicionalmente, también se pueden encontrar hongos asociados a los insectos aunque en comparación con las bacterias, esta interacción es menos estudiada (9).

Actualmente se sabe que las bacterias simbiotes de insectos participan en aspectos relacionados con la reproducción, el desarrollo del sistema inmune y la producción de nutrientes, además de que confieren protección contra patógenos y en ocasiones modifican el comportamiento de sus hospederos. También se ha propuesto que las bacterias intervienen en mecanismos evolutivos como la especiación (10,11 y 12).

Clasificación de los simbiotes

Las bacterias simbiotes de insectos se pueden agrupar en diferentes categorías, una de ellas incluye a los simbiotes obligados o primarios. Ellos habitan dentro de células especializadas denominadas bacteriocitos y su presencia es indispensable para la supervivencia de su hospedero además de que su asociación puede ser tan antigua como en el caso de la bacteria *Sulcia muelleri* simbiote de diferentes especies de hemípteros del suborden Auchenorrhyncha (chicharras, insectos espina) cuya asociación data de aproximadamente 260 millones de años (13). Otra característica importante de este tipo de simbiotes es la reducción de su genoma, pues han perdido genes que ya no les son necesarios en su nuevo hábitat. Ejemplo de ello es la bacteria *Nasuia deltocephalinicola* (Bacteroidetes), simbiote del saltamontes *Macrostelus quadrilineatus* cuyo genoma de 112 Kb es considerado el más pequeño hasta este momento (14).

Los simbiotes primarios se pueden encontrar asociados con insectos que se alimentan de dietas deficientes en aminoácidos o vitaminas, como lo son el floema de las plantas o la sangre de los vertebrados. En estos insectos, las bacterias les proporcionan los nutrientes que ellos no pueden sintetizar u obtener a partir de su alimentación. Tal es el caso de *Buchnera aphidicola* una Gamma Proteobacteria simbiote *Acyrtosiphon pisum*. Ella le provee a su hospedero de aminoácidos esenciales que le son necesarios para su crecimiento y reproducción. A cambio el áfido le proporciona a las bacterias un hábitat y los sustratos para la síntesis de estas moléculas (10).

Por otro lado, la bacteria *Wigglesworthia glossinidia* que encuentra en la mosca Tse-Tse, le proporciona vitaminas que la mosca no puede obtener a partir de su dieta, basada en la sangre de vertebrados. En el genoma de esta bacteria es de 0.7 Mb y en él se encuentra el gen *thiC* que está relacionado con la síntesis de tiamina. La expresión de este gen depende del suministro de vitamina del que disponga el insecto, ya que la presencia de tiamina monofosfato a la dieta de las moscas ocasiona una reducción en la expresión de *thiC* así como en el número de las bacterias presentes (15)

La presencia de *W. glossinidia* en su hospedero también favorece el desarrollo del sistema inmune. Las moscas que carecen de esta bacteria desde estadios inmaduros tienen una menor respuesta inmune celular y humoral (12). Otros insectos en los que se encuentran simbioses primarios son cucarachas, chinches, gorgojos, hormigas, cochinillas y psílidos entre otros (13).

En la segunda categoría se encuentran los simbioses secundarios. Ellos pueden no estar presentes en todos los individuos de la población y su ausencia no compromete la vida de sus hospederos, pero su presencia en ocasiones les confiere nuevas cualidades. Este es el caso de la resistencia contra el ataque de avispas parasitoides conferida por las bacterias *Hamiltonella defensa*, *Serratia symbiotica* y *Regiella insecticola* a un áfido (*Acyrtosiphon pisum*) (8). Los simbioses secundarios se pueden encontrar asociados a diferentes órganos del insecto como el intestino, los órganos reproductivos, el ciego gástrico, el cuerpo graso y la hemolinfa (13).

Microbiota intestinal

El tracto digestivo de los insectos se divide generalmente en tres partes principales. El intestino anterior, medio y posterior (**Figura 1**). En la región anterior y dependiendo de la especie de insecto se pueden encontrar invaginaciones intestinales denominadas criptas o una estructura en donde se almacenan los alimentos (buche). En el intestino medio es donde se lleva a cabo la mayor parte de la digestión y la absorción de los nutrientes mientras que en la parte distal ocurre la reabsorción de agua, sales y la formación de las heces. Adicionalmente en esta región también se encuentran los túbulos de Malpighi que conforman un sistema excretor y osmoregulador (6).

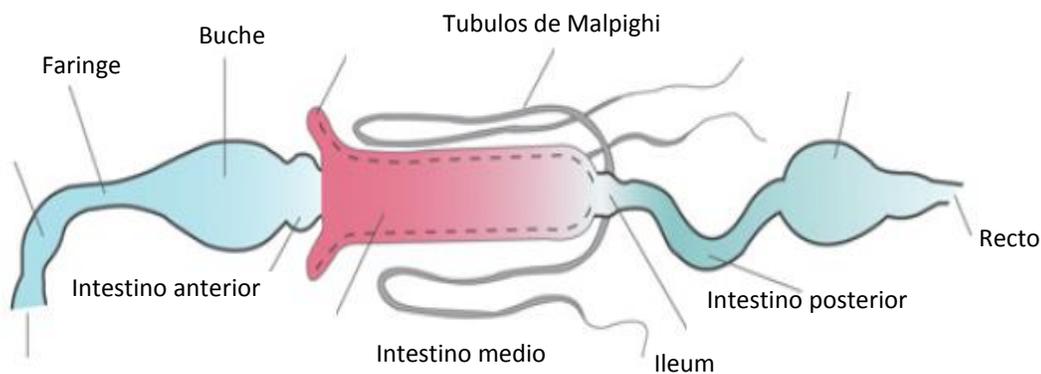


Figura 1 El tracto digestivo de un insecto se divide en tres regiones principales que son el intestino anterior, medio y distal cada una de ellas cumple con funciones específicas. Tomado y modificado de Moran y Engel 2013 (6).

Asociadas al intestino de los insectos se han identificado bacterias de las clases Gamma Proteobacteria, Alfa Proteobacteria, Beta Proteobacteria, Bacteroidetes, Firmicutes y Actinobacteria entre otras.

La microbiota intestinal de los insectos puede variar en composición, localización y función. En una abeja adulta por ejemplo se encuentran 10^9 bacterias mientras que en un saltamontes adulto 10^6 y en la mosca *Drosophila melanogaster* se han reportado alrededor de 10^5 células bacterianas (6).

Las bacterias intestinales se adquieren generalmente mediante su ingesta a través de los alimentos. En *Drosophila* spp, la dieta es el factor que más influye en la composición bacteriana (16). Sin embargo también se propone que *Drosophila* spp y otros insectos pueden seleccionar sus bacterias intestinales. Las condiciones fisicoquímicas dentro del hospedero como lo son el pH, potenciales redox, así como la respuesta inmune pueden ser los responsables de esta selección. (6).

En un estudio realizado en mosquitos se observó que independientemente del lugar de colecta, en la mayoría de los individuos dominaban determinadas especies bacterianas. Esto indica que sí puede haber una selección de microorganismos por parte del hospedero (6).

Cabe mencionar que no todas las bacterias intestinales son adquiridas mediante la dieta, una excepción a ello es el mecanismo de transmisión de la bacteria *Ishikawaella capsulata* simbiote de una chinche (*Megacopta punctatissima*). En este insecto cuando las hembras ponen los huevecillos al mismo tiempo depositan cápsulas que albergan a las bacterias. Las ninfas al emerger se alimentan de estas cápsulas adquiriendo así los microorganismos, de esta se logra la transmisión de la bacteria a su insecto hospedero (17).

Contribución de la microbiota intestinal a su hospedero

El aporte más estudiado de las bacterias intestinales hacia sus hospederos está relacionado con la nutrición, y puede ir simplemente del uso *per se* de las bacterias que al ser digeridas en el intestino proveerán de nutrientes adicionales a su hospedero hasta interacciones más complejas en donde las bacterias participan en la degradación enzimática de polímeros como la celulosa o la pectina, lo que favorece en el insecto, un mejor aprovechamiento de estas moléculas (18).

En las abejas de la especie *Apis mellifera* por ejemplo, se identificaron mediante un enfoque metagenómico genes bacterianos codificantes para enzimas relacionadas con la degradación de pectina y el transporte de carbohidratos. Los experimentos posteriores mostraron que estas enzimas son funcionales. La importancia de esta asociación radica en que en la naturaleza las abejas consumen el polen de las flores, que es un alimento rico en pectina difícil de degradar, por lo que se propuso que las bacterias intestinales con capacidad pectinolítica permiten un mejor aprovechamiento de este nutriente (19).

Las bacterias intestinales también participan en el reciclaje de compuestos nitrogenados de desecho como es el ácido úrico. Esto se demostró en la chinche *Parastrachia japonensis*, donde su simbionte que es una bacteria parecida a *Erwinia* residente del ciego gástrico contribuye enzimáticamente con la degradación del ácido úrico. Para determinar la importancia de esta interacción, se alimentó con antibiótico a un grupo de chinches y posteriormente se midieron las concentraciones de aminoácidos presentes en la hemolinfa. Los resultados mostraron que los insectos alimentados con antibiótico tenían una menor concentración en 10 aminoácidos especialmente en glutamina y prolina en comparación con insectos no alimentados. Esto sugiere una interrupción del ciclo de reciclaje del ácido úrico como consecuencia del tratamiento con antibiótico (20).

Otra cualidad que confieren las bacterias intestinales a sus hospederos es la resistencia a insecticidas. Esto se observó en la chinche *Riptortus pedestris*, que es una plaga de leguminosas. En este insecto, se pueden encontrar bacterias del género *Burkholderia*, asociadas a las criptas intestinales. Estas bacterias pueden degradar el insecticida fenitrotión, y conferir resistencia del hospedero a este insecticida (21).

Relación de las bacterias con el comportamiento

El comportamiento es una respuesta voluntaria o involuntaria de un organismo en relación con su ambiente. El dogma de la etología señala que el comportamiento animal está determinado por una compleja interacción entre la genética y el ambiente. Sin embargo, se ha propuesto que la microbiota es un tercer factor que puede modular esta respuesta.

En ratones se tiene evidencia de que existe una interacción entre la microbiota intestinal y el sistema nervioso central. En estos animales se ha observado que la ausencia de bacterias se relaciona con mayores niveles de ansiedad en comparación con ratones con una microbiota normal. Adicionalmente se ha visto que la alimentación de ratones con bacterias, en especial con *Lactobacillus rhamnosus* induce una reducción en comportamientos relacionados con la depresión y la ansiedad (22).

Otro aspecto en el que se relacionan las bacterias con el comportamiento de sus hospederos es mediante la producción de semioquímicos, que son moléculas que actúan como mensajeros y son un medio de comunicación entre los animales. En el zorro rojo (*Vulpes vulpes*) por ejemplo, las bacterias asociadas con las glándulas odoríferas producen ácidos grasos de cadenas cortas que son volátiles y actúan como semioquímicos (23). En las hienas, un estudio reveló que las bacterias presentes en las glándulas odoríferas así como el perfil de ácidos grasos difiere entre especies de hienas, así como entre sexo y estado reproductivo (24).

La importancia de las señales químicas y su papel en la comunicación radica en que éstas pueden dar información clave sobre las relaciones sociales y de parentesco entre los animales. Lo que puede influir en el comportamiento del hospedero (23).

Importancia de las bacterias en la selección sexual

Se han realizado pocos estudios sobre la importancia de las bacterias en la selección sexual, pero existe evidencia de que estos microorganismos están involucrados en la producción o modificación de algunos caracteres sexuales secundarios de sus hospederos (23). La selección sexual se refiere a las ventajas que tienen ciertos individuos sobre otros en relación exclusiva con la reproducción e implica una lucha únicamente por la posesión de individuos del sexo opuesto. La selección sexual tiene dos variantes que son la competencia directa entre machos por el acceso a las hembras y la elección femenina (25).

El efecto de las bacterias sobre la elección femenina se ha reportado en aves. En estos animales se han identificado bacterias keratinolíticas asociadas al plumaje que pueden degradar plumas. En los pinzones macho (*Carpodacus mexicanus*) se observó que la coloración del plumaje se ve alterada por la presencia de este tipo de bacterias, ya que en los pinzones con un plumaje opaco se encontró un mayor número de estas bacterias comparado con machos de plumajes brillantes. Sin embargo este hecho parece depender de la especie de ave sobre la que se encuentren las bacterias ya que en otro estudio se determinó que la presencia de bacterias degradadoras de plumas se relaciona con una mayor coloración (23).

A pesar de que no se entienden completamente los resultados anteriores, ellos representan un ejemplo de que en aves la presencia de cierto tipo bacterias puede comprometer el éxito reproductivo de los machos, ya que generalmente los que presentan plumajes brillantes son los elegidos por las hembras para copular (23).

En la mosca *D. melanogaster* se observó que la preferencia de la cópula depende de la presencia de *Lactobacillus plantarum* ya que las moscas con una proporción igual de esta bacteria prefieren copular entre ellas comparado con las moscas que tienen una proporción menor. Lo interesante de este trabajo es que la variación de *L. plantarum* se originó como consecuencia de un cambio en la dieta de las moscas y se presentó desde la primera generación.

Estudios posteriores demostraron que hay una diferencia en la proporción de hidrocarburos cuticulares entre los dos grupos de moscas y se ha visto que estos compuestos participan en la atracción de pareja (26).

Importancia de las bacterias en la adecuación

El término adecuación, “fitness” (en inglés), aptitud o eficiencia biológica es un concepto de la teoría evolutiva y se refiere estrictamente a la proporción relativa de descendientes con los que contribuye un individuo a la siguiente generación. Aunque algunos otros parámetros como son la supervivencia de los individuos a la edad reproductiva o el número de copulas obtenidas también son utilizados para medir la adecuación (25).

Sobre la contribución de las bacterias en la adecuación de sus hospederos se tienen pocos reportes, uno de ellos proviene de la mosquita blanca. En este insecto la presencia de una *Rickettsia* sp. indujo una mayor supervivencia de los padres y una mayor descendencia (27). En otro trabajo realizado en el áfido del chícharo *Acyrtosiphon pisum*, se observó que los insectos que se asocian con la bacteria *Rickettsiella* sp, presentan una coloración verde a diferencia de la coloración normal que es roja. Resultados preliminares mostraron que el cambio de coloración se debe a una mayor producción de determinados pigmentos, pero que también depende del genotipo del insecto.

La importancia ecológica del cambio de coloración se relaciona con un menor riesgo de depredación ya que se ha visto que los áfidos rojos sobre vegetación verde tienden a ser más depredados. Al ser únicamente los sobrevivientes los que pueden dejar descendencia, la presencia de *Rickettsiella* sp. estaría contribuyendo en la adecuación de su hospedero (28).

ANTECEDENTES

Mosca mexicana de la fruta

El modelo de estudio en este proyecto es la mosca *Anastrepha ludens* comúnmente conocida como mosca mexicana de la fruta. Este insecto pertenece a la familia Tephritidae y es considerado una plaga agrícola debido a los daños que ocasiona a las frutas.

Los adultos de *A. ludens* morfológicamente son de color café-amarillo, presentan una franja delgada clara en el tórax que se va ensanchando hacia la parte posterior y dos franjas más a los lados, las alas presentan bandas de color café amarillento palido y las hembras tienen un aparato ovipositor (29).

Ciclo de vida

En *A. ludens*, las hembras ponen grupos de cinco o seis huevos mediante su aparato ovipositor dentro de una fruta hospedera que puede ser naranja, toronja, mandarina, mango, zapote, guayaba entre otras (**Figura 2**). Tres días después, las larvas emergen del huevo y se alimentan de la pulpa de la fruta hasta haber completado su desarrollo que coincide con la caída del fruto al suelo. En este sustrato las larvas se entierran unos centímetros para continuar con el estadio de pupa de donde finalmente emerge el adulto, que puede vivir de 15 días hasta 11 meses, dependiendo de las condiciones ambientales y nutricionales a las que se enfrente.



Figura 2. Hembra de *A. ludens* (izquierda), se señala el aparato ovipositor. Macho de *A. ludens* (derecha), se aprecian las bandas amarillo claro sobre el tórax (44).

En las diferentes etapas de su ciclo de vida las moscas se enfrenta contra depredadores, siendo para las larvas las hormigas y las avispas parasitoides, mientras que para los adultos son las aves y las arañas (29,30).

Comportamiento sexual de *A. ludens*

El comportamiento sexual de *A. ludens* es de tipo "lek" que consiste en la agrupación de varios machos en un lugar específico. En esta área, cada uno de los machos según su capacidad defiende un pequeño territorio de sus competidores, además de que se exhibe a las hembras que son finalmente las que deciden con qué macho copular (25). En los animales que tienen este sistema de apareamiento el macho no aporta ningún tipo de cuidado parental, por lo que el único recurso que obtienen las hembras son los gametos.

Dentro de un "lek" hay una jerarquía que se ha determinado a partir de las observaciones realizadas en otras especies de insectos y vertebrados. En ella los machos más aptos se sitúan en la parte central, mientras que el resto se va alejando a los extremos que es donde se encuentran los machos menos exitosos (25).

En algunas especies de moscas de la fruta se ha observado que la capacidad de los machos por obtener cópulas se ve afectada además del lugar que ocupan dentro del "lek" por algunos caracteres morfométricos (31). En *A. fraterculus*, la longitud del ojo resultó tener relación con el éxito de los machos en comparación con otros caracteres como longitud del tórax, de la tibia y del fémur. En la mosca del Mediterráneo *C. capitata* la longitud del ojo también es un carácter que influye en la elección femenina así como el ancho de la cabeza, la longitud del tórax y del ala (32).

Relaciones simbióticas en Tefrítidos

El primer reporte publicado de la asociación de una bacteria con un tefrítido fue en 1909 cuando Petri, mediante observaciones microscópicas describió la presencia de *Pseudomona savastanoi* en la mosca del olivo *Dacus oleae*. A partir de entonces diferentes especies de bacterias asociadas a moscas fueron reportadas esporádicamente. En esta época, los estudios microbiológicos se basaban en identificación taxonómica fenotípica, por lo que algunas bacterias no fueron identificadas correctamente. Tal fue el caso de *P. savastanoi* que posteriormente se identificó como *Erwinia dacicola*. En otras investigaciones se reportó la presencia de *Enterobacter* spp. y *Klebsiella* spp. en sitios de ovoposición y en moscas de diferentes especies y localidades, por lo que se propuso que ellas podrían tener un papel importante durante el ciclo de vida de sus hospederos (33).

Papel de las bacterias asociadas a moscas de la fruta

A principios de 1970, junto con las primeras identificaciones de las bacterias asociadas a los tefrítidos también se propusieron posibles funciones que pudieran desempeñar estos microorganismos en sus hospederos. Inicialmente se pensó que las bacterias únicamente contribuían como fuentes adicionales de nutrientes en especial de nitrógeno, ya que sus biomoléculas podrían ser reutilizadas al ser digeridas en el intestino (33). Posteriormente, en la mosca del Mediterráneo *C. capitata* que también pertenece a la familia Tephritidae se identificaron bacterias con la capacidad de fijar nitrógeno *in vivo*, lo que únicamente se había reportado en termitas (34) y también se aislaron bacterias con capacidad pectinolítica (35).

En *C. capitata* se ha investigado la importancia de las bacterias en el comportamiento sexual de su hospedero. En un experimento, se administró antibiótico a los machos y posteriormente se evaluó su capacidad para obtener cópulas. Los resultados obtenidos mostraron que los machos alimentados con antibiótico tardaban más iniciar la copula (36).

Actualmente, la investigación sobre la influencia de las bacterias en la selección sexual y en otros aspectos del comportamiento representa una nueva área de estudio dentro de la ecología microbiana que puede ofrecer resultados interesantes.

Transmisión de las bacterias asociadas a moscas de la fruta

El mecanismo general para explicar la transmisión de las bacterias en las moscas de la fruta se basa en las observaciones realizadas por el entomólogo Edward A. Steinhaus en 1949 en la mosca *Bactrocera oleae* (**Figura 3**). En este insecto, los huevos se cubren superficialmente por bacterias cuando pasan a través del ovipositor de la hembra (**e1-a**). Posteriormente estos microorganismos entran al huevo a través de un orificio denominado micrópilo e “infectan” el embrión (**b,b1**). Conforme ocurre el desarrollo de la larva y durante su alimentación dentro de la fruta hospedera, las bacterias se localizan en los ciegos intestinales (**c**). Finalmente cuando el adulto emerge de la pupa las bacterias se localizan dentro del bulbo faríngeo (**d**) que es una estructura localizada en la cabeza, a partir de aquí las bacterias migran al resto del intestino (37).

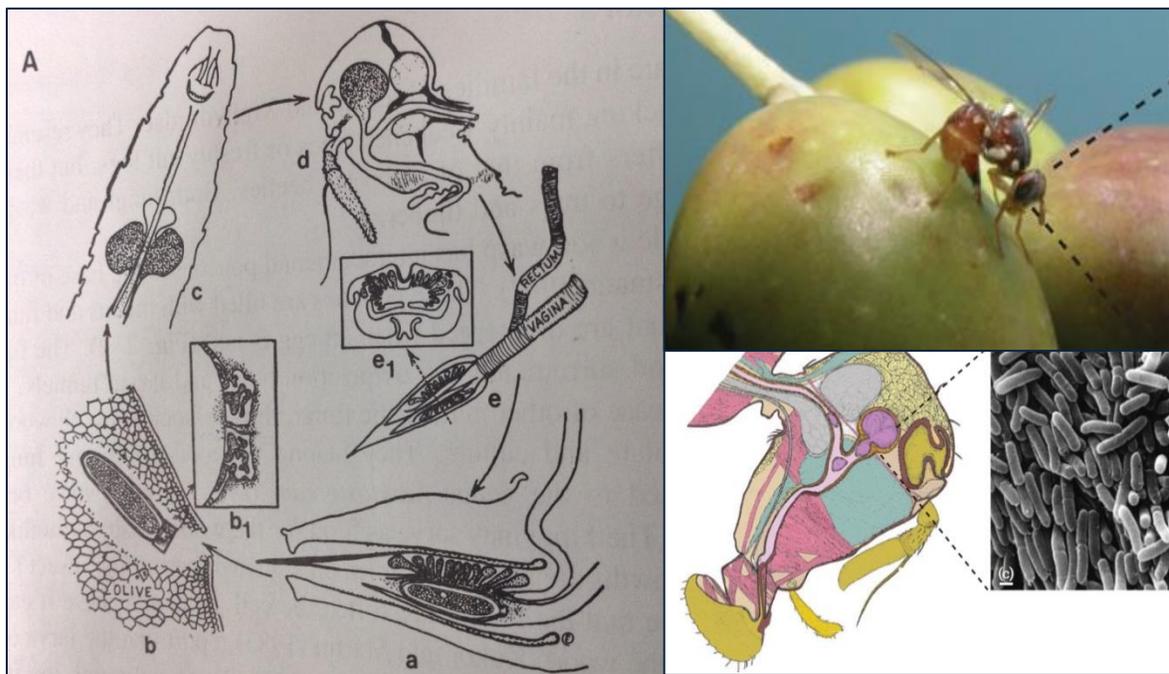


Figura 3. Mecanismo de transmisión de las bacterias asociadas a la mosca del olivo *B. oleae*. En la parte derecha se observan la imagen de una mosca ovipositando dentro de una fruta hospedera y de la localización del bulbo esofágico, que alberga bacterias en los adultos. En la parte izquierda está representado el ciclo de transmisión de las bacterias en *B. oleae* (37,38).

Bacterias asociadas con *A. ludens*

En la mosca mexicana de la fruta mediante el uso de metodologías dependientes e independientes de cultivo e identificación de bacterias con técnicas bioquímicas y moleculares, se ha reportado la presencia de diferentes bacterias (39-41). Estos resultados se resumen a continuación.

Tabla 1. Bacterias identificadas en diferentes órganos de *A. ludens*

Origen	Bacteria	Identificación	Referencia
Intestino + buche	<i>Klebsiella oxytoca</i>	Bioquímica	Martínez <i>et al.</i> , 1994.
	<i>Citrobacter freundii</i>		
	<i>Proteus vulgaris</i>		
Buche	<i>Enterobacter</i> sp.	Bioquímica	Martínez <i>et al.</i> , 1994.
	<i>Pseudomonas</i> sp.		
	<i>P. aeruginosa</i>		
Intestino	<i>K. pneumoniae</i>	Bioquímica	Martínez <i>et al.</i> , 1994.
Fruta	<i>C. freundii</i>	Bioquímica	Martínez <i>et al.</i> , 1994.
Intestino	<i>E. cloacae</i>	Bioquímica	Kuzina <i>et al.</i> , 2001.
	<i>Providencia</i> spp.		
	<i>E. sakazakii</i>		
	<i>K. pneumoniae</i>		
	<i>P. aeruginosa</i>		
	<i>C. koseri</i>		
	<i>Bacillus cereus</i>		
	<i>Aeromonas hydrophila</i>		
	<i>Enterococcus faecalis</i>		
	<i>Staphylococcus aureus</i>		
<i>S. carnosus</i>			
<i>S. xylosum</i>			
Ovario	<i>Klebsiella</i> sp.	Molecular	Martínez <i>et al.</i> , 2012.
	<i>Kluyvera ascorbata</i>		

Función de las bacterias asociadas con *A. ludens*

Hasta la fecha no se tiene algún reporte sobre las posibles funciones que pudieran tener las bacterias asociadas a la mosca mexicana de la fruta, sin embargo algunos experimentos realizados en los 90's mostraron que los sobrenadantes provenientes del cultivo de bacterias aisladas de *A. ludens* tienen un efecto de atracción hacia las moscas. Algunas bacterias cuyos sobrenadantes fueron atractivos son *K. pneumonie*, *C. freundii*, *Pseudomonas* sp. y *Acinetobacter calcoaceticus* (41). Posteriormente algunos de estos compuestos atractivos se identificaron como trimetilamina, 2-metilbutanamida, ciclohexilamina y amonio entre otros (42).

HIPOTESIS

Las bacterias asociadas a la mosca mexicana de la fruta, *A. ludens* contribuyen a un mejor aprovechamiento de los nutrientes y tienen un efecto positivo en la elección femenina.

OBJETIVO GENERAL

Identificar las bacterias asociadas a los diferentes estadios de *A. ludens* y determinar su contribución en el aprovechamiento de los nutrientes y la elección femenina.

OBJETIVOS PARTICULARES

1. Aislar e identificar las bacterias asociadas a huevo, larva pupa y adulto de *A. ludens* por un enfoque dependiente de cultivo.
2. Determinar la capacidad uricolítica, pectinolítica y de fijación de nitrógeno de los diferentes aislados bacterianos.
3. Evaluar la preferencia sexual de la hembra hacia machos alimentados con antibiótico.

MATERIALES Y METODOS

La identificación de las bacterias asociadas con la mosca mexicana de la fruta (*A. ludens*) así como la caracterización de ellas se llevó a cabo en el laboratorio del Programa de Ecología Genómica del Centro de Ciencias Genómicas de la UNAM siguiendo principalmente una metodología dependiente de cultivo.

Insectos

Las moscas utilizadas en esta investigación fueron proporcionadas como pupas en julio del 2012 por la Dra. Silvia Cristina Zepeda Cisneros investigadora de Moscafrut (Tapachula, Chiapas). A partir de ellas se estableció una colonia en el laboratorio que se mantuvo en cajas de madera de 20 x 20 x 20 cm³, en condiciones de luz-oscuridad de 13 y 11 horas respectivamente, temperatura 26-27°C y humedad relativa del 60%.

Las moscas silvestres fueron obtenidas mediante una colecta de mangos y naranjas infestadas en los municipios de Tlaltizapán (18° 40' 39.2" N 99° 06' 55." W) y Tetela del Volcán (18° 52' 04" N 98° 44' 58.4" W), ambos municipios pertenecientes al estado de Morelos.

Los frutos infestados con larvas se llevaron al laboratorio y se colocaron sobre vermiculita. Días después se buscaron las pupas y se esperó a que emergieran los adultos, que posteriormente se colocaron en cajas de madera de 20 x 20 x 20 cm³.

El análisis de las moscas silvestres se realizó entre el primer y segundo día de emergencia. Debido a que estas moscas presentan un comportamiento de ovoposición diferente al de las moscas de Tapachula, no se pudo establecer una colonia a partir de ellas.

Alimentación

El alimento para las larvas y moscas adultas lo proporcionó la planta MOSCAFRUT. La dieta de larvas está compuesta de harina de olote 20%, azúcar 9%, levadura 7%, harina de maíz 5.3%, ácido cítrico 0.44%, benzoato de sodio 0.4%, p-hidroxibenzoato de metilo 0.2%, goma guar 0.1% y agua 57.56%. Mientas que la de los adultos es una mezcla de sacarosa y proteína en una relación 3:1.

La bebida consistió en agua de garrafón estéril que se colocó en un recipiente de vidrio de 35 ml al que en la parte superior se le insertó una tira de papel filtro, esto para facilitarles a las moscas la ingesta de agua. Tanto el agua como el alimento se proporcionaron *ad libitum* y se cambiaron regularmente (tres a cuatro veces por semana) para evitar la proliferación de bacterias.

Desinfección del huevo, la larva, la pupa y los adultos

La desinfección de los diferentes estadios de las moscas se realizó mediante tres lavados de aproximadamente un minuto con 1 ml de etanol al 70%, y un lavado final con 1 ml de solución de cloruro de sodio al 0.85% estéril.

Obtención de huevo silvestre

Para promover la ovoposición de las hembras silvestres se elaboraron mangos y naranjas artificiales a base de cera. Los frutos artificiales se colocaron dentro de las jaulas que contenían las moscas silvestres y se revisaron tres veces al día en busca de huevo. Cuando se observó la presencia de huevecillos, ellos se tomaron con ayuda de un pincel y se colocaron sobre un papel filtro húmedo.

Disección de moscas

Los intestinos y otros órganos de interés se disecaron en solución salina con ayuda de un microscopio estereoscópico y pinzas de disección, todo ello bajo una campana de flujo laminar para evitar contaminaciones.

Obtención de bacterias y medios de cultivo

Los estadios de huevo, larva 1, larva 3, pupa y adulto previamente desinfectados fueron macerados con ayuda de un pistilo y sembrados en 50 ml de medio líquido de interés.

Como control se sembraron 100 µl de solución salina proveniente del último paso de desinfección. Los medios utilizados para el cultivo de las bacterias fueron PYG (peptona 5 g/l, extracto de levadura 3 g/l, glucosa 10 g/l), medio caldo nutritivo Difco™ (extracto de carne y peptona), extracto de malta y agar dextrosa y papa. Estos medios de cultivo han sido utilizados en otros trabajos para el aislamiento de microorganismos de moscas de la fruta.

Además de sembrar directamente en medios líquidos también se inocularon medios sólidos, y en dos ocasiones se mantuvieron condiciones de anaerobiosis y micro anaerobiosis para el aislamiento de bacterias usando el sistema de bolsas BD GasPak™ EZ

Aislamiento de colonias

Se realizaron diluciones seriadas partiendo de los medios líquidos, para ello se colocaron y extendieron con ayuda de perlas de vidrio 100 µl de cada dilución sobre medio sólido. Las cajas sembradas se incubaron a 28°C por cuatro a cinco días. A las colonias resultantes se les asignó un nombre de acuerdo a su origen, se preservaron en glicerol al 30% y guardaron a -70°C

Tinción de Gram

Antes de realizar la extracción de ADN de las bacterias y con la finalidad de confirmar que se partía de un aislado puro, se realizaron tinciones de Gram. Para llevar a cabo la tinción, se colocó una muestra de cultivo en un porta objetos y se fijó con calor. Posteriormente el porta objeto se cubrió con cristal violeta durante un minuto y se enjuagó con agua. En seguida se agregó lugol por un minuto y se enjuagó. Después se realizó un lavado con alcohol-acetona y finalmente se agregó safranina por un minuto y se lavó con agua. Las tinciones fueron observadas con un objetivo de 100 X en un microscopio óptico Leika DFC295.

Determinación de las capacidades uricolítica y pectinolítica de los aislados

La capacidad uricolítica de las bacterias se determinó al observar si producían un halo de degradación al ser sembradas en un medio compuesto de peptona 0.5%, extracto de levadura 0.3%, ácido úrico 0.7% y agar 2%.

Para determinar la actividad pectinolítica, las bacterias se sembraron en un medio compuesto de pectina (8 g/l), NH₄Cl (0.625 g/l), KH₂PO₄ (0.375 g/l), extracto de levadura (1 g/l), Na₂CO₃ (0.375 g/l), NaCl (0.250 g/l), MgSO₄ (0.275 g/l) y agar 2%. El pH se ajustó a 7 con hidróxido de sodio.

Para revelar la actividad enzimática se agregaron 2 ml de lugol sobre el cultivo. Las bacterias con capacidad pectinolítica se distinguen por la producción de un halo color claro respecto a un fondo oscuro.

Ensayo de reducción de acetileno

El ensayo de reducción de acetileno nos permite evaluar la fijación de nitrógeno, ya que la enzima nitrogenasa que es la responsable de reducir el triple enlace del nitrógeno molecular (N_2), también es capaz de reducir el triple enlace del acetileno para producir etileno y este último puede ser detectado mediante un cromatógrafo de gases.

Para realizar este ensayo, se preparó un medio compuesto de $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$ (2.2 g/l), NaH_2PO_4 (0.425 g/l), $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ (0.4375 g/l), sacarosa 20% (5 ml/l), trazas de Fahraeus (1 ml/l), que está compuesto de H_3BO_3 (2.8 g/l), $MnSO_4 \cdot 4H_2O$ (2.03 g/l), $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ (220 mg/l), $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ (80 mg/l), $H_2MoO_4 \cdot H_2O$ (80 mg/l), finalmente se adiciono agar (2.2 g/l) y 5 ml de este medio se colocaron en viales de 10 ml y se esterilizaron.

Las bacterias de interés se inocularon en los viales con medio estéril, se sellaron con un tapón de hule y se dejaron crecer por al menos 12 horas. Posteriormente se retiró 1 ml de aire de cada uno de los viales con una jeringa de insulina y se reemplazó por 1 ml de etileno. Este gas fue producido al disolver carburo de calcio en agua. Pasadas 12 horas de la inoculación de etileno, las muestras se analizaron en un cromatógrafo de gases (Varian 3300) inyectado 400 μ l de gas proveniente de cada vial.

Extracción de ADN

La mayoría de las extracciones se realizaron con el kit “DNA Isolation kit for Cells and Tissues” de Roche. Sin embargo para todas las levaduras y algunas bacterias Gram positivas, la extracción se hizo con la técnica modificada de Hoffman de fenol caliente (43). El ADN bacteriano obtenido se separó en un gel de agarosa al 1% a 90 Volts por 40 minutos y se tiñó con bromuro de etidio.

Huella molecular de los aislados bacterianos

Para diferenciar entre los diferentes aislados obtenidos de la mosca mexicana de la fruta y con la intención de no trabajar con aislados iguales, se amplificaron las secuencias polimórficas utilizando los oligonucleótidos BOX.

Esta técnica consiste en utilizar iniciadores que se unen a secuencias repetidas de ADN presentes en la mayoría de los genomas bacterianos. La amplificación de estas regiones nos proporciona un patrón de bandas (huella molecular) característico para cada bacteria, lo que nos permite diferenciar los aislados.

El iniciador utilizado para esta PCR fue el BOX-AIR (CTACGGCAAGGCGACGCTGACG). Las condiciones de esta PCR se muestran en la **Tabla 2**. Los amplicones resultantes fueron separados en un gel de agarosa al 1.5% durante 2.5 horas a 60 Volts. El gel fue teñido con bromuro de etidio.

Tabla 2. Condiciones del BOX-PCR

Reactivos	Volumen
Agua	5.97µl
DNA	1 µl
Amortiguador 10x	1.5 µl
Primer box-air (10 pM)	0.66 µl
DNTPs (10 mM)	1.88 µl
MgCl ₂ (50 mM)	2.25 µl
DMSO	1.5 µl
Taq Polimerasa (5 U/µl)	0.24 µl

Condiciones	Temperatura	Tiempo	Ciclos
Desnaturalización inicial	95°C	3 minutos	1
Desnaturalización	93°C	45 segundos	30
Alineamiento	50 °C	1 minuto	30
Extensión	65°C	1 minuto	30
Extensión final	65°C	16 minutos	1

Amplificación del gen 16S rARN

Para amplificar este gen se utilizaron dos diferentes pares de iniciadores universales para eubacterias. El primer par fue el F8 (GCGGATCCGCGGCCGCTGCAGAGTTTGATCCTGGCTCAG) y R1492 (GGCTCGAGCGGCCGCCGGTTACCTTGTTACGACTT). El segundo fue el FD1 (AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG) y RD1 (AAG GAG GTG ATC CAG CC). De los dos pares de iniciadores utilizados, con el último se obtuvieron mejores resultados. Los amplicones obtenidos de ambas reacciones fueron de aproximadamente 1.5 Kb, estos se visualizaron en un gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio y se purificaron con el kit “High Pure PCR Product Purification” de Qiagen. Finalmente las muestras se enviaron a la empresa MACROGEN (Seúl, Corea) para su secuenciación.

Las condiciones de la PCR se presentan en la **Tabla 3**.

Tabla 3. Condiciones para la amplificación del gen 16S rARN

Reactivos	Volumen	Condiciones	Temperatura	Tiempo (min)	Ciclos
Agua	15.3 µl	Desnaturalización inicial	94°C	5	1
Amortiguador 10x	2.5 µl	Desnaturalización	94°C	1	35
Primer F (10 pM)	1 µl	Alineamiento	57°C	1	35
Primer R (10pM)	1 µl	Extensión	72°C	2	35
DNTPs (10 mM)	1 µl	Extensión final	72°C	7	1
MgCl ₂ (50 mM)	1 µl				
DNA	3 µl				
Taq Polimerasa (5 U/µl)	0.2 µl				

Identificación de las moscas silvestres

La identidad de las moscas silvestres colectadas en los municipios de Tlaltzapán y Tetela del Volcán se determinó mediante el uso de una guía taxonómica para la identificación de moscas de la fruta publicada por el Servicio de Sanidad Inocuidad y Calidad Agroalimentaria (44). Sin embargo para estar completamente seguros de esta identificación, también se amplificó una región del gen que codifica para la proteína citocromo oxidasa (COI), con los oligonucleótidos F (TGATTTTCGGACACCCAGAAGT) y R (GTTGGGTATCGTCGAGGTATTCC).

Los reactivos utilizados para esta PCR son los mencionados en la **Tabla 3** y el programa de reacción utilizado es el que se muestra en la **Tabla 4**. El amplicón resultante fue de aproximadamente 600 pb y fue visualizado en un gel agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio. Las condiciones de electroforesis fueron 90 Volts por 40 minutos

Tabla 4. Condiciones para la amplificación de una región que codifica para la proteína citocromo oxidasa (COI)

Condiciones	Temperatura	Tiempo (min)	Ciclos
Desnaturalización inicial	94°C	5	1
Desnaturalización	94°C	1	35
Alineamiento	45 °C	1	35
Extensión	72°C	1.5	35
Extensión final	72°C	7	1

Análisis de las secuencias

Se utilizaron los programas Bioedit (45) y Seaview (46) para la visualización y corrección de las secuencias, mientras que el alineamiento se llevó a cabo en el programa Clustal X 2.1 (47). Para la obtención del mejor modelo de sustitución nucleotídica se utilizó el programa Jmodel test (48). Los análisis de máxima verosimilitud se realizaron utilizando el software PhyML (49).

Para la determinación de las unidades taxonómicas operativas y el porcentaje de similitud entre las secuencias obtenidas respecto a las de referencias depositadas en la base de datos NCBI, se utilizaron las herramientas que incluye el programa Mothur (50). El punto de corte en la determinación de los OTU's fue de 98%.

Análisis filogenético.

Una filogenia representa la historia evolutiva de un grupo de organismos y generalmente se representa en forma de un árbol filogenético. Para iniciar una reconstrucción filogenética se necesita de caracteres, estos pueden ser morfológicos o moleculares (nucleótidos o aminoácidos) posteriormente, estos datos deben ser analizados. Para ello se han desarrollado diferentes métodos. De manera general, estos métodos varían en el tiempo de cómputo requerido así como el rigor del análisis.

La verosimilitud es un método de análisis y se basa en la probabilidad de que los datos se ajusten a una topología en base a un modelo de sustitución. Estos modelos miden dos parámetros que son la frecuencia de cada nucleótido y el tipo de sustituciones (transiciones y transversiones). En base a combinaciones de estos parámetros se han descrito 203 modelos de sustitución. El modelo GTR (General Time-Reversible) es uno de ellos, este asume seis tipos de sustituciones y diferente frecuencia de bases (51)

Antibiogramas

Los antibióticos evaluados fueron kanamicina, estreptomina, carbenicilina, tetraciclina, rifampicina y piperaciclina a concentraciones de 50, 75, 100 y 150 µg/ml cada uno. Estos antibióticos se probaron de manera independiente y en combinaciones.

El efecto de los antibióticos se evaluó sobre algunos aislados provenientes de machos de *A. ludens*. Para ello se sembró un tapete de bacterias sobre medio sólido y posteriormente se colocaron círculos de papel filtro empapados con cada uno de los antibióticos a evaluar; pasadas 24 horas se observó el halo de inhibición producido por cada antibiótico.

Los antibióticos que produjeron un mayor halo de inhibición fueron seleccionados para las pruebas posteriores.

Ensayos de inhibición bacteriana

Con ayuda de un hisopo estéril se extendió un volumen de bacterias proveniente de un cultivo líquido sobre un medio sólido, con el objetivo de formar un tapete bacteriano. Posteriormente sobre este tapete se inocularon las bacterias que se sospechaba pudieran inhibir el crecimiento de la especie formadora del tapete. Las cajas de cultivo se incubaron a 28°C por 24-48 horas. Pasado este tiempo se observó si alguna de las bacterias evaluadas inhibía el crecimiento del tapete bacteriano.

Determinación de ácido úrico en los insectos

Se realizó mediante el kit de Invitrogen "Amplex Red". Este ensayo permite la detección de ácido úrico mediante una reacción en la que interviene la enzima uricasa, ella convierte el ácido úrico en alantoína, dióxido de carbono y peróxido de hidrogeno, este último reacciona con una peroxidasa de rábano y un reactivo del kit, lo que genera un compuesto fluorescente (resurfirina) que puede ser cuantificado mediante un espectrofotómetro.

Alimentación de los machos con antibiótico

A partir del primer día de emergencia las moscas adultas fueron separadas por sexo y colocadas en cajas independientes. En total se manejaron tres grupos: 1) hembras, 2) machos control y 3) machos alimentados con antibiótico. A este último grupo se le administraron los antibióticos, estos fueron adicionados al agua y se reemplazaron cada 24 horas para prevenir la contaminación por microorganismos. El tratamiento con antibióticos tuvo una duración de 12-14 días. A los machos control no se les administro antibiótico

Eficacia del tratamiento con antibiótico

La eficacia de la alimentación con antibiótico se evaluó contando el número de unidades formadoras de colonia (UFC) presentes en los machos alimentados o no con antibiótico. El conteo se llevó a cabo a los 12 días post tratamiento y para ello se tomaron 24 machos de cada condición y se homogenizaron grupos de cuatro en solución salina de manera mecánica con ayuda de un pistilo. A partir del homogenizado se hicieron diluciones seriadas que se sembraron en caldo nutritivo sólido. Las cajas se incubaron a 28°C y después de 24-48 horas se contó el número de UFC presentes en ambos grupos.

Pruebas de elección femenina

Para evaluar si la alimentación de los machos con antibiótico tiene un efecto en la elección femenina se realizó el siguiente experimento: en una caja de plexiglás de 30 x 30 x 30 cm, se introdujeron seis machos alimentados con antibiótico, seis machos control y seis hembras vírgenes, todos ellos de entre 12 a 14 días de edad (**Figura 4**).

Para diferenciar a los machos se colocó una mancha de pintura Vinci (amarilla o azul) en el tórax de los insectos. El color de esta mancha fue intercambiado entre los dos tratamientos para evitar un efecto de preferencia debido al color. Adicionalmente en cada caja se colocaron hojas frescas de mango para simular un ambiente externo además de promover el apareamiento.

Los primeros insectos en ser liberados dentro de la caja fueron los machos y 30 minutos después las hembras, esto para permitir que ellos establecieran sus territorios.

Cuando la totalidad de los insectos se introdujeron dentro de la caja, se empezó a reportar cuál de los machos era elegido por la hembra para copular.

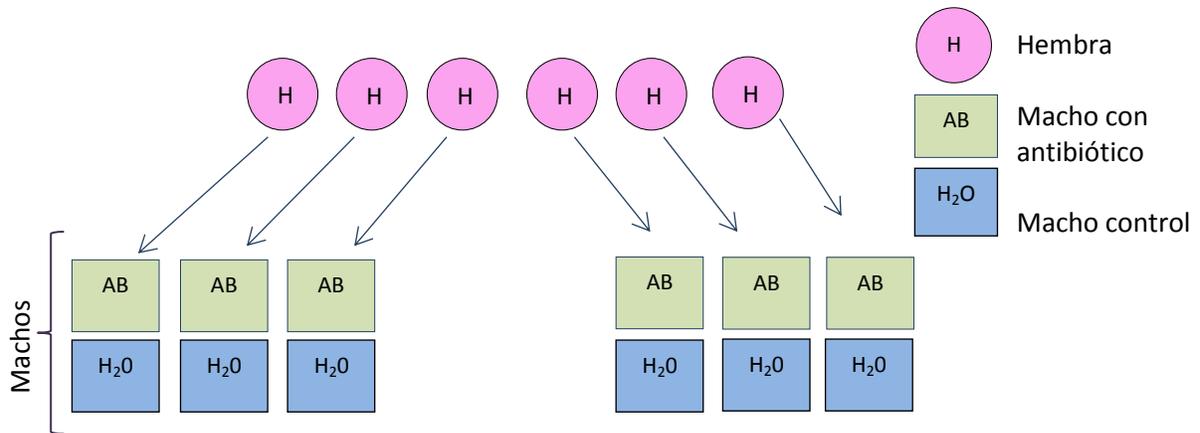


Figura 4. Diseño experimental para evaluar la preferencia de las hembras de *A. ludens* hacia machos alimentados o no con antibiótico. En cada caja se introdujeron seis hembras (H), seis machos alimentados con antibiótico (AB) y seis machos control (H₂O).

Hibridación Fluorescente *in situ* (FISH)

Esta técnica se utilizó para localizar las bacterias en los tejidos de la mosca. La técnica de FISH consiste básicamente en la hibridación de una sonda de ADN marcada con un fluoróforo y una secuencia blanco de ácido nucleico.

La sonda utilizada fue la EUB338 (GCTGCCTCCCGTAGGAGT) que está marcada con el fluoróforo CY3, su secuencia hibrida con una región complementaria del gen 16S rARN. Esta técnica fue realizada de acuerdo a como la describe Koga *et al.* (52).

Los tejidos utilizados para FISH, primeramente fueron deshidratados mediante pasos seriados en etanol de 30-100%. La fijación se hizo con Carnoy (60% etanol, 30% cloroformo y 10% ácido acético) durante 24 horas, posteriormente se lavó con etanol al 100%.

Para reducir la autofluorescencia los tejidos se dejaron en peróxido de hidrogeno (6% en etanol) por dos semanas.

Inclusión en parafina y cortes

Los tejidos previamente fijados se embebieron en parafina. Para esto primeramente se introdujeron en xileno seguido de xileno-parafina y finalmente solo en parafina. Los cortes de los tejidos (de 10 μm), se realizaron con ayuda de un micrótomo y se montaron sobre cubreobjetos recubiertos con poli L-lisina. La desparafinación de los cortes se realizó mediante lavados con xileno-etanol.

Hibridación y observación en microscopio

Los cortes obtenidos se hibridaron con la sonda EUB338 (concentración final de 100 nM) en amortiguador de hibridación (20 mM Tris-HCl [pH 8.0], 0.9M NaCl, 0.01% SDS y 30% formamida). Los cortes se dejaron hibridar toda la noche en una cámara húmeda para evitar la desecación. Al día siguiente se realizaron lavados con PBS y se agregó DAPI (2 $\mu\text{g}/\text{ml}$). Las muestras se observaron en un microscopio confocal Olympus FV 1000 con un objetivo de 40X, utilizando una N/A de 0.75. Las imágenes fueron adquiridas en tres diferentes canales, utilizaron tres canales, en el primero los valores de excitación y emisión fueron 405 y 425 \pm 5nm respectivamente, en el segundo canal de 459 y 570 \pm 55nm y en el tercero de 635 y 655-755 nm. El tamaño de las imágenes obtenidas fue de 800 X 800 pixeles, ellas se analizaron con el software ImageJ 1.4 (53).

Análisis estadístico

La totalidad de las pruebas estadísticas se realizó utilizando el programa GraphPad Prism Versión 5.01 para Windows (GraphPad Software, San Diego California USA, www.graphpad.com).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Sección I: Identificación de bacterias asociadas con *A. ludens*

En la primera sección de este trabajo se presentaran los resultados correspondientes a la identificación de las bacterias asociadas a los estadios de huevo, larva, pupa y adulto de la mosca mexicana de la fruta. Esto se realizó mediante un enfoque dependiente de cultivo e identificación molecular.

Inicialmente solo se pretendía trabajar con la población de moscas proveniente de la planta Moscafrut (Tapachula), sin embargo, debido a que estos insectos han permanecido durante muchos años en cautiverio y por lo tanto ya no están expuestos a las condiciones naturales del medio, se decidió incluir individuos silvestres, esto nos permitió hacer una comparación entre ambos grupos. Las moscas silvestres se colectaron en Tlaltizapán y Tetela del Volcán y de aquí en adelante se hará referencia a ellas de acuerdo a su lugar de origen.

Identificación de las moscas silvestres

En el estado de Morelos se ha reportado la presencia de al menos cuatro especies de moscas de la fruta (44), por ello, antes de iniciar con el aislamiento de las bacterias se determinó la especie de las moscas silvestres. Esto se llevó a cabo con el uso de una clave taxonómica para la identificación de moscas de la fruta. Los caracteres morfológicos que se tomaron en cuenta para la identificación de las moscas fueron las bandas presentes en las alas así como la coloración. Para *A. ludens*, y a diferencia de otras especies como *A. striata* que también se encuentra en el estado de Morelos, las bandas del ala no se unen completamente. Por otra parte, la coloración café amarillenta y una mancha presentes en el tórax también fueron informativos(**Figura 5**).

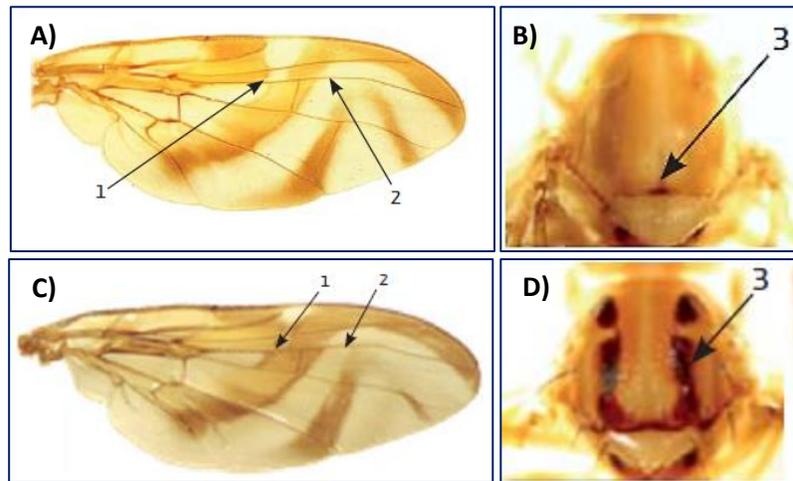


Figura 5. A) Ala de *A. ludens*, las bandas (1 y 2) no se unen completamente, mientras que en el ala de *A. striata* si se unen (B). *A. ludens* tiene una mancha presente en el tórax (C). *A. striata* presenta franjas negras (D). Imágenes tomadas de la guía de campo para la identificación de moscas de la fruta de la SAGARPA (44).

Para confirmar la identificación morfológica también se amplificó una región del gen que codifica para la proteína citocromo oxidasa I (COI). En base a las secuencias obtenidas se construyó un árbol filogenético (**Figura 6**), que nos indica que las moscas colectadas en Tlaltizapán y Tetela del Volcán, están filogenéticamente relacionadas con *A. ludens*. Sabiendo esto se empezó con la identificación de las bacterias asociadas a esta especie de mosca de la fruta.

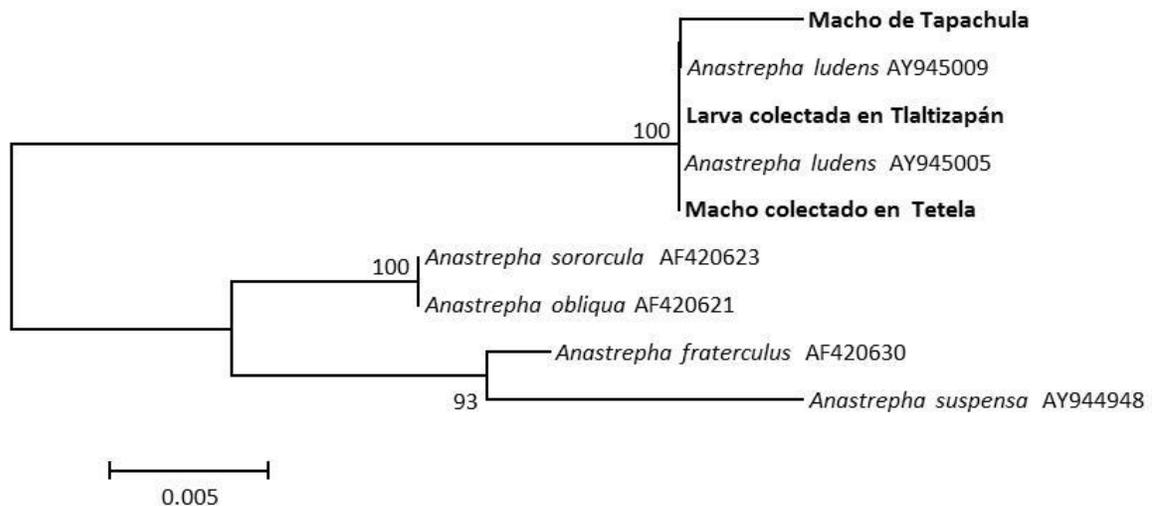


Figura 6. Árbol de máxima verosimilitud de las secuencias parciales del gen que codifica para la proteína citocromo oxidasa I. La longitud de las secuencias es de 518 pb y el modelo de sustitución utilizado es GTR

Bacterias presentes en *A. ludens*

Se aislaron e identificaron bacterias de tres poblaciones de moscas, así como de sus diferentes estadios. De la población de Tapachula, se obtuvo un mayor número de aislados, sin embargo esto no significa que estas moscas tienen más microorganismos asociados, sino que es el resultado del fácil acceso a estas moscas y por lo tanto al análisis de esa población. Esto no fue igual para las moscas de Tetela y Tlaltizapán, ya que al ser silvestres sólo se encuentran en ciertas temporadas del año (**Tabla 5**).

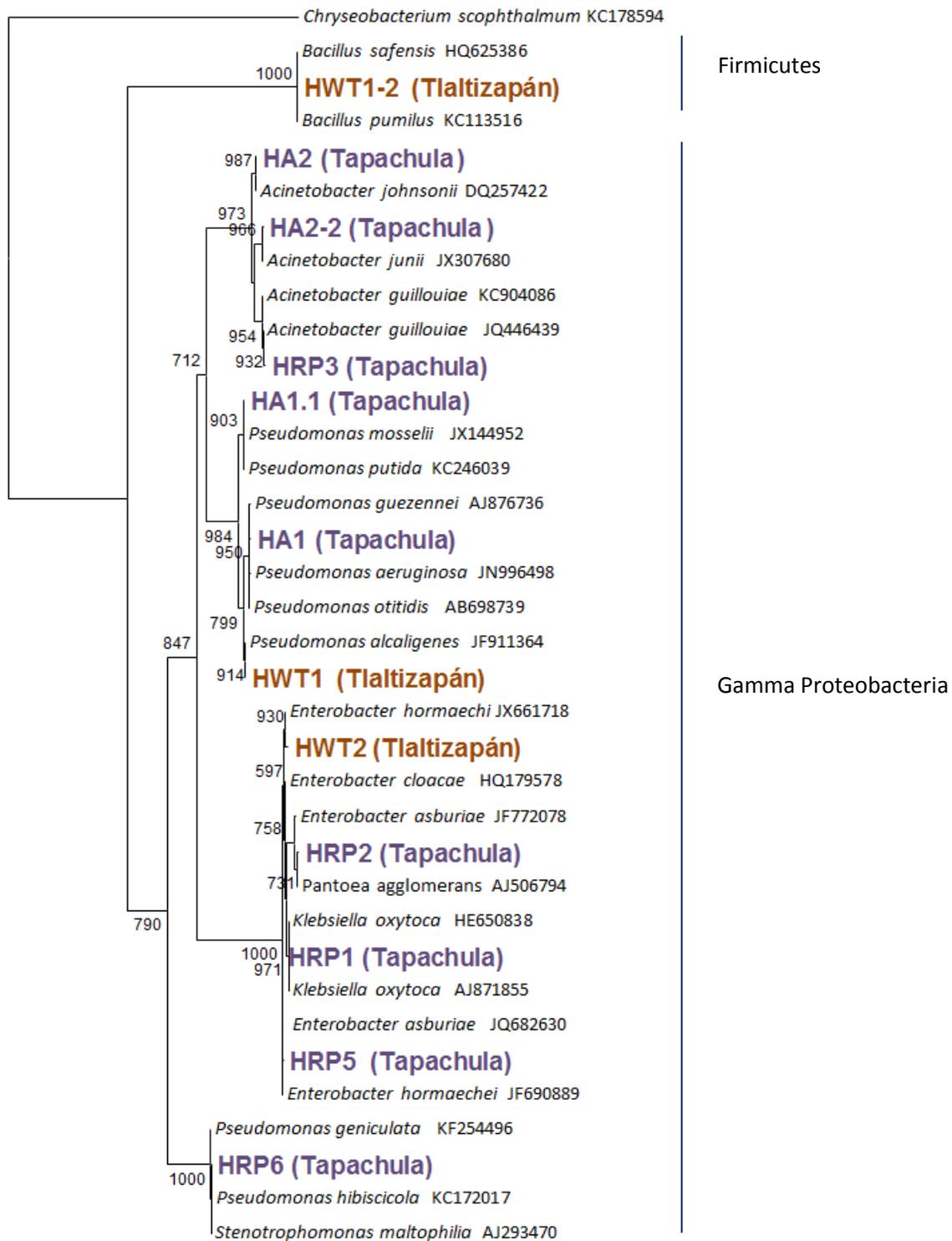
Tabla 5. Número de aislados bacterianos de acuerdo a su origen y localidad obtenidos de moscas de laboratorio y silvestres.

Población			
Estadio	Tapachula	Tlaltizapán	Tétela del Volcán
Huevo	10	6	N.C
Larva 1	11	3	NC
Larva 3	10	6	13
Pupa	19	6	N.C
Hembra (Adulto)	19	11	10
Macho (Adulto)	44	7	9
Total	113	39	32

Con la finalidad de no secuenciar el 16S rARN de todos los aislados obtenidos, primero se obtuvo su huella molecular. Al analizar estos patrones así como algunas secuencias repetidas el número total de aislados obtenidos de las tres población se redujo de 184 a 80, lo que representa el 43.5% de la totalidad inicial.

En base a las secuencias obtenidas, se realizaron los siguientes arboles filogenéticos representados por estadio.

Filogenia de bacterias aisladas de huevo de *A. ludens*



0.1

Figura 7. Árbol filogenético de máxima verosimilitud (-lnL 6545.85516) de bacterias asociadas al estadio de huevo de *A. ludens*. La barra de escala indica el 10% de divergencia bajo el modelo GTR+I+G. Secuencias de 1320 pb, la secuencia del 16S rARN de *Chryseobacterium scophthalmum* se utilizó como grupo externo.

Asociadas al estadio de huevo se identificaron bacterias de la clase Gamma Proteobacteria y Firmicutes. La primera estuvo representada por las familias Enterobacteriaceae y Pseudomonadaceae, mientras que la segunda por *Bacillus* sp que se aisló de huevecillos de Tlaltizapán (**Figura 7**).

La población de Tetela del Volcán no está presente en el árbol filogenético debido a que no se logró inducir la ovoposición de las hembras utilizando naranjas artificiales, en cambio esta metodología sí funcionó para las hembras de Tlaltizapán.

La similitud de las secuencias obtenidas, respecto a las presentes en el árbol filogenético se muestra en la **Tabla 6**.

Tabla 6. Porcentajes de similitud de la secuencia del gen 16S rARN de los aislados bacterianos provenientes de huevo de *A. ludens*, respecto a microorganismos previamente identificados.

Aislado	Relación filogenética	% similitud 16S rARN
HWT1-2	<i>Bacillus</i> sp.	100%
HA2 y HA2-2	<i>Acinetobacter</i> sp.	99%
HRP3	<i>Acinetobacter guillouiae</i>	99%
HA1-1, HA1 y HWT1	<i>Pseudomonas</i> sp.	99%
HWT2 y HRP5	<i>Enterobacter</i> sp.	99%
HRP2	<i>Pantea agglomerans</i> o <i>Enterobacter</i> sp.	99.9%, 99%
HRP1	<i>K. oxytoca</i> o <i>E. cloacae</i>	100%, 99%
HRP6	<i>S. maltophilia</i> o <i>P. hibiscola</i>	100%, 99%

Una coincidencia se presentó con los géneros *Pseudomonas* y *Enterobacter*, ya que ambos se aislaron a partir de huevo puesto hembras de Tlaltizapán y Tapachula.

Para *A. ludens* no hay un reporte con el que podamos comparar nuestros resultados, pero para *C. capitata* sí existe. En esta mosca, asociadas a huevo se identificaron bacterias de la familia Enterobacteriaceae como son *K. oxytoca*, *C. freundii*, *Pectobacterium cypripedii* y *Pantoea* spp. (35). En nuestro caso, algunas de las bacterias asociadas al huevo de las moscas de Tapachula también se relacionaron con esta familia.

El hecho de haber identificado bacterias en el estadio de huevo nos hace pensar que estas bacterias son transmitidas verticalmente, y que el mecanismo de transmisión pudiera ser similar al de la mosca del olivo (37). En este insecto, cuando los huevos pasan por el ovipositor de la hembra se impregnan de bacterias, estos microorganismos posteriormente colonizan el embrión y se mantienen presentes durante el ciclo de vida de la mosca.

Para verificar la presencia y localización de las bacterias identificadas en el estadio de huevo, se puede implementar la técnica de hibridación fluorescente *in situ* (FISH), ya que con una sonda dirigida al gen 16S rARN se podría observar la localización de los microorganismos.

Filogenia de las bacterias asociadas al estadio de larva

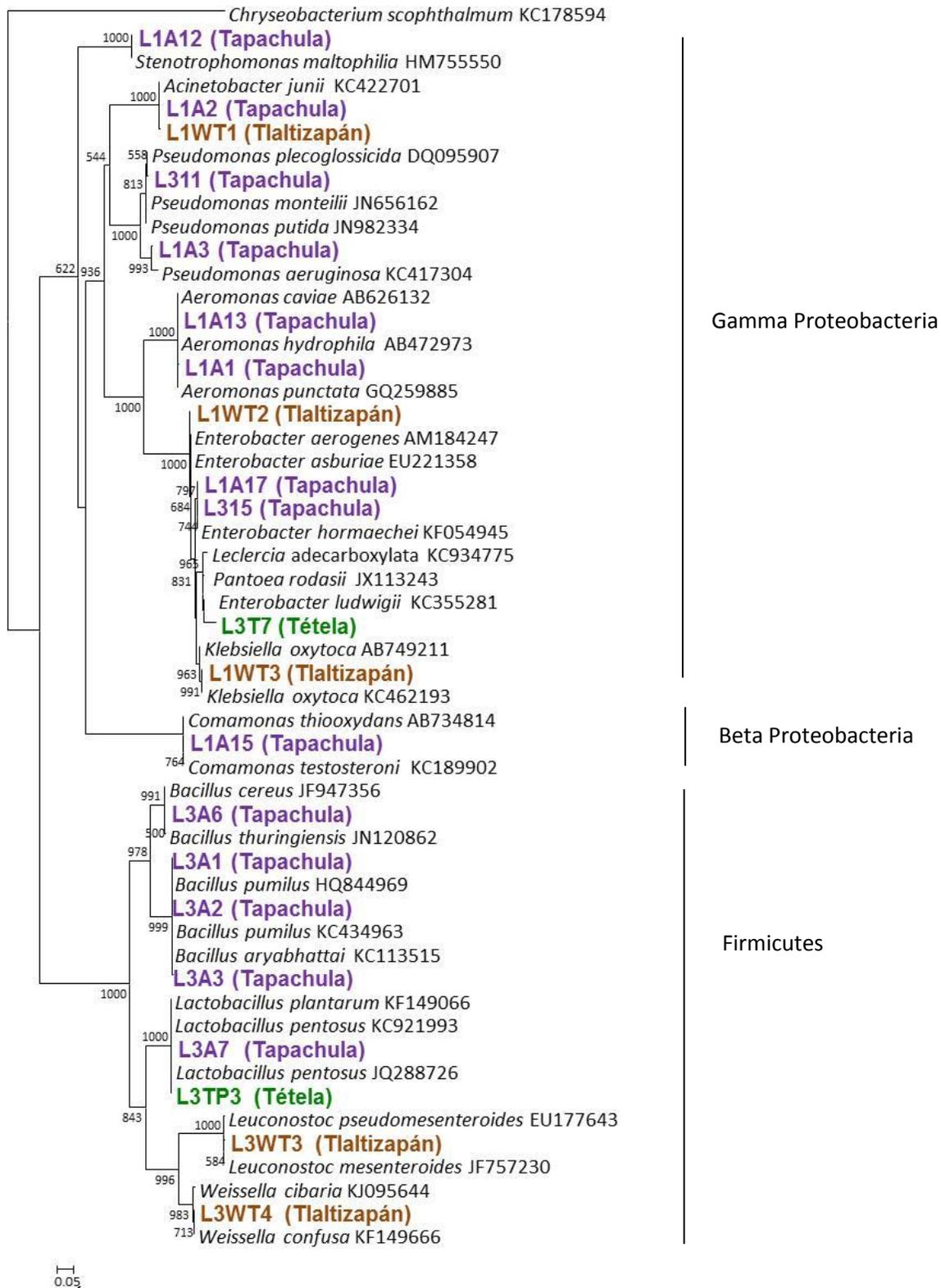


Figura 8. Árbol filogenético de máxima verosimilitud (-lnL 8896.55518) de bacterias asociadas a larvas de *A. ludens*, la barra de escala indica el 5% de divergencia bajo el modelo GTR+I+G. Secuencias de 1322 pb, la secuencia del 16S rARN de *C. scophthalmum* se utilizó como grupo externo.

El aislamiento de las bacterias asociadas a larvas se realizó cuando estas últimas se encontraban en el primer y tercer estadio (L1 y L3), siendo las primeras las que eclosionan del huevo y por lo tanto aún no se han alimentado mientras que las de tercer estadio sí lo han hecho.

En el árbol filogenético (**Figura 8**), se observa que las bacterias aisladas de larvas pertenecen a las clases, Gama Proteobacteria, Beta Proteobacteria y Firmicutes. La similitud de la secuencias del gen 16S rARN de estas bacterias respecto a las utilizadas de referencia para construir el árbol filogenético se reportan en la **Tabla 7**.

Tabla 7. Similitud de las bacterias aisladas de los estadios de larva 1 (L1) y larva 3 (L3) de *A. ludens* respecto a microorganismos previamente identificados

Aislado	Relación filogenética	% de similitud 16S rARN
L1A12	<i>S.maltophilia</i>	100%
L1A2 y L1WT1	<i>Acinetobacter junii</i>	99%
L311 y L1A3	<i>Pseudomonas</i> sp.	99%
L1A13 y L1A1	<i>Aeromonas</i> sp.	100%
L1WT2 y L1A17	<i>Enterobacter</i> sp.	99%
L315	<i>Enterobacter</i> sp, <i>K. oxytoca</i>	99%
L3T7	<i>E.ludwigii</i> , <i>P. rodasii</i>	98%
L1WT3	<i>Klebsiella oxytoca</i>	100%
L1A15	<i>Comamonas</i> sp.	99%
L3A6, L3A1, L3A2 y L3A3	<i>Bacillus</i> sp.	99%
L3A7	<i>Lactobacillus</i> sp.	99%
L3WT3	<i>Leuconostoc</i> sp.	99%
L3WT4	<i>Weissella</i> sp.	99%

Como se puede observar, algunas bacterias que se aislaron de huevos de moscas de Tapachula (**Tabla 6**), continúan presentes en larvas de primer estadio de esta misma población. Estas son *Pseudomonas* sp, *Acinetobacter* sp, *Stenotrophomonas* sp y *Klebsiella* sp entre otras.

Por otra parte, cuatro de los siete aislados provenientes de las larvas de Tapachula de tercer estadio se relacionaron con *Bacillus* sp. mientras que en larvas silvestres de la misma etapa se aisló *Lactobacillus* sp y *Weisella* sp. Estas bacterias son conocidas por ser productoras de ácido láctico. Para el estadio de larva de *A. ludens* no hay un reporte sobre las bacterias asociadas, pero en larvas de la mosca de Mediterráneo se identificaron los géneros *Klebsiella* y *Enterobacter* (35). Esto coincide con nuestros resultados, sin embargo ellos no aislaron Firmicutes ni Beta Proteobacterias. Adicionalmente y para tener una idea de la cantidad de bacterias presentes en esta etapa de la mosca, se determinó el número de UFC de larvas de moscas Tapachula de tercer estadio. Este valor fue de 1.6×10^6 , este valor fue similar al reportado en larvas de la mosca del Mediterráneo (54).

Filogenia de las bacterias asociadas a pupas de *A. ludens*

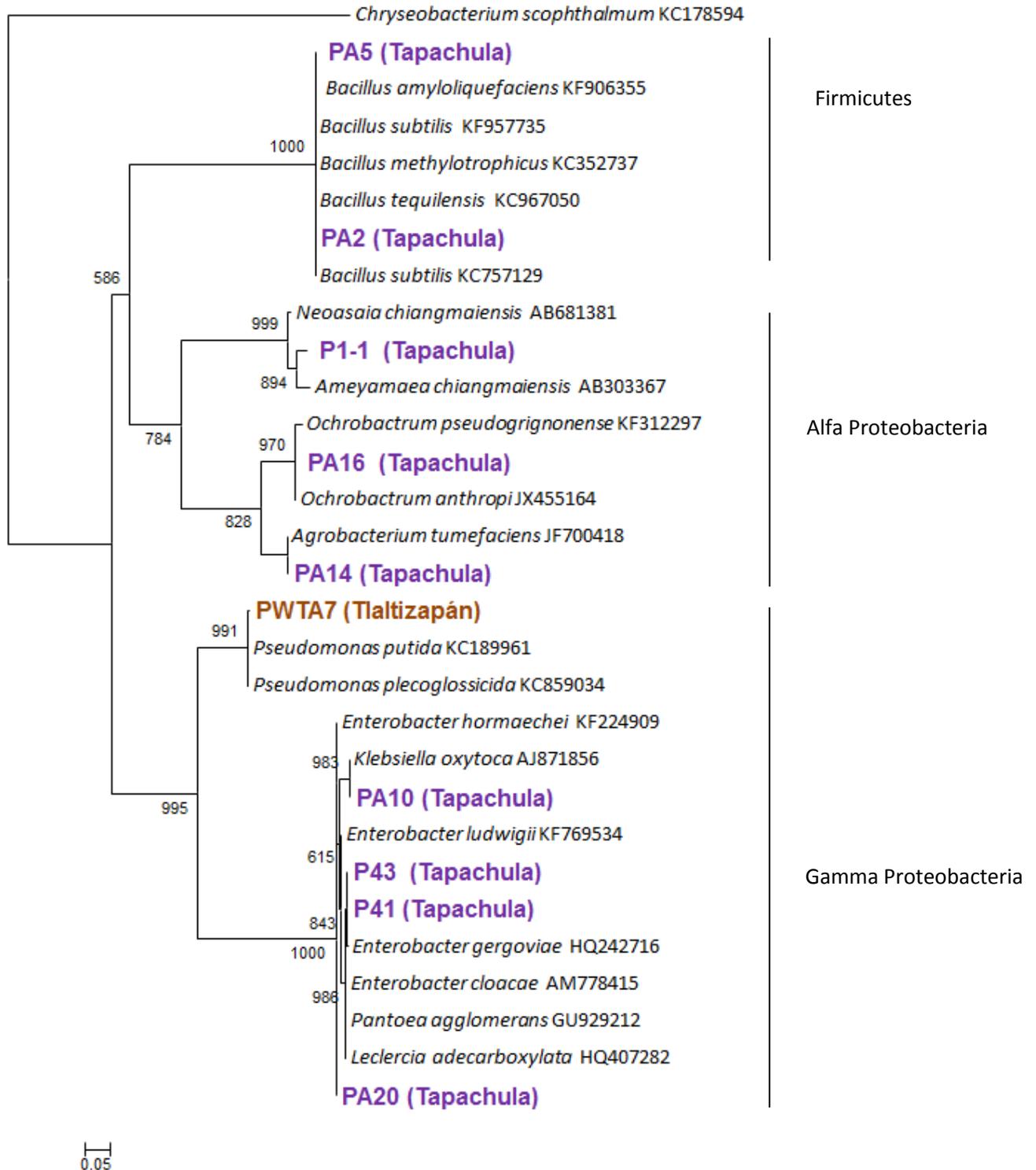


Figura 9. Árbol filogenético de máxima verosimilitud (-lnL 4865.04338) de bacterias asociadas a pupas de *A. ludens*, la barra de escala indica el 5% de divergencia bajo el modelo GTR+I+G. Secuencias de 1044 pb, la secuencia del 16S rARN de *C. scophthalmum* se utilizó como grupo externo.

Asociadas a las pupas de moscas Tapachula se identificaron bacterias de las clases Gamma Proteobacteria (Enterobacteriaceae), Alfa Proteobacteria (*Ochrobactrum* sp. y *Agrobacterium* sp.) y Firmicutes (*Bacillus* sp.), mientras que en las de Tlaltizapán únicamente se aislaron Gamma Proteobacterias (*Pseudomonas* sp.) **Figura 9**. La población de Tetela del Volcán no aparece en el árbol filogenético debido a que no se contó con pupas para el aislamiento de bacterias. La similitud de las secuencias obtenidas respecto a otras especies bacterianas se muestra en la **Tabla 8**.

Tabla 8. Porcentajes de similitud de la secuencia del gen 16S rARN de los aislados bacterianos provenientes de pupas de *A. ludens* de Tapachula y Tlaltizapán respecto a microorganismos previamente identificados.

Aislado	Relación Filogenética	% de similitud 16S rARN
PA5 Y PA2	<i>Bacillus</i> sp.	99%
P1-1	<i>Neosasaia chiangmaiensis</i> , <i>Ameyamaea chiangmaiensis</i>	99%
PA16	<i>Ochrobactrum</i> sp.	99%
PA14	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	99%
PWTA7	<i>Pseudomonas</i> sp.	99%
PA10	<i>Klebsiella oxytoca</i> , <i>Enterobacter</i> sp.	99%
P43 y P41	<i>Enterobacter</i> sp., <i>P. agglomerans</i>	99%
PA20	<i>Enterobacter</i> sp.	99%

Al comparar las bacterias aisladas de pupas de Tapachula con las obtenidas de huevo y larva de esta misma localidad (**Tabla6-7**), podemos notar que asociadas a estos tres estadios se encuentran bacterias de la familia Enterobacteriaceae (*Klebsiella* sp y *Enterobacter* sp), curiosamente estos géneros también se han aislado en pupas de la mosca del Mediterráneo (35).

La familia Alfa Proteobacteria que se identificó en las pupas de Tapachula, no había sido aislada en estadios anteriores y tampoco se ha reportado en *C. capitata*.

Algo importante que se ha observado en los insectos que pasan por diferentes estadios de desarrollo antes de llegar a adultos es que durante esta transición ocurren importantes cambios a nivel intestinal. En algunas especies de mosquitos estos cambios pueden resultar en una pérdida total o parcial de las bacterias intestinales (6), por lo tanto solamente los microorganismos que puedan tolerar estos cambios, así como la falta de nutrientes estarán presentes en los adultos recién emergidos.

Por otra parte, en pupas de Tapachula al igual que en las larvas también se determinó el número de UFC presentes, y que en este caso fue de 1.9×10^6 por individuo.

Bacterias asociadas a las hembras adultas de *A. ludens*

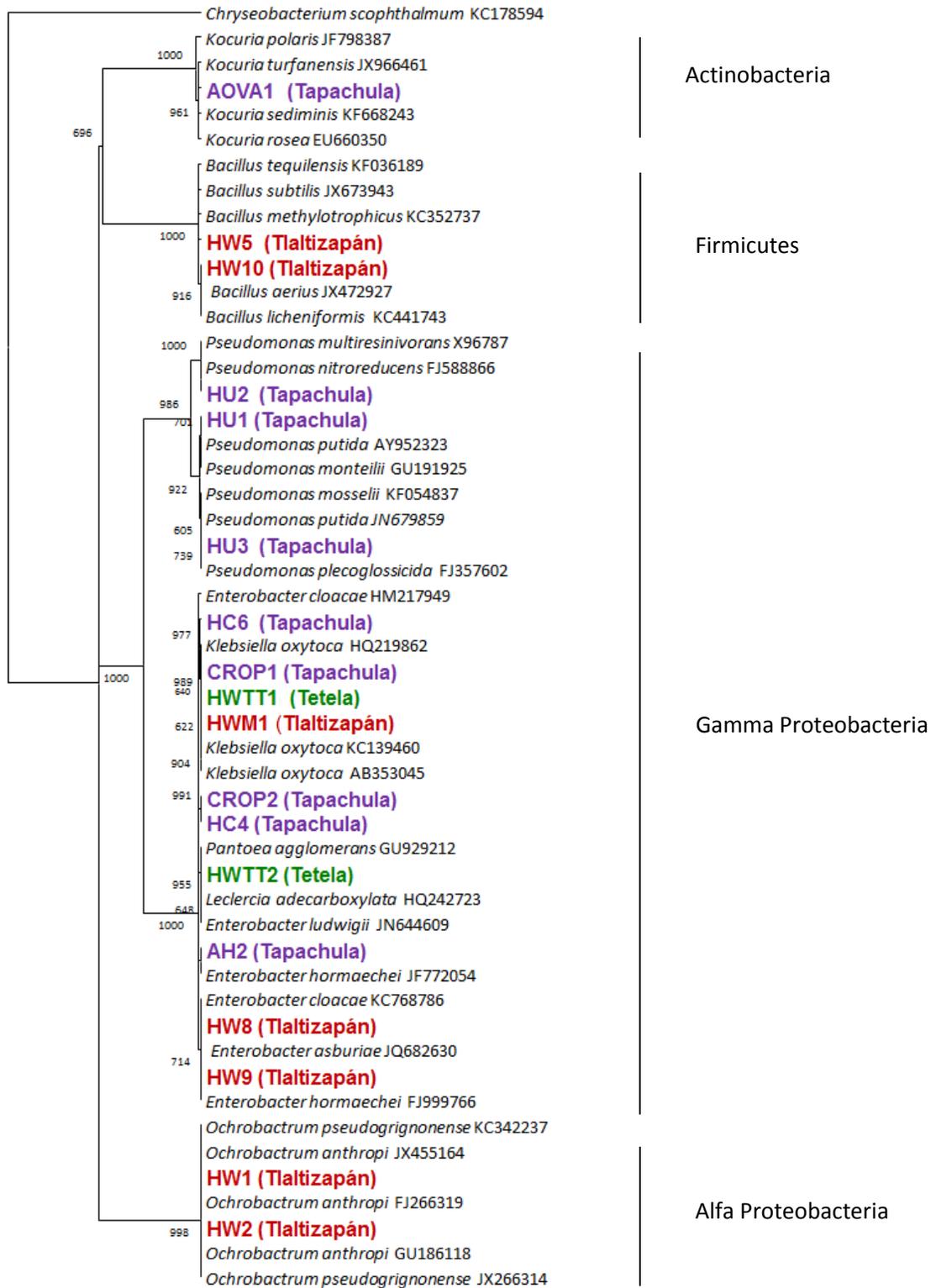


Figura 10. Árbol filogenético de máxima verosimilitud (-lnL 7008.97256) de las bacterias asociadas a hembras de *A. ludens*. Modelo GTR+I+G. Secuencias de 1334 pb, la secuencia del 16S rARN de *C. scophthalmum* se utilizó como grupo externo.

Asociadas a las hembras adultas de las tres poblaciones de moscas se identificaron bacterias de la familia Enterobacteriaceae (**Figura 10, Tabla 9**), esto es interesante y nos sugiere que puede existir una relación estrecha entre esta familia de bacterias y *A. ludens*. La evidencia que apoyan esta idea es la identificación de *K. oxytoca* y *Enterobacter sp* desde el estadio de huevo hasta adulto, esto se ha observado en la población de Tapachula (**Tabla 6-8**).

A partir de hembras de Tlaltizapán también se aislaron Alfa Proteobacterias (*Ochrobactrum sp*) y Firmicutes (*Bacillus sp.*), mientras que solamente en la población de Tapachula se identificó un representante de las Actinobacterias.

Tabla 9. Porcentaje de similitud de las secuencias del gen 16S rARN de aislados obtenidos de hembras de Tapachula, Tlaltizapán y Tetela del Volcán respecto a bacterias previamente identificadas.

Aislado	Taxón relacionado	% de similitud 16S rARN
AOVA1	<i>Kocuria sp.</i>	99%
HW5 y HW10	<i>Bacillus sp.</i>	99%
HC6, CROP1,HWTT1 y HWM1	<i>K. oxytoca</i> o <i>Enterobacter sp.</i>	99%
CROP2,HC4,AH2 HW8 y HW9	Enterobacteriaceae	99%
HW1 y HW2	<i>Ochrobactrum sp.</i>	99%

Se ha reportado que las Actinobacterias confieren a sus insectos hospederos protección contra bacterias u hongos patógenos (55). Para *Kocuria sp.* que fue la bacteria que se aisló de las hembras de Tapachula no se ha descrito esta función. Sin embargo, este mismo género se ha identificado en el escarabajo descortezador (*Dendroctonus rizophagus*) y en el mosquito *Anopheles stephensi* (56,57).

El género *Pseudomonas* que solo se identificó en las moscas de Tapachula, se ha reportado previamente en *A. ludens* así como en otras moscas de la fruta (39-41).

Un efecto negativo de *Pseudomonas* sp. se observó en la mosca del Mediterráneo. En este insecto se determinó que la alimentación con *P. aeruginosa* en dosis elevadas (10^4 UFC), reduce significativamente la longevidad de su hospedero.

De manera opuesta, la alimentación de moscas con una mezcla de bacterias de la familia Enterobacteriaceae como son *C. freundii*, *K. oxytoca*, *Enterobacter* spp., *Pantoea* spp. y *P. cypripedi* aumenta la supervivencia de los adultos comparado con moscas no alimentadas (58).

Por otra parte, dos de los aislados identificados (HC6 y HC4) no se obtuvieron a partir de homogenizados de moscas como todos los anteriores, sino que se aislaron al poner insectos a caminar sobre un medio de cultivo sólido bajo la campana de flujo laminar. Lo anterior se realizó con la finalidad de aislar bacterias que pudiesen estar en las heces, ya que al mismo tiempo que caminan sobre el medio de cultivo las moscas depositan sus heces. Curiosamente estos dos aislados se relacionaron filogenéticamente con otros que sí se obtuvieron a partir de homogenizados de mosca.

Adicionalmente, otros dos aislados se obtuvieron al disecar el buche de las hembras (Crop1 y Crop2). El buche es un órgano que forma parte del sistema digestivo de los insectos y entre sus múltiples funciones está el almacenar alimento, aunque también se sabe que algunas especies de moscas almacenan bacterias en este órgano y posteriormente las inoculan sobre su planta hospedera mediante regurgitación (55).

Finalmente es importante resaltar que para aislar bacterias de los insectos silvestres se utilizaron moscas recién emergidas, además de que a ellas no se les permitió alimentarse, esto para evitar que adquiriesen bacterias presentes en el alimento.

Bacterias aisladas de machos adultos de *A. ludens*

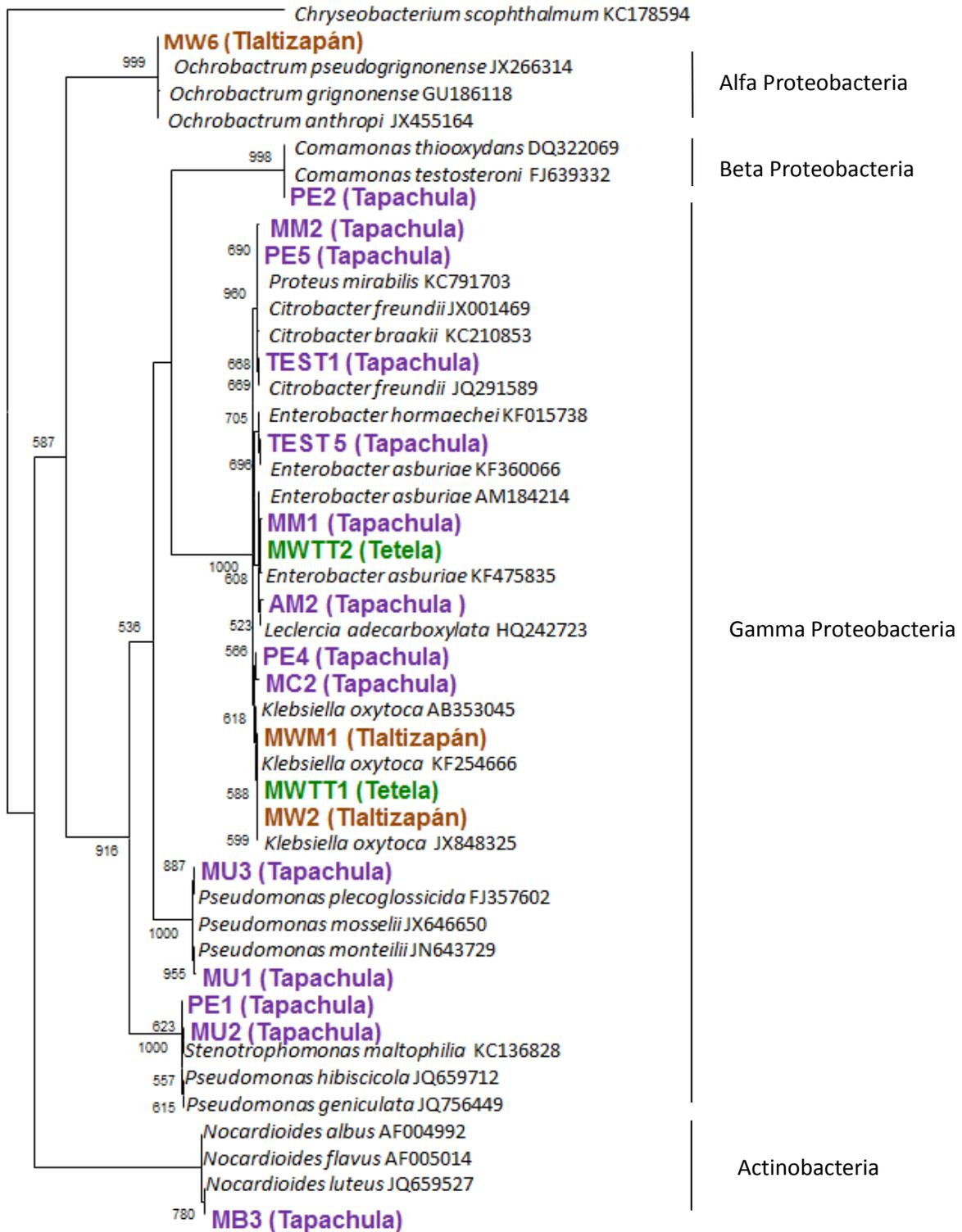


Figura 11. Árbol filogenético de máxima verosimilitud (-lnL 6829.86932) de bacterias asociadas a machos de *A. ludens*, la barra de escala indica el 10% de divergencia bajo el modelo GTR+I+G. Secuencias de 1276 pb, la secuencia del 16S rARN de *C. scophthalmum* se utilizó como grupo externo

Al igual que en las hembras, asociados a los machos de las tres poblaciones se identificaron bacterias de la familia Enterobacteriaceae (**Figura 11**). Los géneros *Pseudomonas*, *Comamonas* así como *Nocardioides* se identificaron únicamente en machos de Tapachula. *Nocardioides* es un actinobacteria que también se ha reportado en el intestino de la hormiga *Paratrechina longicornis* (60).

Por último, *Ochrobactrum* sp. que se aisló de las hembras de Tlaltizapán (**Figura 10**), también aisló de machos de esa misma localidad. Los valores de similitud entre los aislados obtenidos respecto a las bacterias presentes en el árbol filogenético se muestra en la **Tabla 10**.

Tabla 10. Porcentajes de similitud de la secuencia del gen 16S rARN de las bacterias aisladas de machos *A. ludens* de Tapachula, Tlaltizapán y Tetela del Volcán respecto a microorganismos previamente identificados.

Aislado	Relación filogenética	% de similitud 16S rARN
MW6	<i>Ochrobactrum</i> sp.	99%
PE2	<i>Comamonas</i> sp.	99%
MM2 y PE5	<i>C. freundii</i> . o <i>Proteus mirabilis</i> .	99%
TEST1,TEST, MM1 y MWTT2	<i>Citrobacter</i> sp. y <i>Enterobacter</i> sp.	98-99%
AM2	<i>Leclercia adecarboxylata</i> o <i>Enterobacter</i> sp.	99%
PE4, MC2, MWM1,MWTT1 y MW2	<i>K. oxytoca</i> , <i>Enterobacter</i> sp. o <i>Citrobacter</i> sp.	99%
MU1 y MU3	<i>Pseudomonas</i> sp.	99%
PE1 y MU2	<i>S. maltophilia</i>	99%
MB3	<i>Nocardioides</i> sp.	99%

Identificación molecular por el gen 16S rARN

En bacterias, la definición de especie es muy discutida. Sin embargo, tradicionalmente y para términos de comparación se acepta que las bacterias que poseen secuencias del gen 16S rARN con un valor de identidad entre ellas del 97% pertenecen a la misma especie (61), aunque recientemente este valor se ha modificado a 98.7% (62).

En los datos presentados anteriormente (**Tablas 6-10**), para determinar la especie de las bacterias se tomó un valor de identidad entre secuencias del 98%. A pesar de esto, no se logró resolver completamente la identidad de algunas bacterias, ya que los valores obtenidos al hacer la matriz de distancia fueron muy cercanos o iguales entre diferentes especies y géneros inclusive usando un valor de 99%. Este fenómeno se observó principalmente en las bacterias relacionadas con la familia Enterobacteriaceae, Pseudomonadaceae y con el género *Bacillus*. Específicamente para estas categorías taxonómicas se ha reportado que el gen 16S rARN no ofrece gran resolución (63).

Para contrarrestar los problemas en la asignación de especie, así como para analizar la diversidad bacteriana presente en una comunidad se ha propuesto el uso de las Unidades Taxonómicas Operativas (OTU's), o filotipos. En este contexto, un OTU representa un grupo de secuencias del gen 16S rRNA con un porcentaje de identidad similar.

Por esta razón, y con base en las 80 secuencias del gen 16S rARN obtenidas, se realizó un análisis para identificar el número de OTU's. Como resultado de este análisis se obtuvieron 22 OTU's (**Tabla 11**).

Tabla 11. Número de OTU's en el que se agruparon las secuencias del gen 16S rARN de las bacterias aisladas de moscas de Tapachula, Tlaltizapán y Tetela del Volcán.

Se muestra también el número de secuencias que conforman cada OTU y con qué grupo taxonómico se relacionan. Las celdas coloreadas indican presencia mientras que las que están en blanco ausencia. El valor de identidad entre secuencias para determinar los OTU's fue de 98%

OTU	Tapachula	Tlaltizapán	Tetela del Volcán	# de secuencias agrupadas
<i>Agrobacterium</i> sp				1
<i>Ameyamaea</i> sp				1
<i>Aeromonas</i> sp				2
<i>Weisella</i> sp				1
<i>Leuconostoc</i> sp				1
<i>Lactobacillus</i> sp				2
<i>Bacillus</i> sp				1
<i>Acinetobacter</i> sp				1
<i>Acinetobacter</i> sp				1
<i>Acinetobacter</i> sp				3
<i>Pseudomonas</i> sp				3
Enterobacteriaceae				1
<i>Bacillus</i> sp				4
<i>Pseudomonas</i> sp				1
<i>Bacillus</i> sp				4
<i>Kokuria</i> sp (Actinobacteria)				1
<i>Comamonas</i> sp				2
<i>Stenotrophomonas</i> sp				4
<i>Ochrobactrum</i> sp				4
<i>Pseudomonas</i> sp				7
Enterobacteriaceae				34
<i>Nocardioides</i> sp (Actinobacteria)				1
OTU's	20	7	4	

En la población de Tapachula se identificaron 20 OTU's, mientras que en la de Tlaltizapán siete y en la de Tetela del Volcán cuatro (**Tabla 11**). Lo anterior no significa que la población de Tapachula es la más diversa o que esos OTU's están ausentes de las otras poblaciones, ya que como se mencionó anteriormente a partir de la población de Tapachula y debido a la disponibilidad de insectos se aisló un mayor número de bacterias, lo que pudo influir en el número de OTU's identificados. A pesar de ello los datos obtenidos nos permiten hacer algunas comparaciones, por ejemplo, la población de Tlaltizapán comparte siete OTU's con la de Tapachula mientras que con la de Tetela del Volcán solo dos, sin embargo para confirmar que efectivamente estos grupos de bacterias solo están presentes en determinada población de moscas se debe de coleccionar y analizar nuevos individuos silvestres.

Un punto interesante es que el OTU relacionado con la familia Enterobacteriaceae se encontró presente en las tres poblaciones de moscas (**Figura 12**). Esta familia de bacterias se ha identificado previamente en moscas adultas colectadas en otros años y localidades (39,41), lo que sugiere que existe una estrecha relación entre este grupo de bacterias y *A. ludens*.

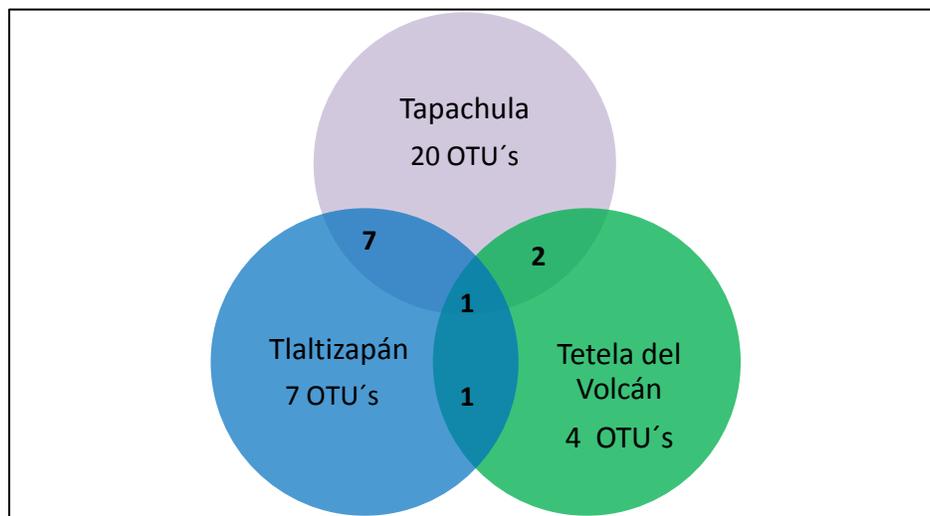


Figura 12. Diagramas de Venn representando el número de OTU's identificados en cada población de moscas así como los que fueron compartidos.

Una hipótesis para explicar la presencia de la Familia Enterobacteriaceae en las tres poblaciones de moscas, es que estas bacterias están ampliamente distribuidas en el ambiente y por lo tanto pueden ser adquiridas por las moscas independientemente de su localidad. No obstante, estas bacterias fueron aisladas desde el estadio de huevo, lo que sugiere una transmisión de la madre a los hijos.

Una vía para la adquisición de bacterias es mediante su ingesta, por esta razón se aislaron microorganismos de la dieta de los adultos de Tapachula. En este alimento se identificó *S. maltophilia*, *Enterobacter* spp, *Acinetobacter* sp y *Enterococcus* sp. De ellas, solo las tres primeras se identificaron en moscas adultas pero también en los estadios anteriores (huevo y larva). Estos estadios nunca estuvieron en contacto con este alimento, por lo que surge la pregunta de que si las bacterias aisladas del alimento son las mismas que se identificaron en las moscas y si es así cuál es mecanismo de transmisión o si simplemente la identificación por el gen 16S rARN no permite separar ambos grupos de bacterias. Una metodología para responder esta pregunta puede ser el seguimiento de un determinado grupo de bacterias a través de los diferentes estadios de la mosca.

Por otra parte, también se aislaron bacterias de la dieta de larva, ellas se relacionaron con *Acinetobacter* sp y *Enterobacter* spp, estos dos géneros se identificaron en la etapa de huevo, lo que sugiere nuevamente que algunas de las bacterias presentes en *A. ludeus* pueden ser transmitidas de la madre a los hijos.

Las investigaciones realizadas en la mosca del Mediterráneo, más los resultados obtenidos en el presente trabajo apoyan la idea de que la hembra de la mosca mexicana de la fruta transmite a su descendencia bacterias relacionadas con la familia Enterobacteriaceae. Esto nos lleva a pensar que otros microorganismos que han identificado en *A. ludeus* pueden ser adquiridos mediante su alimentación, por lo que son transitorios. Por esta razón no se han identificado en común en los trabajos realizados en *A. ludeus* (39-41).

La información obtenida hasta este momento sobre la identidad de las bacterias asociadas a los diferentes estadios de la mosca mexicana de la fruta se resume en la **Tabla 12**.

Tabla 12. Grupos bacterianos asociados a los diferentes estadios de *A. ludens*. Las casillas azules indican la presencia de esas bacterias en la población de Tapachula, si sobre las casillas se encuentra escrito otra población, ello indica que también ahí se encontró presente ese grupo. Las casillas en blanco indican ausencia.

Grupo	Huevo	Larva	Pupa	Macho (Adulto)	Hembra (Adulto)
<i>Pseudomonas</i> sp.	Tlaltizapán		Tlaltizapán		
<i>Acinetobacter</i> sp.		Tlaltizapán			
<i>Aeromonas</i> sp.					
Comamonas sp.					
<i>Bacillus</i> sp.	Tlaltizapán				Tlaltizapán
Lactobacillales		Tetela y Tlaltizapán			
<i>Ochrobactrum</i> sp.				Tlaltizapán	Tlaltizapán
<i>Agrobacterium</i> sp.					
Acetobacteraceae (Alfa Proteobacteria)					
<i>Stenotrophomonas</i> sp.					
Actinobacteria					
Enterobacteriaceae	Tlaltizapán	Tlaltizapán y Tetela		Tetela y Tlaltizapán	Tetela y Tlaltizapán

En esta primera sección de la tesis se presentaron los resultados correspondientes a la identificación de las bacterias asociadas con *A. ludens*. Esto se realizó mediante un enfoque dependiente de cultivo, por lo tanto, la identificación con una metodología independiente de cultivo puede ser una opción para complementar estos resultados.

Es importante recordar que conocer la identidad de los microorganismos asociados con un sistema biológico es una de las preguntas más importantes dentro de la ecología microbiana. La segunda pregunta se relaciona con la función que pueden estar llevando a cabo estos microorganismos. Para *A. ludens* esto ha sido un tema muy poco estudiado y se discutirá en la siguiente sección de la tesis.

Sección II: Contribución nutricional de las bacterias asociadas con *A. ludens*.

El aporte de las bacterias en la nutrición de sus hospederos es un aspecto que se ha reportado en diferentes especies de insectos incluyendo moscas (18,35). Por esta razón, y para empezar a determinar la posible función de las bacterias aisladas de *A. ludens*, se decidió evaluar el papel de estos microorganismos en la nutrición. Para ello se determinó la capacidad pectinolítica, uricolítica y de fijación de nitrógeno de estos microorganismos.

Capacidad pectinolítica de las bacterias aisladas de *A. ludens*

La pectina es un polisacárido estructural presente en la pared de las células vegetales. Las frutas en general tienen un alto contenido de este carbohidrato, sin embargo la mayoría de los animales no puede aprovechar esta fuente de carbono (35).

La importancia de identificar bacterias pectinolíticas asociadas con *A. ludens*, radica en que al tener esta capacidad metabólica ellas podrían contribuir a que su hospedero aproveche mejor este carbohidrato, en especial en las larvas silvestres que se alimentan de la pulpa de la fruta.

Las bacterias que presentaron actividad pectinolítica se diferenciaron de las que no tienen esta capacidad por la producción de un halo de degradación alrededor de la colonia (**Figura 13**).

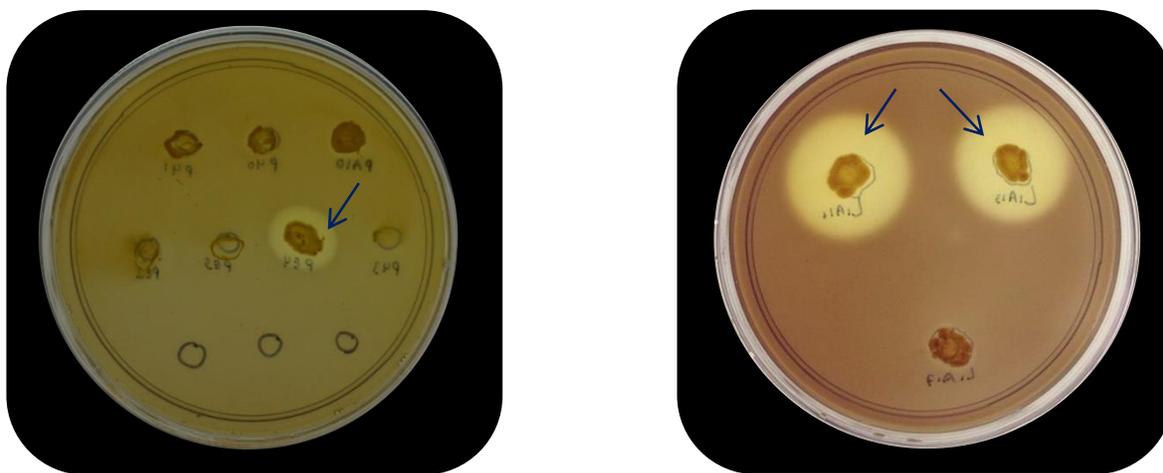


Figura 13. Aislados sembrados de manera circular sobre un medio de cultivo adicionado con pectina. Cuando se revelar la placa con lugol, únicamente las bacterias con la capacidad para degradar forman una zona clara alrededor de la colonia (flechas azules).

La identidad de las bacterias pectinolíticas, así como la etapa de la mosca de la que fueron aisladas se muestra en la **Tabla 13**. Como se puede observar, sólo en las moscas de Tapachula y Tlaltizapán se identificaron bacterias pectinolíticas, aunque ellas no estuvieron presentes durante todo el ciclo de vida de la mosca. De la población de Tetela del Volcán y debido a la disponibilidad de material biológico solo se aislaron bacterias de larva y adulto (machos y hembras), pero ninguna mostró actividad pectinolítica.

Tabla 13. Bacterias con capacidad pectinolítica aisladas de *A. ludens* de Tapachula y Tlaltizapán. El símbolo (+) indica presencia de actividad, mientras que el símbolo (-) ausencia.

Estadio	Población	Actividad Pectinolítica	Bacterias responsables
Huevo	Tapachula	+	<i>Pseudomonas sp.</i>
	Tlaltizapán	-	-
Larva	Tapachula	+	<i>Aeromonas sp.</i> y <i>Bacillus sp.</i>
	Tlaltizapán	-	-
	Tetela del Volcán	-	-
Pupa	Tapachula	+	<i>Bacillus sp.</i>
	Tlaltizapán	+	<i>Pseudomonas sp.</i>
Macho (Adulto)	Tapachula	+	Enterobacteriaceae y <i>Nocardioides sp.</i>
	Tlaltizapán	+	Enterobacteriaceae y <i>Ochrobactrum sp.</i>
	Tetela del Volcán	-	-
Hembra (Adulto)	Tapachula	-	-
	Tlaltizapán	+	<i>Ochrobactrum sp.</i> y <i>Bacillus sp.</i>
	Tétela del Volcán	-	-

Inicialmente se esperaba que las bacterias aisladas de larvas silvestres fueran pectinolíticas, ya que estas larvas se alimentan de la pulpa de la fruta que contiene pectina, por lo tanto la asociación con estas bacterias podría ser benéfica para el hospedero, sin embargo esto no fue así ya que ninguna de las bacterias identificadas mostró tener esta capacidad.

Para estar completamente seguros de la ausencia de bacterias pectinolíticas, se deberían de evaluar nuevas bacterias obtenidas de larvas silvestres.

En las larvas de Tapachula, las bacterias pectinolíticas identificadas fueron *Aeromonas sp* y *Bacillus sp*. Estas especies se aislaron de larvas de primer y tercer estadio respectivamente. Estas larvas, a diferencia de las silvestres se alimentan de una dieta artificial en lugar de fruta. Por esta razón no se esperaba identificar bacterias con esta actividad, sin embargo su alimento se compone de harinas vegetales por lo que también contiene pectina. En este caso las bacterias pudieran estar contribuyendo en la degradación de este carbohidrato.

En la mosca del Mediterráneo se identificaron bacterias pectinolíticas y se encontraron en mayor cantidad en el estadio de larva pero también estuvieron presentes en pupas y adultos. Estas bacterias se relacionaron con *K. oxytoca*, *Pectobacterium cypripedii* y *P. caretovororum* (35). En nuestro caso, la bacteria que se aisló de larvas y machos y que presentó esta actividad también está relacionada con *K. oxytoca*

Capacidad uricolítica de las bacterias asociadas con *A. ludens*

El ácido úrico es un compuesto nitrogenado que generalmente es desechado por los animales. Algunas especies de insectos mediante la participación de sus bacterias simbiotas reciclan el ácido úrico, presumiblemente para la síntesis de aminoácidos (20).

En la naturaleza, las moscas al igual que otros animales se pueden enfrentar a una limitada fuente de nutrientes, por ejemplo, el nitrógeno. El nitrógeno es un elemento importante ya que es un constituyente de las proteínas, es por ello que el reciclaje del ácido úrico con apoyo de las bacterias representa una ventaja para el hospedero, especialmente ante condiciones alimenticias poco favorables. Por esta razón, nos pareció interesante conocer si las bacterias aisladas de *A. ludens* pueden degradar este compuesto.

La capacidad uricolítica de las bacterias se evaluó al sembrarlas sobre un medio sólido adicionado con ácido úrico y posteriormente observar la aparición de un halo de degradación. Mientras que algunas bacterias produjeron un halo otras formaron un precipitado que se localizaba en el centro o en las orillas de la colonia (**Figura 14**). Este precipitado podría estar compuesto de productos intermedios de la degradación de ácido úrico.



Figura 14. Halo de degradación de ácido úrico señalado con una flecha (izquierda) y la acumulación de algún producto metabólico (derecha).

La identidad así como el origen de las bacterias uricolíticas se muestra en la **Tabla 14**. Como se puede observar, esta actividad se mantuvo presente a lo largo de todo el ciclo de vida de las moscas de Tapachula. Sin embargo, esta actividad no siempre fue otorgada por el mismo género de bacterias, aunque *Pseudomonas* sp contribuyó con su capacidad enzimática en la mayoría de las etapas de vida de la mosca.

De la población de moscas de Tlaltizapán también se aislaron bacterias uricolíticas pero solamente de los estadios de huevo y adulto. A partir de la población de Tetela del Volcán y debido a la falta material biológico solo se analizaron las etapas de larva y adultos (machos y hembras), pero ninguna de las bacterias aisladas presentó esta actividad.

Tabla 14. Relación de las bacterias aisladas de *A. ludens* de Tapachula y Tlaltizapán con capacidad uricolítica. El símbolo (+) indica presencia de actividad, mientras que el símbolo (-) ausencia.

Estadio	Población	Actividad Pectinolítica	Bacterias responsables
Huevo	Tapachula	+	<i>Pseudomonas</i> sp.
	Tlaltizapán	+	<i>Pseudomonas</i> sp.
Larva	Tapachula	+	<i>Pseudomonas</i> sp. <i>Comamonas</i> sp.
	Tlaltizapán	-	-
Pupa	Tapachula	+	<i>Ochrobactrum</i> sp.
	Tlaltizapán	-	-
Macho	Tapachula	+	<i>Pseudomonas</i> sp., <i>Comamonas</i> sp y <i>Nocardioides</i> sp
	Tlaltizapán	+	<i>Ochrobactrum</i> sp
Hembra	Tapachula	+	<i>Pseudomonas</i> sp.
	Tlaltizapán	+	<i>Ochrobactrum</i> sp.

Sabiendo que algunas bacterias presentes en *A. ludens* tienen actividad uricolítica se decidió evaluar la presencia de ácido úrico en los insectos. Esto se realizó con un ensayo que detecta el ácido úrico mediante una reacción enzimática colorimétrica. Posteriormente las concentraciones de este compuesto se obtienen al comparar los valores resultantes con una curva estándar.

Cuando se analizaron los resultados correspondientes a la determinación del ácido úrico en los insectos se tuvieron problemas en su interpretación ya que se obtuvieron valores de concentración negativos. Esto a pesar de que se observó un cambio en la coloración de la muestra, lo que teóricamente indica la presencia de ácido úrico.

Debido a estos problemas solo se tomó en cuenta el cambio de color como presencia de ácido úrico. Con base en esto se analizaron larvas, pupas y adultos de *A. ludens* de Tapachula y en todos ellos se detectó cualitativamente la presencia de este compuesto.

Posiblemente algún compuesto liberado durante el macerado de los tejidos del insecto pudo interferir en el resultado, por ejemplo, cuando se realizaron los extractos de pupa se observó que ellos tomaron una coloración oscura.

En un futuro, si se quisiera determinar la presencia del ácido úrico en los insectos así como de otros productos de su degradación se recomendaría utilizar cromatografía de intercambio iónico. Con esta metodología se cuantificó este compuesto en la chinche *Parastrachia japonensis* con resultados satisfactorios (20).

Fijación de nitrógeno de las bacterias asociadas con *A. ludens*

La fijación de nitrógeno por medio de bacterias se ha estudiado generalmente en plantas, aunque menos conocido también ocurre en insectos como termitas (64) y la mosca del Mediterráneo (34). Con base en estos antecedentes se decidió evaluar si las bacterias aisladas de *A. ludens* también contaban con capacidad diazotrófica.

La fijación de nitrógeno se determinó en cultivo mediante ensayos de reducción de acetileno. Estas pruebas se hicieron únicamente en los aislados que se sabe, por la literatura tienen esta capacidad como *Klebsiella* sp o *Citrobacter* sp, (34) y experiencia del laboratorio, donde se ha mostrado que las bacterias relacionadas con *Klebsiella* sp son fijadoras de nitrógeno.

En total se evaluaron cuatro bacterias y todas ellas fueron capaces de reducir el acetileno a etileno, por lo que corroboramos tienen la capacidad para fijar nitrógeno (**Figura 15**)

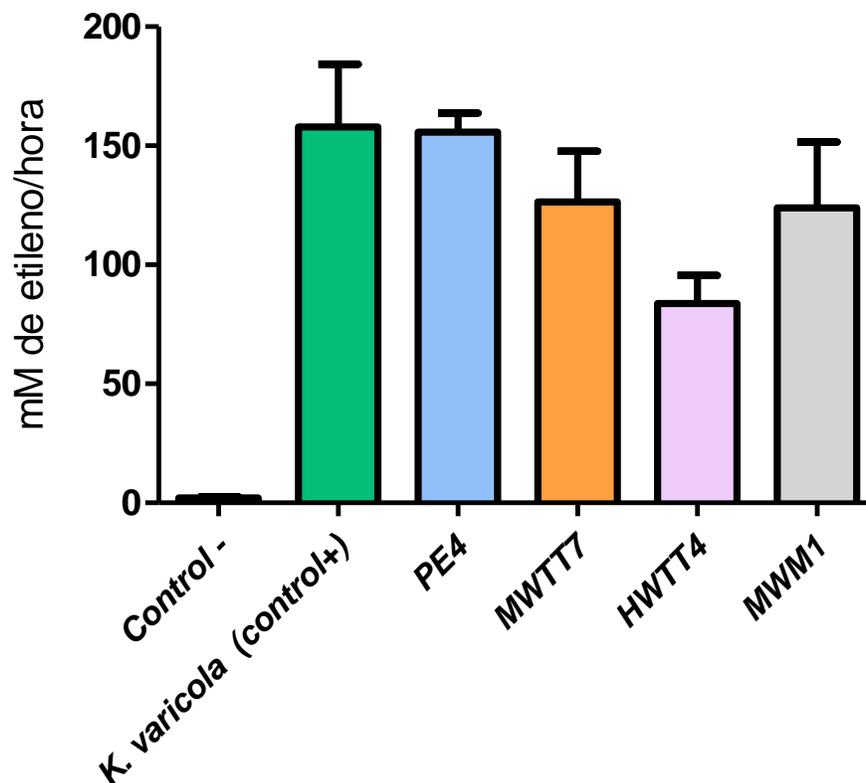


Figura 15 Ensayo de reducción de acetileno realizado en bacterias aisladas de machos de Tapachula (PE4), Tlaltizapán (MWM1), Tetela del Volcán (MWTT7) y de hembras de Tetela del Volcán (HWTT4). La cepa de *K. varicola* se utilizó como control positivo. Se muestran las barras con la media \pm el error estándar, análisis de Kruskal-Wallis $P > 0.05$. Cada bacteria se evaluó por cuadruplicado.

Desafortunadamente la identificación mediante el gen 16S rARN no permitió resolver la identidad de los cuatro aislados a nivel de especie, ya que los valores de similitud en esta secuencia salieron iguales para los géneros *Klebsiella* sp, *Enterobacter* sp y *Citrobacter* sp. que fueron con los que se relacionaron los aislados.

Pensando en las hembras al ser las que invierten más recursos en la reproducción requerirían de mayor energía en comparación con los machos, se incluyó un aislado obtenido de hembras de Tlaltizapán (MWM1). Esto para evaluar si la fijación de nitrógeno de la bacteria variaba respecto del sexo de la mosca. Sin embargo no se observó diferencia significativa en la reducción de acetileno entre los aislados de machos y hembras, (comparar **figura 15**)

Mediante ensayos de reducción de acetileno, Behar *et al* en el 2005, reportaron la actividad diazotrófica de *Pectobacterium cyripedii*, *P. caretovorum* y *C. freundii* aislados de la mosca del Mediterráneo (34).

Adicionalmente, estos autores determinaron que el gen *nifH* que codifica para una subunidad de la nitrogenasa que es la enzima responsable de la fijación de nitrógeno, se transcribe activamente en el intestino de la mosca. Esta expresión se determinó por medio de ensayos de PCR transcriptasa reversa utilizando oligonucleótidos para *nifH* de *Klebsiella* sp y generales para la familia Enterobacteriaceae

Finalmente y lo más interesante es que se detectó reducción de acetileno en las moscas vivas, lo que indica que dentro de la mosca se está llevando a cabo una fijación de nitrógeno *in vivo* (34). El reporte anterior nos hace pensar que las bacterias diazótroficas que se identificaron en *A. ludens* también pudieran fijar nitrógeno *in vivo*.

En *A.ludens*, al igual que en la mosca del Mediterraneo, las bacterias diazótroficas se relacionaron con la familia Enterobacteriaceae. De acuerdo a nuestros resultados, sabemos que esta familia está muy representada en *A. ludens*, ya que se aisló en casi todos los estadios de moscas de Tapachula y silvestres (**Tabla 11**).

Para comprobar que las bacterias diazotróficas asociadas con *A. ludens* fijan nitrógeno *in vivo* se podrían realizar ensayos de reducción de acetileno utilizando moscas vivas. Adicionalmente y para determinar la contribución directa de la fijación de nitrógeno se pueden llevar a cabo otros experimentos. Por ejemplo, para saber si el nitrógeno fijado por las bacterias termina formando parte en las proteínas del insecto se pueden poner moscas dentro de cámaras artificiales y adicionarles una mezcla de aire con un isótopo de nitrógeno pesado ($^{15}\text{N}_2$). Posteriormente se puede determinar si este elemento se encuentra en las proteínas del insecto.

El reciclaje del ácido úrico así como la fijación de nitrógeno con la participación de las bacterias representan un mecanismo que le podría permitir al hospedero contar con un aporte adicional de nitrógeno. Para las moscas de la fruta, el nitrógeno es muy importante ya que limita, al igual que otros elementos el éxito reproductivo. En las hembras por ejemplo, la alimentación con una dieta deficiente en nitrógeno se ve reflejada en una menor puesta de huevos en comparación con hembras alimentadas con una dieta rica en nitrógeno (36).

En las secciones anteriores se presentaron los resultados correspondientes a la identidad y posible función de las bacterias asociadas con la mosca mexicana de la fruta. Hasta este momento sabemos que las bacterias están presentes desde la etapa de huevo hasta adulto. Lo que nos hizo pensar que son transmitidas de la madre a los hijos. En otros insectos, se ha reportado que las bacterias heredables tienen un impacto positivo en la adecuación de su hospedero.

En las moscas de la fruta y en base a las observaciones realizadas en *C. capitata* se ha propuesto que las bacterias que se encuentran sobre el huevo son un “regalo” de la madre a sus hijos ya que les permite a sus descendientes enfrentarse a condiciones nutricionales poco favorables, debido a que estas bacterias tienen la capacidad para fijar nitrógeno y degradar la pectina (35). Todo lo anterior se relaciona con nuestros resultados, pero adicionalmente también identificamos bacterias con capacidad uricolítica.

La segunda parte de esta hipótesis contempla que la fruta hospedera, que es el lugar donde emergen y se desarrollan las larvas, es un medio que permite la multiplicación de las bacterias que fueron “obsequiadas” por la hembra. Por lo tanto la fruta, aseguraría aún más la adquisición de las bacterias por parte del hospedero.

La mayor parte de la investigación sobre las interacciones entre insectos y bacterias se ha enfocado al estudio de aspectos nutricionales, pero recientemente se ha propuesto que las bacterias también pueden afectar el comportamiento de sus hospederos (22), este será un tema discutido en la tercer y última sección de esta tesis.

Sección III: Importancia de las bacterias asociadas con *A. ludens* en la elección femenina

El efecto de las bacterias en el comportamiento de sus hospederos es un aspecto interesante, ya que sugiere que hay una relación entre los microorganismos y el sistema nervioso. Esto es algo que durante muchos años pasó desapercibido, sin embargo ya empieza a ser estudiado. (22).

En los insectos existen reportes de que las bacterias alteran el comportamiento sexual de sus hospederos (26). Con base en esta evidencia nos propusimos evaluar si la alimentación de los machos con antibiótico se ve reflejada en un cambio en la elección femenina.

Selección de antibióticos

Primeramente mediante antibiogramas se determinó la susceptibilidad de las bacterias aisladas de machos de Tapachula hacia los antibióticos kanamicina, estreptomicina, carbenicilina, tetraciclina, rifampicina y piperaciclina. De todos ellos, los que resultaron ser más eficientes en base a producir un mayor halo de inhibición bacteriana fueron la tetraciclina seguida de la estreptomicina y la kanamicina, mientras que los menos eficientes fueron la rifampicina, la carbenicilina y la piperaciclina. De las diferentes concentraciones de antibiótico que se evaluaron (50, 75, 100 y 150 $\mu\text{g/ml}$), la de 150 $\mu\text{g/ml}$ produjo un mayor halo de inhibición (**Figura 16**).

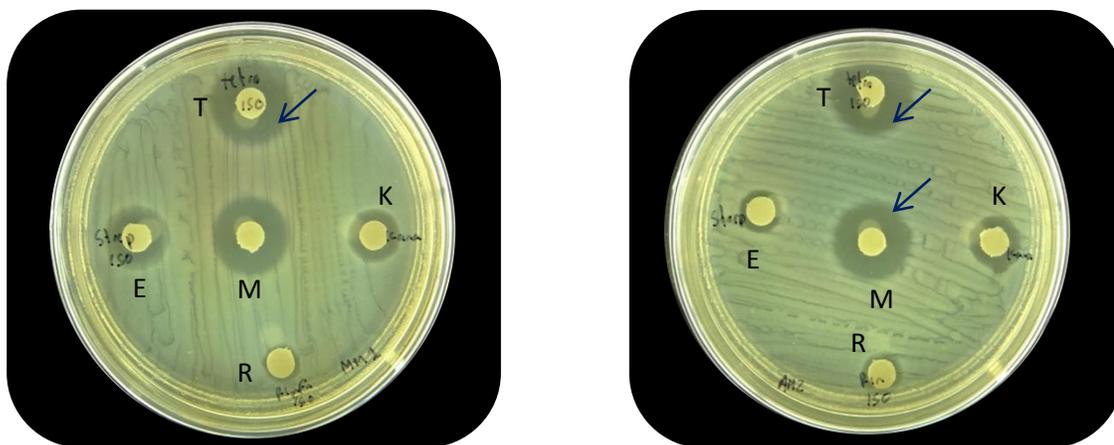


Figura 16. Antibiograma de dos aislados bacterianos de machos de *A. ludens* (derecha, izquierda). Los antibióticos evaluados fueron kanamicina (K), tetraciclina (T), estreptomicina (E) y rifampicina (R) a una concentración de 150 $\mu\text{g/ml}$ cada uno. Al centro se colocó una mezcla de los 4 antibióticos (M). El halo de inhibición se indica con una flecha. Algunos de los halos de inhibición están señalados por una flecha.

Alimentación con antibiótico

En base a los resultados anteriores y para tener una mayor actividad bactericida, se decidió alimentar a las moscas no sólo con un antibiótico si no con una mezcla de ellos a una concentración de 150 µg/ml.

En total se realizaron tres tratamientos para los que se utilizaron individuos de diferentes generaciones, además de que en una ocasión se modificó el coctel de antibióticos. En el primer tratamiento se administraron los antibióticos tetraciclina, kanamicina y estreptomicina a una concentración de 150 µg/ml cada uno durante 12 días.

Al finalizar el tratamiento y para evaluar su eficacia, se determinó el número de UFC de los machos de ambos grupos. En el grupo control se contaron 4.7×10^6 UFC, mientras que para el grupo alimentado con antibiótico de 2.6×10^5 UFC. A pesar de que el coctel de antibióticos utilizado no eliminó completamente la presencia de las bacterias en los machos, esta reducción fue estadísticamente significativa (**Figura 17**)

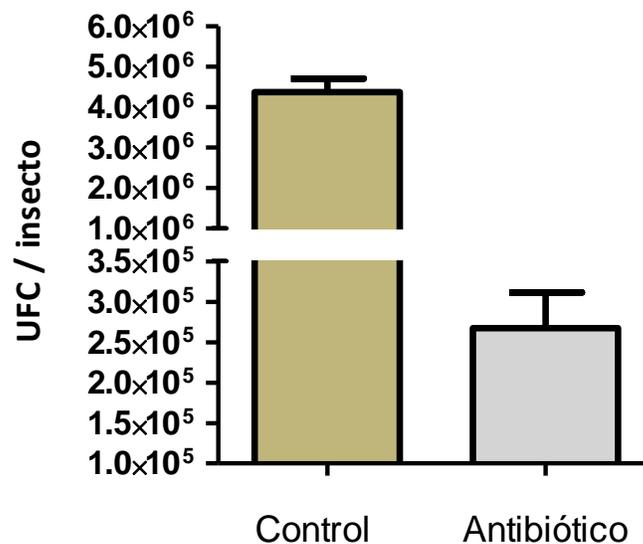


Figura 17. Número de unidades formadoras de colonias de los machos alimentados o no con antibiótico durante 12 días. Se muestran las barras con la media \pm el error estándar $P < 0.0001$ (Prueba de T). Se realizaron seis réplicas para cada tratamiento.

En el primer tratamiento, además de contar el número de UFC también se identificaron las bacterias aisladas de ambos grupos de machos, esto se hizo mediante la secuencia del gen 16S rARN. A partir de los machos control se obtuvieron dos aislados, uno de ellos y el más abundante (3.1×10^6 UFC) se relacionó filogenéticamente con *Klebsiella* sp., mientras que el segundo con *Proteus* sp y *Citrobacter* sp.

A partir de los machos alimentados durante 12 días con antibiótico también se aislaron dos morfotipos. El más abundante (2.3×10^6 UFC) se relacionó con *S. maltophilia*, mientras que el otro que se encontró en menor proporción (2.7×10^5) con *Comamonas* sp (**Figura 18**).

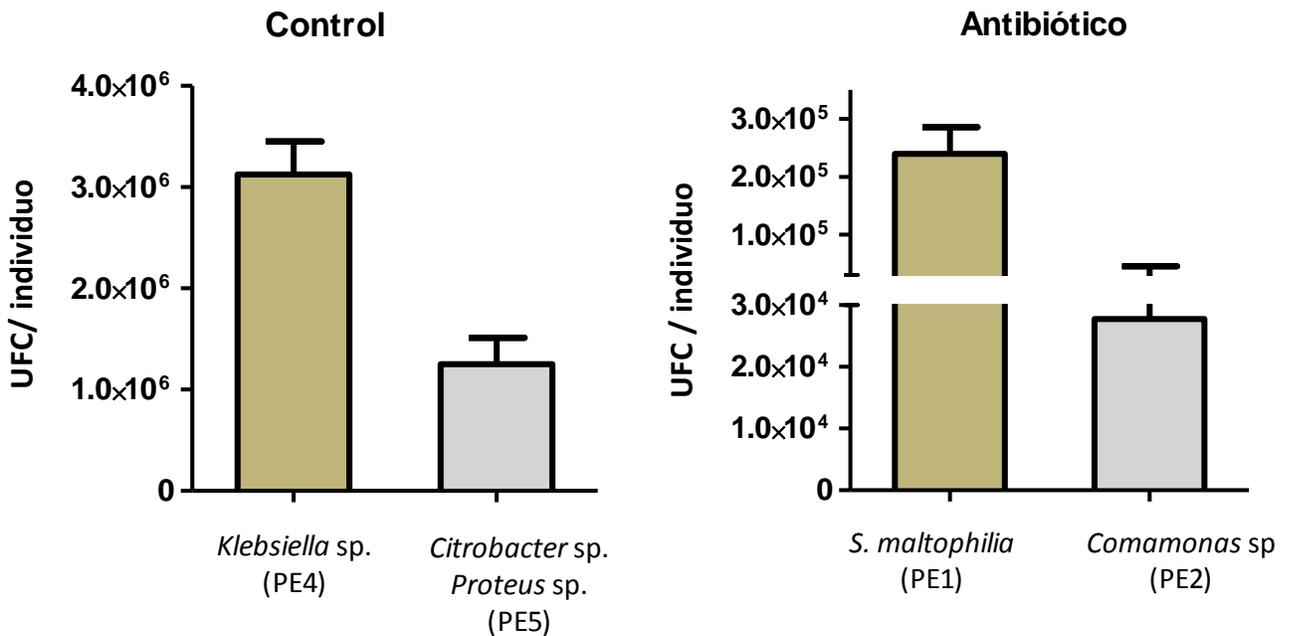


Figura 18. Identificación y número de UFC de los morfotipos aislados a partir de machos alimentados con antibiótico y machos control. Se muestran las barras con la media \pm el error estándar. Se realizaron seis réplicas de cada tratamiento.

La alimentación con antibiótico no sólo redujo el número de bacterias, sino que también modificó su composición (**Figura 17 y 18**). En los machos control por ejemplo, la bacteria más abundante fue *Klebsiella sp.* mientras que en los alimentados con antibiótico lo fue *S. maltophilia*. En humanos *S. maltophilia* se caracteriza por ser un patógeno oportunista, además de que es resistente a un gran número de antibióticos (65). Por esta razón se decidió realizar un antibiograma a esta bacteria usando los antibióticos kanamicina, tetraciclina y estreptomicina a 150 µg/ml, que fueron con los que se alimentó a las moscas. Los resultados obtenidos mostraron que *S. maltophilia* es resistente a estos antibióticos (**Figura 19**), lo que puede explicar su presencia en los machos que fueron alimentados con estos antibióticos. Posteriormente también se determinó que *S. maltophilia* es resistente a ceftriaxona, ácido nalidixico (100 µg/ml), eritromicina (100 y 200 µg/ml), gentamicina (100 y 200 µg/ml), higromicina (100 µg/ml) y cloranfenicol (100 µg/ml).

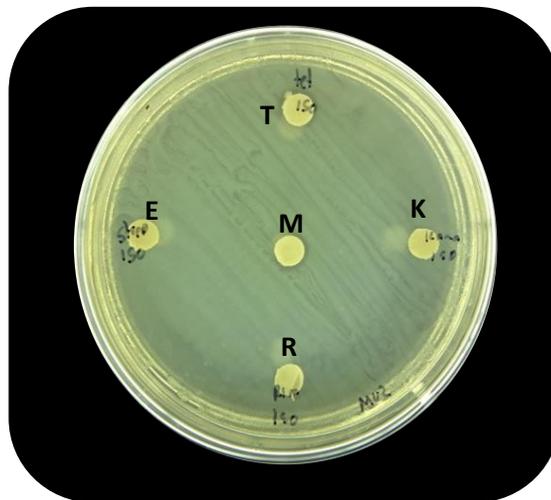


Figura 19. Antibiograma de *S. maltophilia*, las concentraciones de antibiótico utilizadas fueron 150 µg/ml de tetraciclina (T), estreptomicina (E), kanamicina (K) y rifampicina (R). En la parte central se colocó una mezcla de los cuatro antibióticos (M). Ninguno de los antibióticos evaluados produjo un halo de inhibición.

El género *Stenotrophomonas* se había aislado previamente de huevo y larva (**Figura 6-9**), lo que sugiere que esta bacteria puede formar parte de la microbiota normal de la mosca. Esto nos llevó a pensar que tal vez el crecimiento de *S. maltophilia* está regulado por la presencia de otras bacterias y que al eliminarlas como en el caso de los machos alimentados con antibiótico, su presencia se favorece.

Para evaluar esta hipótesis se realizaron ensayos de inhibición contra *S. maltophilia*, utilizando los dos aislados obtenidos de los machos control (PE4 Y PE5), más otros previamente identificados. En las cajas donde se realizaron estos ensayos no se observó ningún halo característico de un fenómeno de inhibición ni cuando se evaluaron las bacterias en conjunto (**Figura 20**). Por lo tanto la abundancia de esta bacteria en los machos alimentados con antibiótico puede ser debida únicamente a su resistencia.

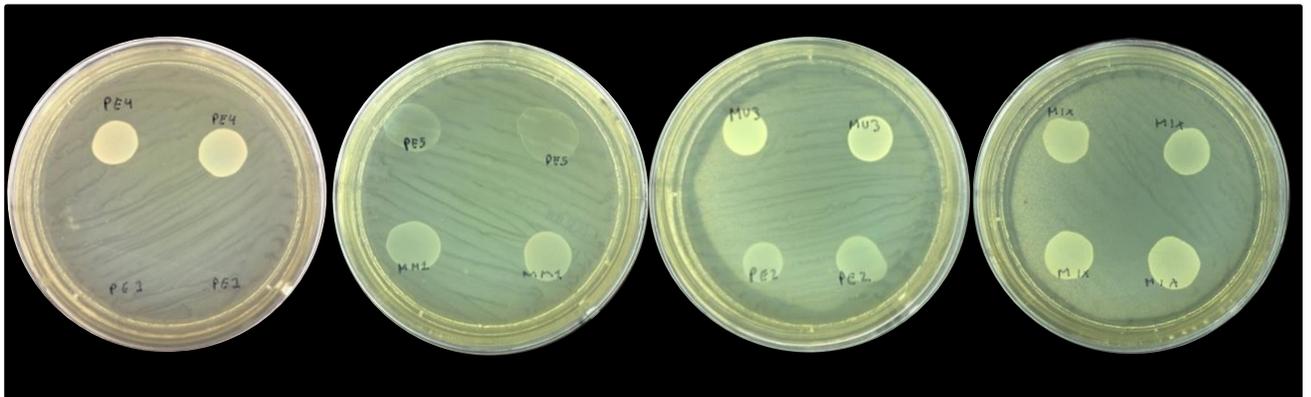


Figura 20. Sobre un tapete de bacterias de *S. maltophilia* se inocularon los aislados PE4, PE5, PE2 y MM1 (Enterobacteriaceae), MU3 (*Pseudomonas* sp) y PE2 (*Comamonas* sp.) En la última caja (derecha), se evaluó una mezcla de todos los aislados.

En el segundo tratamiento (**Figura 21**) se administraron los antibióticos kanamicina, tetraciclina y rifampicina a 150 µg/ml. Sin embargo en esta ocasión no se observó una diferencia significativa en el número de UFC.

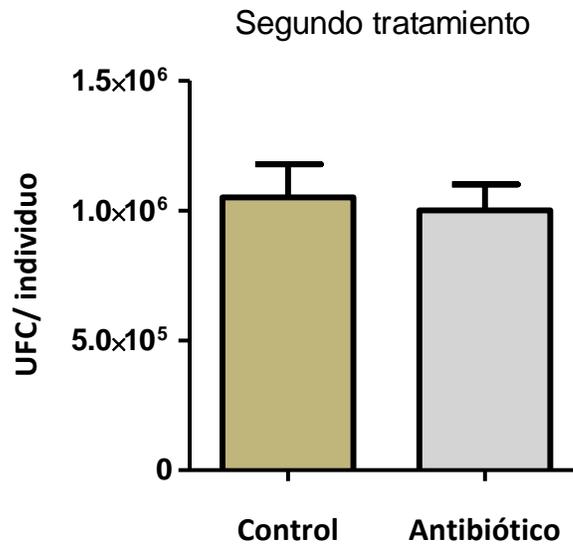


Figura 21. Unidades formadoras de colonia obtenidas de machos alimentados durante 12 días con kanamicina, tetraciclina y rifampicina a 150 µg/ml. Se muestran las barras con la media ± el error estándar $P > 0.05$ (Prueba de T). Se realizaron seis réplicas de cada condición.

En este segundo tratamiento se quería evaluar la posibilidad de que bacterias que no se pudieron cultivar pero que fueran susceptibles a la rifampicina produjeran un desequilibrio en la microbiota al ser eliminadas. La rifampicina en nuestras pruebas, no fue de los antibióticos más eficientes, pero se ha administrado a varios insectos con resultados satisfactorios (20). Sin embargo en nuestros experimentos no se observó diferencia significativa en las UFC formadas entre ambos tratamientos (Control y coctel).

En el tercer y último tratamiento se administraron nuevamente los antibióticos kanamicina, tetraciclina y estreptomicina a una concentración de 150 µg/ml. Con este coctel al igual que en el primer tratamiento el número de bacterias se redujo significativamente (**Figura 22**).

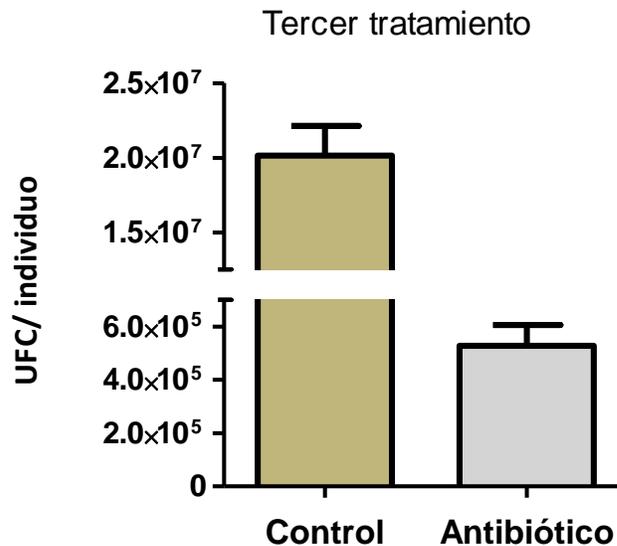


Figura 22. Unidades formadoras de colonia obtenidas de machos alimentados durante 12 días con kanamicina, tetraciclina y estreptomicina a 150 µg/ml. Se muestran las barras con la media \pm el error estándar $P < 0.001$ (Prueba de T). Se realizaron seis réplicas de cada condición.

Los tres tratamientos anteriores se realizaron en fechas diferentes, por lo tanto se utilizaron moscas de diferentes generaciones. Sobre el tiempo de tratamiento con antibiótico se eligieron 12 días ya que en este tiempo es cuando los machos y hembras alcanzan la madurez sexual. Al finalizar el periodo de tratamiento y en los dos días siguientes se llevaron a cabo las pruebas de elección femenina, que se realizaron siempre en el mismo lugar y a la misma hora.

Pruebas de elección femenina

Después de los 12 días de alimentación con antibiótico y sabiendo que hay una reducción significativa en el número de bacterias presentes en los machos del primer y tercer tratamiento, se realizaron las pruebas de elección femenina.

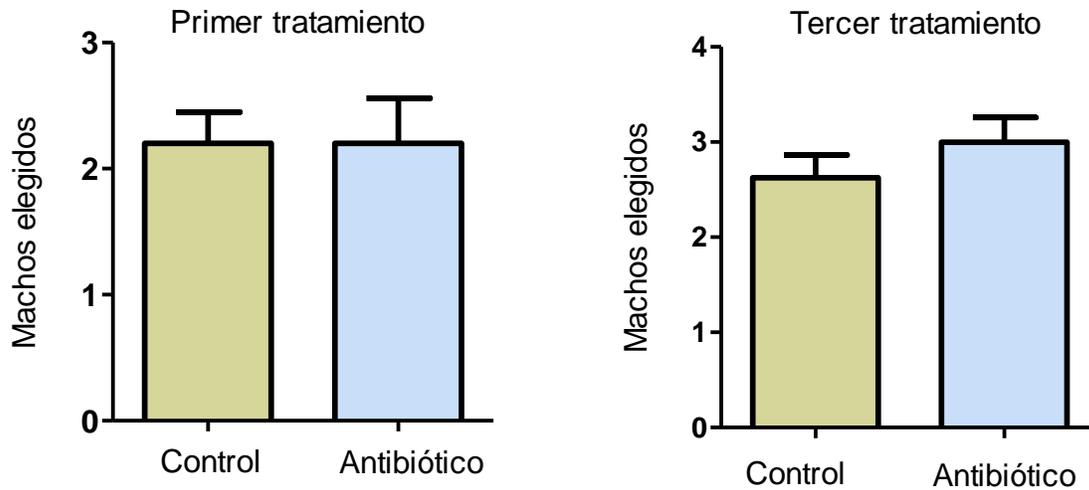


Figura 23. Resultados de las pruebas de elección femenina. En la gráfica de la izquierda se muestran los datos de la primera alimentación, en la que se realizaron 10 réplicas. En la gráfica de la derecha se muestran los datos correspondientes a 16 réplicas. Se muestran las barras con la media \pm el error estándar $P > 0.05$ (prueba de T)

A pesar de que el tratamiento con antibiótico redujo significativamente el número de bacterias presentes en los machos esto no afectó elección femenina, lo que indica que las hembras no tienen una preferencia hacia un macho alimentado o no con antibiótico.

En un trabajo similar pero realizado en la mosca del Mediterráneo se alimentó a los machos con ciprofloxacino (10 $\mu\text{g/ml}$) y piperacilina (200 $\mu\text{g/ml}$) y al igual que en nuestros experimentos este tratamiento no eliminó totalmente las bacterias presentes, pero sí tuvo un efecto significativo en la latencia a la cópula. Esto significa que los machos alimentados con antibiótico tardaron más tiempo en iniciar la cópula en comparación con los machos control (36).

Al ser la hembra la que elige con que macho copular, la medición de la latencia también refleja elección femenina. Nosotros decimos ir de lo general a lo particular y por lo tanto evaluar el efecto final del cortejo del macho, es decir la elección femenina. Si en los resultados de elección se hubiera visto alguna preferencia de la hembra, se podría iniciar a buscar la causa de ello. La medición de la latencia podría haber sido un buen parámetro para iniciar.

En nuestros experimentos, los antibióticos se administraron a los machos adultos desde el primer hasta el doceavo día de edad, lo que significa que durante los estadios previos (huevo, larva y pupa), estos individuos convivieron normalmente con sus bacterias. Esto último representa un punto importante ya que existe evidencia que indica que la ausencia de los microorganismos desde etapas tempranas del desarrollo tiene efectos adversos en sus hospederos.

En la mosca Tse-Tse por ejemplo la ausencia de su simbiote *Wigglesworthia glossinidia* desde el estadio de larva se ve reflejado en una menor respuesta inmune en comparación con moscas que mantienen a su simbiote (12), mientras que en la chinche *Eurygaster integriceps*, se observó que la alimentación de los padres con antibiótico tiene efectos negativos en su descendencia, ya que ocasiona un desarrollo más lento de los insectos. Resultados similares se observaron cuando en lugar de administrar antibióticos los huevecillos se esterilizaron superficialmente (66).

Un tercer trabajo que relaciona la importancia de las bacterias con el desarrollo de su hospedero es el realizado en *C. capitata*, en esta mosca a la adición de *K. pneumoniae*, *Enterobacter* spp y *C. freundii* a la dieta de larvas se vio reflejada un aumento en la longitud de la cabeza, tórax y abdomen de los machos. Adicionalmente ellos resultaron ser más atractivos para las hembras (67). Investigaciones previas han demostrado que el tamaño de las estructuras corporales son un carácter sexual que toman en cuenta las hembras para la elección de pareja (68), por lo tanto esto puede ser la explicación de porqué esos machos fueron preferidos por las hembras.

Otro aspecto por medio del que los microorganismos cambian la elección sexual de su hospedero es mediante la producción y/o modificación de sustancias químicas, esto se observó en *D. melanogaster* donde la presencia *Lactobacillus plantarum* modificó la proporción de hidrocarburos cuticulares, que son compuestos conocidos por actuar como feromonas (26).

Los reportes anteriores nos llevan a proponer que si en *A. ludens* se eliminaran las bacterias desde estadios tempranos, los resultados de elección femenina podrían ser diferentes a los obtenidos en el presente trabajo.

Una estrategia alternativa al uso de antibióticos para eliminar a las bacterias es la desinfección superficial del huevo. Esto se puede hacer con hipoclorito de sodio. Después de la desinfección estos huevos se pueden transferir a viales bajo condiciones estériles hasta la emergencia del adulto. La finalidad de esta metodología es evitar que los insectos convivan con sus bacterias desde estadios tempranos.

Una segunda alternativa para evaluar el efecto de las bacterias puede ser mediante su adición a la dieta de las larvas. Los microorganismos elegidos para realizar este experimento pueden ser los pertenecientes a la familia Enterobacteriaceae que sabemos son fijadores de nitrógeno. Adicionalmente, se pueden incluir bacterias pectinolíticas y uricolíticas. La alimentación con estas bacterias podría contribuir a un buen desarrollo del insecto que es un parámetro importante que toman en cuenta las hembras para elegir a su pareja (66, 67).

Otros microorganismos asociados con *A. ludens*

Asociados a los insectos no solamente se encuentran bacterias también pueden estar presentes levaduras. En nuestro caso, cuando se inoculó en el medio de cultivo el homogenizado proveniente de larvas silvestres (Taltizapán y Tetela del Volcán), se observaron colonias que se asemejaban morfológicamente a levaduras y al realizar una tinción de Gram esta sospecha fue comprobada.

A pesar de que no forma parte de los objetivos de este proyecto se decidió identificar estas levaduras. La identificación se realizó mediante la amplificación del gen ITS. De acuerdo a las secuencias obtenidas, en las larvas de Tétela del Volcán se identificaron levaduras de los géneros *Hanseniaspora* y *Pichia*, mientras que en las de Taltizapán únicamente se identificó *Hanseniaspora* sp (**Figura 24**). Ambos géneros de levaduras se han aislado de adultos de *Drosophila suzukii*. (69). Adicionalmente también se sembró el jugo proveniente de naranjas infestadas con larvas y en este también se identificó *Pichia* sp

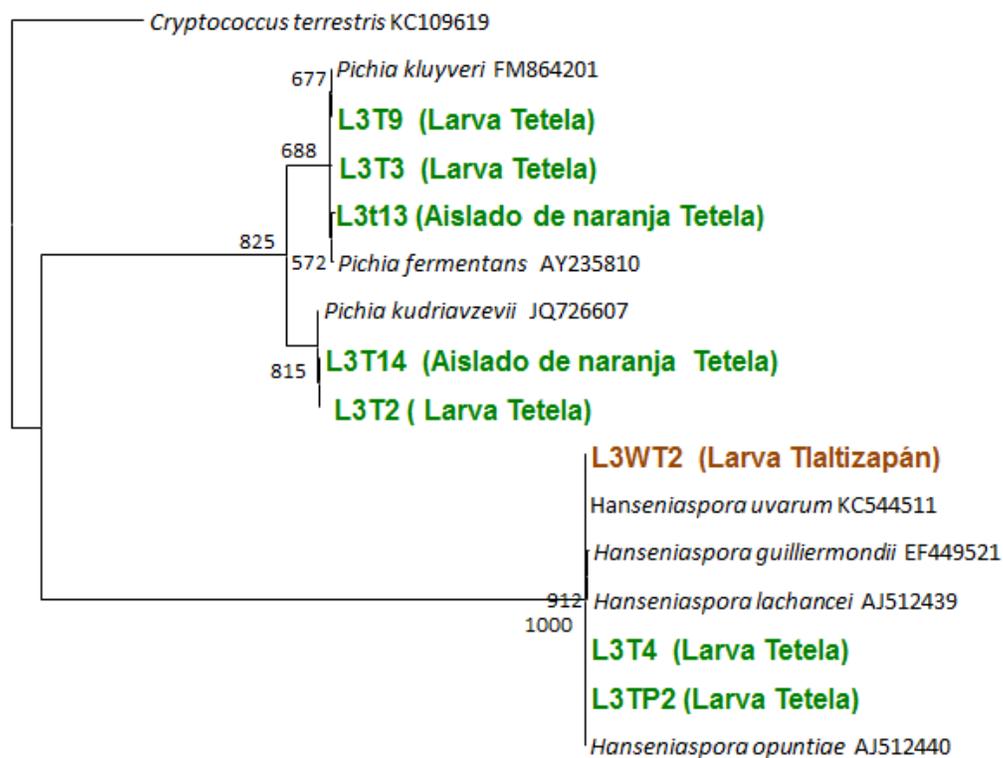


Figura 24. Árbol de máxima verosimilitud –lnl 1947.38031 del gen ITS1 de las levaduras asociadas a larvas de *A. ludens* silvestres, el modelo utilizado fue HKY85. La secuencia de *C. terrestris* se utilizó como grupo externo.

En los insectos se ha propuesto que las levaduras contribuyen en la nutrición de sus hospederos, mediante el aporte de vitaminas y lípidos, además, las enzimas de las levaduras favorecen la degradación de carbohidratos como lignina, celulosa y pectina lo que facilita el aprovechamiento de estas moléculas por parte del insecto. A pesar de los aportes benéficos de los hongos a sus hospederos la interacción entre estos dos organismos no ha sido muy investigada entre otras cosas debido a la preferencia que se tiene hacia el estudio de las bacterias (9).

CONCLUSIONES

- Se identificaron bacterias asociadas a la mosca mexicana de la fruta de las clases Gama Proteobacteria, Firmicutes, Actinobacteria, Beta Proteobacteria y Alfa Proteobacteria
- La familia Enterobacteriaceae se encontró presente en dos poblaciones de moscas silvestres y una población mantenida en laboratorio.
- Las bacterias asociadas a la mosca mexicana de la fruta presentan actividad pectinolítica, uricolítica y de fijación de nitrógeno en cultivo.
- Asociadas a larvas silvestres se identificó la presencia de levaduras de los géneros *Pichia* sp y *Hanseniaspora* sp.
- Un tratamiento con antibióticos cambió la proporción y composición de las bacterias asociadas a los machos de la mosca mexicana de la fruta pero no afectó la elección femenina.

PERSPECTIVAS

En este trabajo se identificaron las bacterias asociadas a las diferentes etapas de la mosca *A. ludens*. Esto se realizó principalmente en una población de moscas de laboratorio, sin embargo, también se estudiaron algunos individuos silvestres.

A pesar de que el objetivo de esta tesis no fue una comparación entre poblaciones, creemos que sería enriquecedor coleccionar más individuos silvestres, para así aumentar el número de aislados bacterianos. Con esto además de completar los estadios faltantes se podría hacer una comparación más estricta entre las diferentes poblaciones.

Respecto a la función de las bacterias asociadas con *A. ludens*. Los resultados obtenidos así como la literatura existente nos muestran que estos microorganismos participan en la fijación de nitrógeno. Este es un aspecto que podría continuar investigándose, especialmente determinar si las bacterias pueden fijar nitrógeno *in vivo*, tal y como se observó en la mosca del Mediterráneo.

Finalmente, para evaluar la importancia de las bacterias en la elección femenina sería interesante realizar estas pruebas pero con moscas axénicas. Esto con la finalidad de que los insectos no convivan con sus bacterias desde estadios tempranos de desarrollo. Lo que se ha visto tiene un efecto significativo en el desarrollo del hospedero.

ANEXO I: Ensayo de hibridación *in situ*

Durante la asistencia al taller teórico-práctico “Intensive Workshop on Microscopy and Fluorescent *in situ* Hybridization on bacterial cells in insect tissues” realicé un ensayo de FISH utilizando cortes de intestino de macho de *A. ludens*.

A partir de estos cortes se realizaron tres tratamientos, el primero consistió en teñir únicamente los tejidos con DAPI que es un fluoróforo que se une a regiones ricas de A-T del ADN.

La finalidad de esta tinción es la de observar la integridad del tejido además de que nos permite evaluar si nuestro tejido presenta auto fluorescencia a la longitud de onda con la que posteriormente se excitara el fluoróforo de la sonda. En nuestro caso no se observó auto fluorescencia del tejido a esta longitud de onda (**Figura 25**).

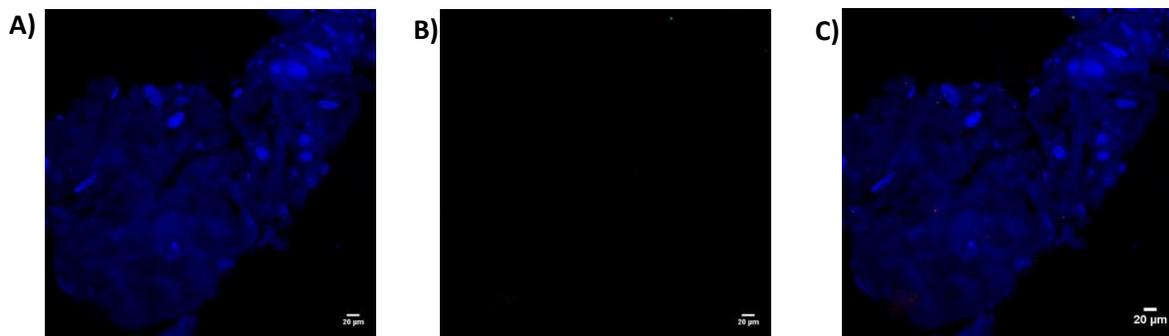


Figura 25. Cortes del intestino medio de *A.ludens* de 10 µm A) Corte teñido con DAPI, B) Corte observado a longitud de onda de emisión del fluoróforo Alexa 647. C) Sobrelapamiento de las dos imágenes anteriores.

El segundo tratamiento consistió en teñir los cortes con DAPI pero también hibridarlos con la sonda para eubacterias marcada con el fluoróforo Alexa 647 (**Figura 26**). En las imágenes se observa la fluorescencia que resulta de la hibridación de la sonda con su respectiva secuencia blanco.

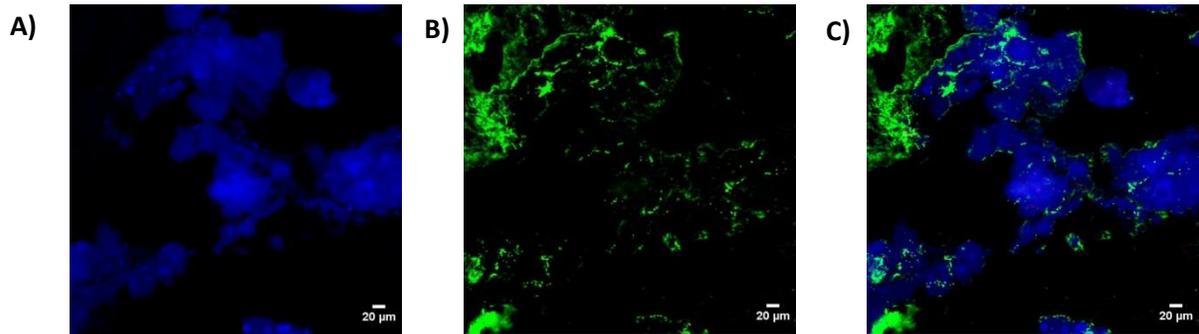


Figura 26. Cortes del intestino medio de *A. ludens* de 10 µm. A) Teñido con DAPI (azul), B) Hibridado con la sonda para eubacterias (verde). C) Sobrelapamiento de las imágenes A y B.

En el último tratamiento los cortes se incubaron en presencia de RNAasa y posteriormente fueron hibridados con la sonda y teñidos con DAPI. El resultado de este tratamiento es una degradación del ARN, lo que ocasiona que un menor número de moléculas de sonda se unan a su secuencia blanco, por lo tanto debe de haber una disminución en la fluorescencia, tal y como se observa en la **Figura 27**.

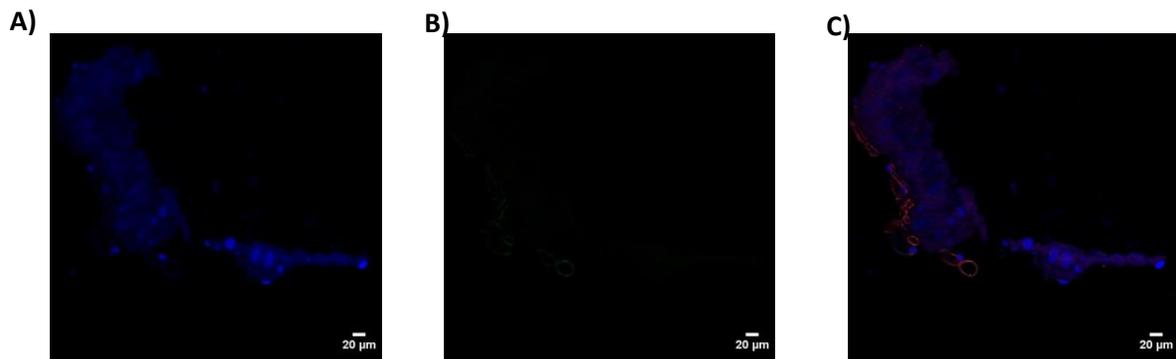


Figura 27. Cortes del intestino medio de *A. ludens* de 10 µm en presencia de RNAasa A) Teñido con DAPI. B) Hibridado con la sonda para eubacterias. C) Sobrelapamiento de las imágenes A y B.

Las imágenes anteriores nos muestran que existen bacterias asociadas al intestino medio de machos de *A. ludens*. Este es un resultado que se esperaba, ya que previamente Lauzon y Potter en el 2012 mediante microscopía electrónica reportaron la presencia de bacterias en el intestino de *A. ludens* (70). Por otra parte, en la mosca del Mediterráneo por medio de FISH también se observó la presencia de bacterias en el intestino (54).

Para *A. ludens* no se han reportado imágenes previas de FISH, sin embargo deberían realizarse, ya que con la información que se obtenga a partir de ellas se puede comprender mejor la transmisión y colonización de las bacterias en su hospedero, además de que se puede seguir en espacio y tiempo la presencia de un grupo determinado de bacterias al usar sondas específicas

REFERENCIAS

1. Moran, N. A. Symbiosis. 2006. *Current Biology*. 16(20): 866-871.
2. Zimmer, C. On the origin of eukaryotes. 2014. *Science*. 325(5941): 666-668.
3. Sapp, J. (1994). *Evolution by association a history of symbiosis*. New York: Oxford University Press. pp. 2-20. ISBN 0195088212.
4. Dillon, R. J., Dillon, V. M. The gut bacteria of insects: nonpathogenic interactions. 2004. *Annual Review of Entomology*. 49(98): 71-92.
5. Mayhew, P. J. Why are there so many insect species? Perspectives from fossils and phylogenies. 2007. *Biological Reviews*. 82(3): 425-454.
6. Engel, P., Moran, N. The gut microbiota of insects-diversity in structure and function. 2013. *FEMS Microbiology Reviews*. 37(5): 699-735.
7. Buchner P. (1965). *Symbiosis with fungi and in Endosymbiosis of animals with plant microorganisms*. New York: John Wiley & Sons, Inc. pp. 23-33. ISBN 0470115173.
8. Weiss, B., Aksoy, S. Microbiome influences on insect host vector competence. 2011. *Trends in Parasitology*. 27(11): 514-522.
9. Gibson, C., Hunter, M. Extraordinarily widespread and fantastically complex: comparative biology of endosymbiotic bacterial and fungal mutualists of insects. 2010. *Ecology Letters*. 13(2): 223-234.
10. Douglas, A. "Can't live without you": essential animal-bacterial relationships. 2012. *Microbe*. 7(6): 273-277.
11. Ezenwa, V. O., Gerardo, N. M., Inouye, D. W., Medina, M., Xavier, J. B. Animal behavior and the microbiome. 2012 *Microbiology*. 338(6104): 198-199.
12. Weiss, B., Wanj, J., Aksoy, S. Tsetse immune system maturation requires the presence of obligate symbionts in larvae. 2011. *PloS Biology*. 9(5): 1-12.
13. Clark, E. L., Karley, A. J., Hubbard, S. F. Insect endosymbionts: manipulators of insect herbivore trophic interactions?. 2010. *Protoplasma*. 224(1-4): 25-51.
14. Bennett, G. M., Moran, N. A. Small, smaller, smallest: the origins and evolution of ancient dual symbioses in a phloem-feeding insect. 2013. *Genome Biology and Evolution*. 5(9): 1675-1688.
15. Snyder, A. K., McLain, C., Rio, R. V. M. The tsetse fly obligate mutualist *Wigglesworthia morsitans* alters gene expression and population density via exogenous nutrient provisioning. 2012. *Applied and Environmental Microbiology*. 78(21): 7792-7797.
16. Erkosar, B., Leulier, F. Transient adult microbiota, gut homeostasis and longevity: novel insight from *Drosophila* model. 2014. *FEBS Letters*. 588(22): 4250-7
17. Hosokawa, T., Kikuchi, Y., Shimada, M., Fukatsu, T. Symbiont acquisition alters behavior of stinkbug nymphs. 2007. *Biology Letters*. 4(1): 45-48.
18. Douglas, A. The microbial dimension in insect nutritional ecology. 2009. *Functional Ecology*. 23(1): 38-47.
19. Engel, P. Martinson, V. G., Moran, N. A. Functional diversity within the simple gut microbiota of the honey bee. 2012. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*. 109(27): 11002-11007.
20. Kashima, T., Nakamura T., Tojo, S. Uric acid recycling in the shield bug, *Parastrachia japonensis* (Hemiptera: Parastrachiidae), during diapause. 2006. *Journal of Insect Physiology*. 52(8): 816-825.
21. Kikuchi, Y., Hayatsu M., Hosokawa, T., Nagayama A., Tago, K. Symbiont-mediated insecticide resistance. 2012. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*. 109(22): 8618-8622.

22. Rohrseheid, C. H., Brownlie, J. C. Microorganisms that manipulate complex animal behavior by affecting the host nervous system. 2013. *Springer Science Reviews*. 1: 133-140.
23. Archie, E. A., Theis, K. R. Animal behaviour meets microbial ecology. 2011. *Animal Behavior*. 82(3): 425-436.
24. Theis, K.R., Venkataraman A., Dycus, J. A., Koonter, K. D., Schmitt-Matzen, E.N., Wagner, P.A., Holekamp, K. E., Schmidt, T. M. Bacteria appear to mediate hyena social odors. 2013. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*. 110(49): 19832-19837
25. Martin-Vivaldi, M., Cabrero, J. (2003). Selección sexual. Ed por Soler M. *Evolución la base de la biología*. Granada: S.A.L. Proyecto sur de ediciones. pp. 235-259. ISBN 8482541390.
26. Sharon, G., Segal D., Ringo, J. M., Hefetz, A., Zilber-Rosenberg, I. Rosenberg, E. Commensal bacteria play a role in mating preference of *Drosophila melanogaster*. 2010. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*. 107 (46): 2051-2056.
27. Himler, A. G., Adachi-Hagimori, T., Bergen, J. E. Kozuch, A., Kelly, S. E., Tabashnik, B. E., Chiel E Duckworth, V. E., Dennehy, T. J., Zchori-Fein, E., Hunter, M. S. Rapid Spread of a bacterial symbiont in an invasive whitefly driven by fitness benefits and female bias. 2011. *Science*. 332(6026): 254-256.
28. Tsuchida, T., Koga, R., Horikawa, M., Tsunoda, T., Maoka, T., Matsumoto, S., Simon, Jean-Christophe., Fukatsu, T. Symbiotic bacterium modifies aphid body color. 2010. *Science*. 330(6007): 1102-1104.
29. Aluja, M., Piñero J., Jacome, I., Díaz-Fleischer, Sivinsky, J. (2001). Behaviour of flies in the genus *Anastrepha* (Trypeninae: Toxytripanini). Eds Aluja, M., Norrbom A. *Fruit Flies (Tephritidae) phylogeny and evolution of behavior*. Washington: CRC Press. pp 375-406. ISBN 0849312752.
30. Loera, J. J. Ficha técnica de *Anastrepha ludens* (Loew). Recuperado el 23 de abril del 2014 de: https://www.google.com.mx/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=1&ved=0CC0QFJAA&url=http%3A%2F%2Fwww.senasica.gob.mx%2Fincludes%2Fasp%2Fdownload.asp%3FIdDocumento%3D19753%26IdUrl%3D31548&ei=jlRYU8_KJcGe2QX8mYDgAg&usq=AFQjCNGI_ii4V2AcAgYn7fDZZ3Hd9npqCQ&sig2=dfjEByJK3gaVRP8y1Lhtgw.
31. Arita, L. H., Kaneshiro, K. Y., Sexual selection and lek behavior in the mediterranean fruit fly, *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae). 1989. *Pacific Science*. 43(2): 135-143.
32. Segura, D., Petit-Marty, N. Sciarano, R., Vera, T., Calcagno, G., Allinghi, A., Gomez, P., Cladera, J., Villardi, J. Lekking behavior of *Anastrepha fraterculus* (Diptera: Tephritidae). 2007. *Florida Entomologist*. 90(1): 154-162.
33. Lauzon, C. R. (2003). Symbiotic relationships of tephritids. Eds Bourtiz, K., Miller, T. A. *Insect Simbiosis* Florida: CRC Press. pp 115-125. ISBN. 0849312868
34. Behar, A., Yuval, B., Jurkevitch, E., Enterobacteria-mediated nitrogen fixation in natural populations of the fruit fly *Ceratitis capitata*. 2005. *Molecular Ecology*. 14(9): 2637–2643.
35. Behar, A., Jurkevitch, E., Yuval, B. Bringing back the fruit into fruit fly-bacteria interactions. 2008. *Molecular Ecology*. 17(5) 1357-1386.
36. Ben-Yosef, M., Jurkevitch, E., Yuval, B. Effect of bacteria on nutritional status and reproductive success of mediterranean fruit fly *Ceratitis capitata*. 2008. *Physiological Entomology*. 33(2): 145-154
37. Kaya, H., Tanada, Y., Vega, F. (1992). *Insect Pathology*. United Kingdom: Academic Press. ISBN. 0126832552

38. Capuzzo, C., Firrao, G., Mazzon, L., Squartini, A., Girolami, V. "Candidatus *Erwinia dacicola*", a coevolved symbiotic bacterium of the olive fly *Bactrocera oleae* (Gmelin). 2005. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 55(4): 1641-1647
39. Kuzina, L. V., Peloquin, J. J., Vacek, D. C., Miller, T. A. Isolation and identification of bacteria associated with adult laboratory mexican fruit flies, *Anastrepha ludens* (Diptera:Tephritidae). 2001. *Current Microbiology*. 42(4): 290-294.
40. Martinez, H., Toledo, J., Liedo, P., Mateos, M. Survey of heritable endosymbionts in southern Mexico populations of the fruit fly species *Anastrepha striata* and *A.ludens*. 2012. *Current Microbiology*. 65(6): 711-718.
41. Martinez, A. J., Robacker, D. C., Garcia, J. A., Esau, K. L. Laboratory and field olfactory attraction of the Mexican fruit fly (Diptera: Tephritidae) to metabolites of bacterial species. 1994. *The Florida Entomologist*. 77(1): 117-126.
42. Robacker, D. C., Warfield, W. C., Albach R.F. Partial characterization and HPLC isolation of bacteria-produced attractants for the Mexican fruit fly, *Anastrepha ludens*. 1993. *Journal of Chemical Ecology*. 19(3): 543-557.
43. Hoffmant, C.S., Whinston, F. A ten minute DNA preparation from yeast afficiently releases autonomous plasmids for transformation of *Escherichia coli*. 1987. *Gene*. 57(2-3): 267-272
44. Lopez L., Lopez J., Antonio E., Santiago G., Gutierrez J., Hernandez R. Guía de campo para el reconocimiento de moscas de la fruta del género Anastrepa. Recuperado el 14 de junio del 2014 de <http://nucleus.iaea.org/sites/naipc/twd/Documents/FFN27/10Guia%20reconocimiento%20genero%20Anastrepha.pdf>
45. Hall, T, A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for windows 95/98/NT. 1999. *Nucleic Acids Symposium Series*. 41: 95-98.
46. Gouy, M., Guindon, S., Gascuel, O. SeaView version 4: a multiplatform graphical user interface for sequence alignment and phylogenetic tree building. 2010. *Molecular Biology and Evolution* 27(2):221-224.
47. Larkin, M, A., Blackshields, G., Brown, N, P., Chenna, R., McGettigan, P, A., McWilliam, H., Valentin, F., Wallace, I, M., Wilm, A., Lopez, R., Thompson, J, D., Gibson, T, J., Higgins, D, G. Clustal W and Clustal X version 2.0. 2007. *Bioinformatics*. 23(21): 2947-2948.
48. Darriba, D., Taboada, G, L., Doallo, R., Posada, D. jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. 2012. *Nature Methods*. 9(8): 772.
49. Guindon, S., Dufayard, J.F., Lefort, V., Anisimova, M., Hordijk, W., Gascuel, O. New algorithms and methods to estimate maximum-likelihood phylogenies: assessing the performance of PhyML 3.0. 2010. *Systematic Biology*. 59(3): 307-321.
50. Schloss, P, D., Handelsman, J. Introducing mothur: open-source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities. *Applied and Environmental Microbiology*. 2009. 75(23): 7537-41.
51. Harrison C., Langdale J. A step by step guide to phylogeny reconstruction. 2006. *The Plant Journal*. 45(4). 561-572
52. Koga, R., Tsuchida, T., Fukatsu, T. Quenching autofluorescence of insect tissues for *in situ* detection of endosymbionts. 2009. *Applied Entomology and Zoology*. 44(2):281-291.
53. Abramoff, M, D., Magalhaes, P, J., Ram, S, J. Image processing with imageJ. 2004. *Biophotonics International*. 11(7): 36-42.

54. Aharon, Yael., Pasternak, Z., Yosef, B., Behar, A., Lauzon, C., Yuval, B., Jurkevitch, E. Phylogenetic, metabolic, and taxonomic diversities shape mediterranean fruit fly microbiotas during ontogeny. 2013. *Applied and Environmental Microbiology*. 79(1): 303-313.
55. Kaltenpoth, M. Actinobacteria as mutualists: general healthcare for insects? 2009. *Trends in Microbiology* 17(12): 529-535
56. Morales-Jiménez, J. Zúñiga, G., Ramírez-Saad, H. C., Hernández-Rodríguez, C. Gut-associated bacteria throughout the life cycle of the bark beetle *Dendroctonus rhizophagus* Thomas and Bright (Curculionidae: Scolytinae) and their cellulolytic activities. 2012. *Microbial Ecology*. 64(1): 268-278.
57. Chavshin, A.R., Oshaghi, M. A., Vatandoost, H., Pourmand, M. R. Raeisi, A., Enayati, A. A., Mardani, N., Ghoorchian, S. Identification of bacterial microflora in the midgut of the larvae and adult of wild caught *Anopheles stephensi*: a step toward finding suitable paratransgenesis candidates. 2012. *Acta Tropica*. 121(2): 129-134.
58. Behar, A., Yuval, B., Jurkevitch, E. Gut bacterial communities in the Mediterranean fruit fly (*Ceratitis capitata*) and their impact on host longevity. 2008. *Journal of Insect Physiology*. 54(9): 1377-1383.
59. Stoffolano, J. G., Haselton, A. T. The adult Dipteran crop: a unique and overlooked organ. 2013. *The Annual Review of Entomology*. 58: 205-225.
60. Hernández, R., Cafaro, M. J. *Paratrechina longicornis* ants in a tropical dry forest harbor specific actinobacteria diversity. 2014. *Journal of Basic Microbiology*. 54: 1-11.
61. Lozupone, C. A., Knight, R. Species divergence and the measurement of microbial diversity. 2008. *FEMS Microbiology Reviews*. 32(4): 557-578.
62. Kim, M., Oh, HS., Park, SC., Chun, J. Towards a taxonomic coherence between average nucleotide identity and 16S rRNA gene sequence similarity for species demarcation of prokaryotes. 2014. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 64(2): 346-351.
63. Janda, J. M., Abbott, S. 16S rRNA gene sequencing for bacterial identification in the diagnostic laboratory: pluses, Perils, and pitfalls. 2007. *Journal of Clinical Microbiology*. 45(9): 2761-2764.
64. French, J. R., Turner, G. L., Bradbury, J. E. Nitrogen fixation by bacteria from the hindgut of termite. 1976. *Journal of General Microbiology*. 96(2): 202-206
65. Zhang, L., Xian-Zhi, L., Poole K. Multiple antibiotic resistance in *Stenotrophomonas maltophilia*: involvement of a multidrug efflux system. 2000. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 44(2): 287-293.
66. Kafil, M., Bandani, R. A., Kaltenpoth, M., Goldansaz, S. H., Alavi, S.M. Role of symbiotic bacteria in the growth and development of the Sunn pest, *Eurygaster integriceps*. 2013. *The Journal of Insect Science*. 13: 1-12
67. Hamdem, H., Guerfall, M. M., Fadhl, S. Saidi, M., Chevrier, C. Fitness improvement of mass-reared sterile males of *Ceratitis capitata* (Vienna 8 strain) (Diptera: Tephritidae) after gut enrichment with probiotics. 2013. *Biological and Microbial Control*. 106(2): 641-647.
68. Rodriguero, M. S., Villardi, J. C., Vera, M. T., Cayol, J. P., Rial, E. Morphometric traits and sexual selection in medfly (Diptera: Tephritidae) under field and cage conditions. 2002. *Florida Entomologist*. 85(1): 143-149.
69. Hamby, K. A., Hernandez, A., Boundy-Mills, K., Zalom, F.G. Associations of yeasts with spotted-wing *Drosophila* (*Drosophila suzukii*; Diptera: Drosophilidae) in cherries and raspberries. 2012. *Applied and Environmental Microbiology*. 78(14): 4869-4873.

70. Lauzo, C. R., Potter, S. E. Description of the irradiated and nonirradiated midgut of *Ceratitis capitata* Wiedemann (Diptera: Tephritidae) and *Anastrepha ludens* Loew (Diptera: Tephritidae) used for sterile insect technique. 2012. *Journal of Pest Science*. 85(2): 217–226.