

PREVALENCIA DE *Wolbachia* EN HEMBRAS DE *Anastrepha serpentina* Wied. (DIPTERA: TEPHRITIDAE) DE MÉXICO

Brenda M. Morán-Aceves¹✉, Humberto Martínez-Montoya², Rodolfo Torres-De los Santos³, G. Karina Guillén-Navarro⁴, Azucena Oropeza-Cabrera¹ y Jorge Toledo¹

¹Departamento de Agricultura, Sociedad y Ambiente. El Colegio de la Frontera Sur (ECOSUR). Unidad Tapachula. Carretera Antiguo Aeropuerto Km .2.5. Col. Centro. C. P. 30700. Tapachula, Chiapas, México.

²Universidad Autónoma de Tamaulipas. Unidad Académica Multidisciplinaria Reynosa, Aztlán. Reynosa, Tamaulipas México.

³Instituto de Biociencias, Universidad Autónoma de Chiapas, Boulevard Príncipe Akishino s/n, Col. Solidaridad. C. P. 2000. Tapachula, Chiapas, México.

⁴Departamento Ciencias de la Sustentabilidad. Biotecnología Ambiental. El Colegio de la Frontera Sur (ECOSUR). Unidad Tapachula. Carretera Antiguo Aeropuerto Km .2.5. Col. Centro. C. P. 30700. Tapachula, Chiapas, México.

✉ Autor de correspondencia: breyma16@hotmail.com

RESUMEN. Se exploró la prevalencia de la bacteria endosimbiótica *Wolbachia* sp. en adultos de *Anastrepha serpentina* (Wied.) (Diptera: Tephritidae) obtenidos mediante un muestreo aleatorio de frutos establecidos en seis estados de la República Mexicana. Se detectó la presencia de la bacteria por la amplificación del gen de proteína de superficie de *Wolbachia* (Wsp) mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Se encontraron 15 hembras infectadas por *Wolbachia* de un total de 1,030 ejemplares que fueron analizados, arrojando una prevalencia de 15 % en la población colectada en Tuxtla Chico, Chiapas, 3.75 % de infección en el estado de Chiapas y de todas las poblaciones analizadas la prevalencia fue de 1.45 % de infección. Los resultados sugieren que la asociación de *A. serpentina* con *Wolbachia* no es común, debido a los bajos niveles de infección registrados en la población de Tuxtla Chico, Chiapas, y su ausencia en el resto de las poblaciones analizadas.

Palabras clave: Bacteria, endosimbionte, análisis moleculares, Wsp, infección.

Prevalence of *Wolbachia* in *Anastrepha serpentina* Wied. (Diptera: Tephritidae) females from Mexico

ABSTRACT. We explored the prevalence of the endosymbiotic bacteria *Wolbachia* sp. in adults of *Anastrepha serpentina* (Wied.) (Diptera: Tephritidae) obtained from fruits by a random sampling established in six states of Mexican Republic. The presence of the bacteria was detected by the amplification of the *Wolbachia* surface protein (Wsp) by the medium of the polymerase chain reaction (PCR). Fifteen females infected with *Wolbachia* of 1,030 females analyzed were found, with a prevalence of 15% in the population collected in Tuxtla Chico, Chiapas, 3.75% of infection in the state of Chiapas, and of all the populations analyzed the prevalence was 1.45% infection. The results suggest that the association of *A. serpentina* with *Wolbachia* is not common, due to the low levels of infection recorded for the population of Tuxtla Chico, Chiapas, and its absence in the rest of the populations analyzed.

Keywords: Bacteria, endosymbiont, molecular analysis, Wsp, infection.

INTRODUCCIÓN

En diferentes especies de artrópodos es común la presencia de bacterias endosimbióticas que se transmiten verticalmente entre sus hospedantes (Majerus, 1999) y horizontalmente entre sus conespecíficos y algunas especies aisladas reproductivamente (Rozo y Dussán, 2010); la relación que se dé entre estos organismos pueden provocar efectos positivos en la aptitud del huésped o alterar los procesos biológicos como la reproducción (Pérez *et al.*, 2010). Por ello, dichas interacciones han sido motivo de estudio donde la bacteria intracelular *Wolbachia* sp. ha generado interés, ya que se estima que infecta el 66 % del total de las especies de artrópodos (Hilgenboecker *et al.*, 2008). Esta bacteria se hospeda principalmente en los tejidos somáticos y reproductivos de sus hospedantes (Dobson *et al.*, 1999), se transmite verticalmente y su presencia provoca

alteraciones reproductivas como la partenogénesis (Stouthamer *et al.*, 1993), feminización del macho (Rigaud *et al.*, 1991), androcidio (male-killing) (Hurst *et al.*, 1999) e incompatibilidad citoplasmática (IC) (Hoffman y Turelli, 1997). Se ha documentado que esta bacteria se encuentra ampliamente distribuida en especies de tefrítidos de los géneros *Rhagoletis* (Riegler y Stauffer, 2002), *Ceratitidis* (Rocha *et al.*, 2005), *Bactrocera* (Kittayapong *et al.*, 2000), *Dacus* (Kittayapong *et al.*, 2000) y *Anastrepha* (Coscrato *et al.*, 2009, Martínez *et al.*, 2012).

Las moscas de la fruta del género *Anastrepha* (Diptera: Tephritidae) son consideradas una de las plagas más importantes de frutas y hortalizas en diversas regiones tropicales de América Latina (Aluja, 1994). En México, *Anastrepha serpentina* es una plaga de importancia agrícola que ocasiona pérdidas económicas en frutos de la familia *Sapotaceae* (Reyes *et al.*, 2000). Se ha reportado la presencia de *Wolbachia* en adultos de *A. serpentina* colectados en Sudamérica (Coscrato *et al.*, 2009; Prezotto, 2012). En México, se desconoce la presencia de esta bacteria en *A. serpentina*. El objetivo de este trabajo fue determinar la prevalencia de *Wolbachia* sp. en adultos de *A. serpentina* colectados en diferentes sitios de México.

MATERIALES Y MÉTODO

Se establecieron doce sitios de muestreo en seis estados de la República Mexicana: Tuxtla Chico, Chiapas (Lat. 14° 56' 12.97", Long. 92° 10' 1.76"), Raymundo Enríquez, Chiapas (Lat. 14° 51' 56.10", Long. 92° 18' 44.52"), Álvaro Obregón, Chiapas (Lat. 14° 55' 17.06", Long. 92° 22' 43.88"), Frontera Hidalgo, Chiapas (Lat. 14° 46' 31.19", Long. 92° 10' 34.87"), Apatzingán, Michoacán (Lat. 19° 4' 53.30", Long. 102° 21' 12.46"), Xalapa, Veracruz (Lat. 19° 32' 29.86", Long. 96° 54' 36.65"), Paso del macho, Veracruz (Lat. 18° 58' 1.78", Long. 96° 43' 25.11"), Paso del Toro, Veracruz (Lat. 19° 1' 50.62", Long. 96° 8' 7.69"), Ocuilco, Morelos (Lat. 18° 52' 39.65", Long. 98° 46' 26.17"), Chiná, Campeche (Lat. 19° 45' 43.58", Long. 90° 29' 35.64"), Villa Nueva, Oaxaca (Lat. 16° 33' 36.73", Long. 97° 49' 28.38"), Tuxtepec, Oaxaca (Lat. 18° 5' 6.37", Long. 96° 8' 39.67"). Los adultos silvestres de *A. serpentina* se obtuvieron por dos métodos; el primero, fue a partir de larvas de frutos infestados de zapote-mamey colectados en campo. Una vez que emergieron los adultos se separaron por sexo y se alimentaron hasta que alcanzaron la madurez sexual (14 días) (Toledo *et al.*, 2001).

El segundo método fue utilizando trampas Multilure® (Better World Manufacturing Inc., Fresno, CA) cebadas con atrayentes alimenticios para la captura de adultos silvestres. Los especímenes atrapados fueron previamente enjuagados con agua destilada estéril y posteriormente se depositaron en viales de vidrio con tapa (28 mm x 61 mm) con etanol al 96 %, se conservaron en un ultracongelador a -20 °C hasta su disección.

Cien hembras (a excepción de un sitio que solo fueron 30 hembras) de cada sitio de muestreo, de 14 días de edad fueron disectadas en condiciones asépticas. Los abdómenes de cada mosca fueron separados del tórax, los cuales fueron transferidos a tubos de micro centrifuga de 1.5 ml. Un total de 1,030 hembras silvestres (en los 12 sitios de muestreo) fueron disectadas.

La extracción del ADN total de cada mosca se realizó siguiendo el método de fenol/cloroformo/alcohol-isoamílico (Sambrook y Russell, 2001). Para ello, cada abdomen fue macerado agregando 500 µl de solución buffer de lisis [0.05M Tris pH 8.0, 0.3 NaCl, 0.005M EDTA y 2 % SDS] con un pistilo esterilizado. La calidad del ADN se analizó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1 %. La cuantificación y pureza del ADN se midió en un espectrofotómetro NanoDrop™ Lite Thermo Scientific considerando la relación de absorbancia (260/280 nm). Se realizó una PCR *touchdown* con los primers específicos para amplificar el gen de proteína de superficie de *Wolbachia* *Wsp81F* 5' TGG TCC AAT AAG TGA TGA AGA AAC TA 3' TM: 57.4 °C y *Wsp691R*. AAA AAT TAA ACG CTA CTC CAG CTT CT 3' (Zhou *et al.*,

1998), que amplificó un fragmento de ~600 pb. La amplificación se realizó en un volumen final de 20 μ l de reacción. Cada tubo de reacción contenía 4 μ l MgCl₂ [50mM], 2 μ l de Buffer 10x (Promega), 0.6 μ l [10pM] de primers *WspF* y *WspR*, 0.4 μ L dNTPs L [10 mM], 0.10 μ l Taq polimerasa [5u/ μ l] (Promega), y 120 ng de ADN. Los perfiles de temperatura comenzaron con una desnaturalización inicial del ADN a 94 °C por 2 min, seguido de 35 ciclos de amplificaciones y una extensión final a 72 °C durante 7 min. Los productos de PCR obtenidos se visualizaron en gel de agarosa al 1 % con SYBR® GREEN bajo iluminación UV con una migración a 80 mV durante 40 min.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se confirmó la calidad del ADN en geles de agarosa (Fig. 1). Se utilizó el método de PCR *touchdown* con el ADN obtenido y primers específicos para amplificar el gen de proteína de superficie de *Wolbachia*. Las muestras que amplificaron mostraron una banda definida de ~600 pb (Fig. 2). Las muestras de otras poblaciones arrojaron resultados negativos para la amplificación de dicho gen.

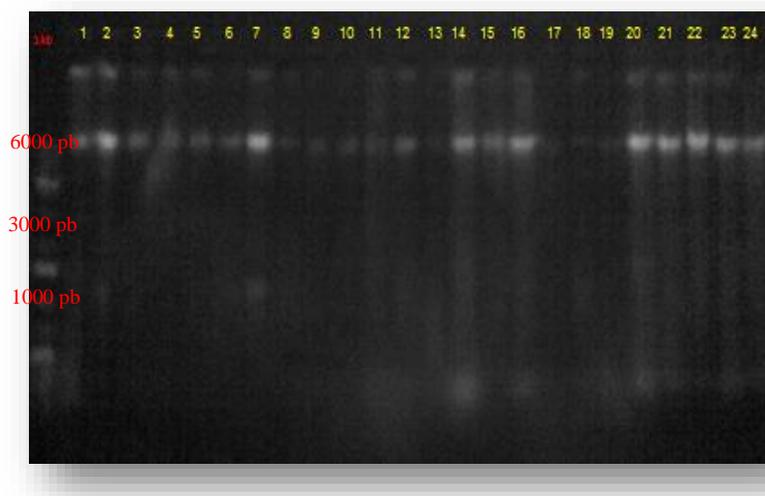


Figura 1. Calidad del ADN total obtenido del abdomen de moscas de *A. serpentina*. Carril inicial; marcador de tamaño molecular 1KB, 1-24; muestras de ADN total extraído de hembras silvestres.

Un total de 1,030 hembras de *A. serpentina* fueron analizadas para determinar la prevalencia de *Wolbachia*. De acuerdo con los resultados de la PCR se determinó que solamente 15 moscas de la población de Tuxtla Chico, Chiapas, registraron presencia de la bacteria (Fig. 2), representando 15% de infección en las moscas colectadas en esa región. Considerando a toda la población de Chiapas que fue analizada, la prevalencia fue de 3.75%. Este hecho indicó que aproximadamente el 98.55% de moscas de la población de *A. serpentina* de México está libre de infección de dicha bacteria. Si consideramos a todas las moscas analizadas la prevalencia de *Wolbachia* fue de 1.45%. Actualmente existe poca información sobre la prevalencia de endosimbiontes en tefritidos, particularmente en especies del género *Anastrepha*. Se ha reportado la presencia de *Wolbachia* en *A. serpentina* en Sudamérica (Coscrato *et al.*, 2009; Prezotto, 2012); sin embargo, no se reporta la prevalencia de la bacteria endosimbionte. De acuerdo con los resultados hubo presencia de la bacteria solamente en una población de las 12 poblaciones que fueron analizadas, arrojando una prevalencia de 1.45% en hembras silvestres de *A. serpentina*.

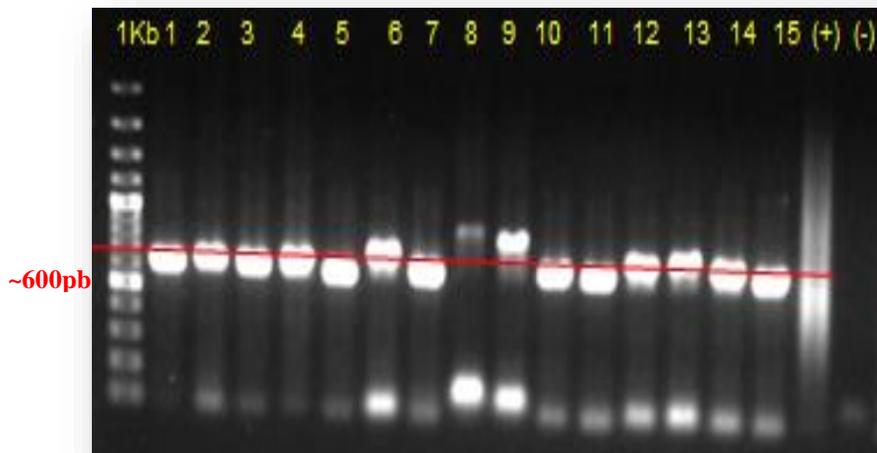


Fig. 2.- Amplificación por PCR *touchdown* del gen de proteína de superficie de *Wolbachia* (*Wsp*) de moscas de *A. serpentina*. Carril 1; Marcador de tamaño molecular 1KB, 1-15; Hembras silvestres de *A. serpentina* provenientes de Tuxtla Chico, Chiapas, México. 16; Control positivo de ADN de *A. striata*, 17; Control negativo.

Nuestros resultados se aproximan a lo reportado en poblaciones de dos biotipos diferentes de *Bemisia tabaci*, donde la tasa de infección fue de 1.54 % a 66.67 % en diferentes poblaciones de campo (Ji *et al.*, 2015). No obstante, que la prevalencia determinada en nuestro trabajo es baja comparada con lo reportado en poblaciones silvestres de otras especies de insectos. Zchori-Fein y Brown (2002), basados en el método de PCR y secuenciación del gen 16S rDNA, encontraron que el 33 % de las poblaciones de *B. tabaci* campo registraron infección por *Wolbachia*.

Una posible explicación de la baja prevalencia de la bacteria en adultos de *A. serpentina* puede ser por la presencia de antibióticos naturales, los factores climáticos como la temperatura, o a los niveles de densidad de la bacteria en el hospedante como se ha documentado en otros estudios (Majerus, 1999). Además se ha reportado que en mosquitos y moscas de la fruta ocurre una transmisión vertical incompleta de la bacteria. Adicionalmente, cuando se ha analizado la transmisión vertical tanto en laboratorio como en campo, se ha observado que en condiciones de campo la eficiencia de transmisión es menor (Majerus, 1999); aunado a que se desconoce la edad de los adultos analizados ya que fueron capturados en trampas.

CONCLUSIONES

Se confirmó la presencia de *Wolbachia* en solo una población silvestre de *A. serpentina* obtenida a partir de su fruto hospedero *Pouteria sapota*, colectado en Tuxtla Chico, Chiapas. No se encontró la presencia de *Wolbachia* en hembras de las otras poblaciones analizadas. Pero este hecho no indica que la bacteria no se encuentre o no pueda manifestarse en adultos procedentes de los otros sitios que fueron muestreados.

Se sugiere realizar estudios para la caracterización de la bacteria y esclarecer el tipo de interacción que tiene *Wolbachia* con hembras de *A. serpentina*.

Agradecimientos

A María de los Ángeles Palomeque Rodas, Luz Verónica García Fajardo y Uriel Gallardo-Ortiz (ECOSUR-UT), por su apoyo en las diferentes fases de ejecución de esta investigación.

Literatura Citada

- Aluja, M. 1994. Bionomics and management of *Anastrepha*. *Annual Review of Entomology*, 39: 155–178.
- Coscrato, V. E., Braz, A. S., Perondini, A. L. P., Selivon, D. and C. L. Marino. 2009. *Wolbachia* in *Anastrepha* fruit flies (Diptera: Tephritidae). *Current Microbiology*, 59: 295–301.
- Dobson, S. L., Bourtzis, K., Braig, H. R., Jones, B. F., Zhou, W., Rousset, F. and S. L. O'Neill. 1999. *Wolbachia* infections are distributed throughout insect somatic and germ line tissues. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 2: 153–160.
- Hilgenboecker, K., Hammerstein, P., Schlattmann, P., Telschow, A. and J. H. Werren. 2008. How many species are infected with *Wolbachia*?—a statistical analysis of current data. *FEMS Microbiology Letters*, 281: 215–220.
- Hoffman, A. A. and M. Turelli. 1997. Cytoplasmic incompatibility in insects. Pp. 42–81. In: S. L. O'Neill, A. A. Hoffman and J. H. Werren. (Eds.). *Influential passengers: Inherited microorganisms and arthropod reproduction*. Oxford University Press, Oxford.
- Hurst, G. D., Jiggins, F. M., Von Der Schulenburg, J. H. G., Bertrand, D., Stuart, A. W., Goriacheva, I. I., Zakharov, I. A., Werren, J. H., Stouthamer, R. and M. E. N. Majerus. 1999. Male-killing *Wolbachia* in two species of insect. *Proceedings B. Biological Sciences*, 266: 735–740.
- Ji, H. L., Qi, L. D., Hong, X. Y., Xie, H. F. and Y. X. Li. 2015. Effects of host sex, plant species, and putative host species on the prevalence of *Wolbachia* in natural populations of *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae): a modified nested PCR study. *Journal of Economic Entomology*, 108: 210–218.
- Kittayapong, P., Milne, J. R., Tigvattananont, S. and V. Baimai. 2000. Distribution of the reproduction-modifying bacteria, *Wolbachia*, in natural populations of tephritid fruit flies in Thailand. *Science Asia*, 26: 93–103.
- Majerus, M. E. N. 1999. Simbiontes hereditarios causantes de efectos deletéreos en los artrópodos. *Boletín de la Sociedad Entomológica Aragonesa*, 26: 777–806.
- Martínez, H., Toledo, J., Liedo, P. and M. Mateos. 2012. Survey of heritable endosymbionts in southern Mexico populations of the fruit fly species *Anastrepha striata* and *A. ludens*. *Current Microbiology*, 65: 711–718.
- Pérez, V., Latorre, A. and A. Moya. 2010. Extinción por reducción del genoma. *Investigación y Ciencia*, 410: 60–66.
- Prezotto, L. F. 2012. Tipificação de linhagens de *Wolbachia* do complexo *Anastrepha fraterculus* (Diptera: Tephritidae) da região neotropical por análise de locos múltiplos. Ph.D. Dissertation. Universidade de São Paulo. Brasil. 94 pp.
- Reyes, F., Santiago, M. G. and M. P. Hernández. 2000. The Mexican fruit fly eradication programme. Pp. 377–380. In: K. H. Tan. (Ed.). *Area-wide control of fruit flies and other insect pests*. Penerbit Universiti Sains Malaysia. Penang, Malaysia.
- Riegler, M. and C. Stauffer. 2002. *Wolbachia* infections and superinfections in cytoplasmically incompatible populations of the European cherry fruit fly *Rhagoletis cerasi* (Diptera, Tephritidae). *Molecular Ecology*, 11: 2425–2434.
- Rigaud, T., Souty-Grosset, C., Raimond, R., Mocquard, J. and P. Juchault. 1991. Feminizing endocytobiosis in the terrestrial crustacean *Armadillidium vulgare* Latr. (Isopoda): recent acquisitions. *Endocytobiosis and Cell Research*, 7: 259–273.
- Rocha, L. S., Mascarenhas, R. O., Perondini, A. L. P. and D. Selivon. 2005. Occurrence of *Wolbachia* in Brazilian samples of *Ceratitidis capitata* (Wiedemann) (Diptera: Tephritidae). *Neotropical Entomology*, 34: 1013–1015.
- Rozo, C. and J. Dussán. 2010. Análisis de transferencia horizontal de genes en ensayos de biorremediación con grasas recalcitrantes. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 12: 22–31.
- Sambrook, J. and D. Russell. 2001. *Molecular cloning: A laboratory manual*. 3rd. Ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, N. Y. 2344 pp.
- Stouthamer, R., Breeuwer, J. A. J., Luck, R. F. and Werren J. H. 1993 Molecular identification of microorganisms associated with parthenogenesis. *Nature*, 361: 66–68.

- Toledo, J., Bustos, M. E. y P. Liedo. 2001. Irradiación de naranjas infestadas por *Anastrepha ludens* (Loew) (Diptera: Tephritidae) como tratamiento cuarentenario. *Folia Entomológica Mexicana*, 40: 283–295.
- Zchori-Fein, E. and J. Brown. 2002. Diversity of prokaryotes associated with *Bemisia tabaci* (Gennadius) (Hemiptera: Aleyrodidae). *Annals of the Entomological Society of America*, 95: 711–718.
- Zhou, W., Rousset, F. and S. L. O’Neill. 1998. Phylogeny and PCR-based classification of *Wolbachia* strains using *wsp* gene sequences. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B*, 265: 509–515.