



UNIVERSIDAD NACIONAL DE TUMBES

INFORME CIENTIFICO FINAL

Control biológico de *Chaetanaphothrips signipennis* (Bagnall, 1914) y *Frankliniella parvula* (Hood, 1925), mediante el desequilibrio de su microbiota nativa, empleando microorganismos nativos antagonistas obtenidos de la filosfera y rizosfera del banano (*Musaacuminata*), en Tumbes-Perú, 2014-2015.

PROYECTO CANON N° 0821-2014/UNT-R

ING. NESTOR DELFIN DIAZ CASTILLO
RESPONSABLE

TUMBES, PERÚ
2016.

RESUMEN

Los insectos plaga en el cultivo de banano y plátano los trips causan daños a los frutos *Chaetanaphothrips signipennis* Bagnall, 1914 (*C. signipennis*), ocasionando la “mancha roja del banano” y *Frankliniella parvula* Hood, 1925 (*F. parvula*), causando erupciones en los frutos del banano perjudicando la calidad y ocasionando pérdidas económicas en ciertos fundos hasta 30 %, tanto la mancha roja producida por (*C. signipennis*) así como (*F. parvula*) son además vectores importantes de patógenos de plantas, tales como hongos, bacterias y virus. Mediante una caracterización molecular direccionada, fuertemente a nivel metagenómico, genómico, metaproteómico y proteómico se pudo identificar molecularmente la microbiota intestinal de los diferentes estados ontogénicos de los “trips del banano”, identificando las bacterias simbiotes obligadas, además se caracterizó las bacterias antagonistas de los simbiotes, provenientes de la filosfera y rizosfera del banano. Además se pudo caracterizar un hongo capaz de causar efectos citotóxicos sobre los trips del banano. Estos hallazgos nos permiten contar con un consorcio de microorganismos capaces de desequilibrar la microbiota intestinal de los “trips del banano”, dándole una alternativa de solución biológica a los agricultores del sector bananero.

1. INTRODUCCIÓN

Una de las estrategias más utilizadas en el control de plagas y enfermedades; en relación a costo, eficiencia y seguridad ambiental; está referida a la utilización de microorganismos (bacterias, hongos, etc), que sean capaces de alterar la microbiota intestinal de los insectos y/o causar efecto citotóxico.

Estos microorganismos en particular, las bacterias pueden ser encontradas en la parte aérea (filosfera) o en el suelo adherido a las raíces (rizosfera) de las mismas plantas; o incluso formar parte de una microbiota intestinal transitoria de los mismos insectos.

Los insectos cuentan con gran diversidad de microorganismos simbioses dentro de su tracto digestivo; los cuales le ayudan a la digestión, protección, reproducción, evolución, etc. Estos microorganismos pueden ser transmitidos de forma vertical (madre a hijo) u horizontal (por interacción con el ambiente).

Las plantas constituyen uno de los reservorios más notables de microorganismos para los insectos que pueden causar un efecto benéfico o patogénico.

Con la finalidad de obtener microorganismos que sean capaces de desequilibrar la microbiota intestinal de los insectos, se aisló y caracterizó la microbiota cultivada y no cultivada de los diferentes estados y estadillos de los “trips del banano”, ulterior a ellos se caracterizó molecularmente la microbiota asociada a la parte filosférica y rizosférica del banano. Finalmente se hicieron pruebas de antagonismo de las bacterias del tracto digestivo sobre las bacterias obtenidas de la planta de banano.

2. MATERIAL Y MÉTODOS

2.1 Localidad y periodo de ejecución.

La presente investigación se desarrolló en el departamento de Tumbes, provincia de Tumbes, distrito de Tumbes. EL material biológico se obtuvo del cultivo de banano plátano en el CIEA “Los Cedros” de la Universidad Nacional de Tumbes.

2.2 Métodos, técnicas e instrumentos de recolección de datos

El desarrollo de nuestra investigación comprendió dos fases;

- A) Fase de campo
- B) Fase de laboratorio

Las mismas que se explican a continuación:

- A) Fase de campo: Se realizó la recolección de “trips del banano”, utilizando aspiradores de insectos, luego transferidos a tubos falcon de 50 ml. Los mismos que fueron puestos en bolsas ziploc y puestas en coolers con gelpack, para luego llevarlas al laboratorio.
- B) Fase de laboratorio: Las muestras obtenidas en campo fueron llevadas a las instalaciones de la empresa IncaBiotec SAC, para su procesamiento, análisis correspondiente y posterior envío a secuenciar. El procesamiento de las muestras comprendió lo siguiente:
 - 1) Determinación de la microbiota cultivada del tracto digestivo de los diferentes estados de los “trips del banano” (*Ch.s* y *F. p*), con una caracterización molecular direccionada fuertemente a nivel metagenómico, genómico, metaproteómico y proteómico.
 - 1.1 Identificación molecular de las especies (*Ch. s* y *F. p*).
 - 1.2 Aislamiento y caracterización molecular de la microbiota cultivada y no cultivada.
 - 1.3 Caracterización molecular de la microbiota cultivada a nivel de espectrometría de masas MALDI TOF/TOF
 - 1.4 Caracterización molecular de los trips del banano a nivel proteómico.
 - 2) Identificación y caracterización molecular de microorganismos nativos asociados a la filosfera y rizosfera del banano
 - 3) Evaluación de cepas benéficas para la alteración de la microbiota de los trips, basándose en el análisis funcional de las pruebas de antagonismos

1.1 Identificación molecular de las especies *Chaetanaphothrips signipennis* y *Frankliniella parvula*.

La identificación molecular de las especies *C.signipennis* y *F. párvula* se hizo en los diferentes estados de vida de los insectos (C.sy F.p), el lugar donde se

tomaron las muestras, la ubicación geográfica como el colector responsable ver tabla 01

Tabla 01.Registro de colección de los especies de “Trips”

Especies	Estadio	Habitad En el banano	Lugar	Ubicación geográfica	colector
<i>Chaetanaphothrips Signipennis</i>	Adulto	Pseudotallo y fruto	Los cedros	0552146 9600795	Cesar Mogollón Farias
<i>Frankiniella párvula</i>	Adulto	Fruto y flores	Los cedros	0552124 9600776	Cesar Mogollón Farias

Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

La extracción del ADN se hizo colocando el insecto “trips” en un tubo eppendorf de 0.2 ml el cual se trituró y se obtuvo una muestra la cual se maceró con y se agregó Buffer TNES. (ver tabla 02). Posteriormente a la muestra obtenida se le adicionó 10 mg/ml proteínas y se incubó a 37 °C durante 3 - 18 horas. después de este tiempo a la muestra obtenida se le adicionó NaCl 5 M y se homogenizó mediante vortexeo vigorosamente por 15 segundos (ver tabla 03).

Tabla 02. Volumen de Buffer TNES por números de individuos.

INDIVIDUOS	μL de BUFFER	PROCEDENCIA	Proteinasa 10mg/ml	CODIGO
01	100μL	"Trips de la mancha roja"	2 μL	Cp.1
				Cp.1(repetición 01)
				Cp.1(repetición 02)
01	50 μL	"Trips de la mancha roja"	1 μL	Cp.2
				Cp.2(repetición 01)
				Cp.2 (repetición 02)
10	100 μL	"Trips de la mancha roja"	2 μL	Cp.3
10	50 μL	"Trips de la mancha roja"	1 μL	Cp.4
01	100 μL	"Trips de la flor"	2 μL	Fp.1
				Fp.1(repetición 01)
				Fp.1(repetición 02)
01	50 μL	"Trips de la flor"	1 μL	Fp.2
				Fp.2(repetición 01)
				Fp.2(repetición 02)
10	100 μL	"Trips de la flor"	2 μL	Fp.3
10	50 μL	"Trips de la flor"	1 μL	Fp.4

Tabla 03. Concentración de NaCl

CODIGO DNA	CANTIDAD DE NaCl 5 M
Cp.1	30μl
Cp.1(repetición 01)	
Cp.1(repetición 02)	
Cp.2	15μl
Cp.2(repetición 01)	
Cp.2 (repetición 02)	
Cp.3	30μl
Cp.4	15μl
Fp.1	30μl
Fp.1(repetición 01)	
Fp.1(repetición 02)	
Fp.2	15μl
Fp.2(repetición 01)	

Fp.2(repetición 02)	
Fp.3	30µl
Fp.4	15µl

A la muestra obtenida se Microcentrifugó a 13 000 rpm por 5 minutos obteniéndose dos estratos el precipitado y el sobrenadante, transfiriendo el sobrenadante a un tubo al cual se le agregó 1 volumen de etanol 100% de pureza helado y se incubó por 1 hora a 20°C, después de transcurrido este tiempo se centrifugó nuevamente a 13000 rpm por 5 minutos y a 4°C, se obtuvo nuevamente una sustancia donde se eliminó el sobrenadante quedando el residuo al cual se le añadió 50-100 µL de Etanol al 70 % de pureza helado centrifugándose nuevamente a 10000 rpm por 5 minutos y a 4°C obteniendo así el pellet después de eliminar la sustancia sobrenadante. Posteriormente se dejó secar el pellet a temperatura ambiente y se diluyó el ADN en T.E 1X para luego cuantificar (tabla 04).

Tabla 04. Cuantificación espectrofotométrica del ADN obtenido

CódigoDNA	Concentración µg/mL	Pureza 260/280	Pureza260/230	Dilución para laPCR
Cp1	2	1,52	1,59	Directo
Cp1(repetición 01)	2	2,25	0,06	Directo
Cp1 (repetición 01)	3	1,58	0,62	Directo

Cp2	1	1,36	0,27	Directo
Cp2(repetición 01)	1	1,50	0,47	Directo
Cp2(repetición 02)	2	1,62	0,32	Directo
Cp3	3	1,67	0,64	Directo
Cp4	6	1,73	0,86	Directo
Fp1	1	1,55	0,31	Directo
Fp1(repetición 01)	3	2,39	0,07	Directo
Fp1(repetición 02)	1	1,60	0,47	Directo
Fp2	3	2,20	0,07	Directo
Fp2(repetición 01)	1	1,55	0,50	Directo
Fp2(repetición 02)	2	1,74	0,32	Directo
Fp3	12	2,03	0,27	Directo
Fp4	19	2,01	0,41	Directo

CONCENTRACIONES DE LOS REACTIVOS

- Buffer TNES (50 mM Tris, pH 7.5, 400 mM NaCl, 20 mM EDTA, y 0.5% SDS) y 1.7 µl de proteinasa K (10 mg/ml).
- T.E 1X PH:8 (10 mM Tris-HCL PH: 8, 1 mM EDTA PH: 8)

Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Para la identificación molecular de las especies *Ch.s* y *F. p.* se amplificaron tres locis genéticos diferentes: 18S ADN ribosomal, Tubulin -alfa I y citocromo oxidasa C subunidad I (tabla 05).

Tabla 05. Código, secuencias del primer y tamaño amplificado (en base a los pares) para la identificación de especies de thrips

CODIGO	SECUENCIA DEL PRIMER 5 → 3	TAMAÑO AMPLIFICADO
18S THa0.7 18S THbi	GCT CGT AGT TGG ATC TGT GY GTT AGY AGG YTA GAG TCT CGT TCG	1700 pb
DDVTubAF DDVTubAR	GAR CCC TAC AAY TCY ATT CT GAA ACC RGT KGG RCA CCA GTC	338 pb
TH_TubAF TH_TubAR	ACA YTC VGA YTG YGC CTT CAT GG CGG TAC ARG AKR CAG CAV GCC AT	
LCO1490 HCO2198	GGT CAA CAA ATC ATA AAG ATA TTG G TAA ACT TCA GGG TGA CCA AAA AAT CA	710 – 650 pb

A. GEN 18S ADNr.

- Se hizo PCR para la amplificación de la Región 18S ribosomal (1700 pb) añadiendo los reactivos del KIT (tabla 06) de la *Taq Polimerase Recombinant*, con su ciclaje correspondiente (tabla 07).
-
- Tabla 06. Mix de reacción para la PCR del 18S ADNr

Tabla 07. Ciclaje para la amplificación del gen 18S ADNr

Temperatura	Tiempo	Ciclo
94°C	5 minutos	1 Ciclo
94°C	30 segundos	

Reactivos	Cantidad por muestra
Buffer Taq 10X	2.5µL
MgCl ₂ 25mM	2.5µL
dNTP's 10mM	0.5µL
Taq Polimerase 5U/ µL	0.2µL
DDV TubAF 15pmol	1 µL
DDV TubAR 15pmol	1 µL
Agua Ultra pura	14.3µL
ADN	3 µL
Volumen Final 25µL	

58°C	45 segundos	35 Ciclos
72°C	1 minuto	
72°C	4 minutos	1 Ciclo
4°C	∞	

B. GEN Tubulin-alpha I

Se hizo NESTED- PCR para la amplificación con el ciclaje correspondiente (tabla 08) de la Región Tubulin alpha 1 (338 pb)
Los reactivos usados para esta PCR fueron del KIT (tabl de la *Taq Polimerase Recombinant* (tabla 09)

1° PCR

Tabla 08. Ciclaje para la amplificación del gen Tubulin alpha

Temperatura	Tiempo	Ciclo
94°C	5 minutos	1 Ciclo
94°C	30 segundos	
50°C	50 segundos	35 Ciclos
72°C	1 minuto	
72°C	4 minutos	1 Ciclo
4°C	∞	

Tabla 09. Mix de reacción para la PCR del gen Tubulin alpha

Reactivos	Cantidad por muestra
Buffer Taq 10X	2.5µL
MgCl ₂ 25mM	2.5µL
dNTP's 10mM	0.5µL
Taq Polimerase 5U/µL	0.2µL
TH- TubAF 15pmol	1 µL
TH- TubAR 15pmol	1 µL
Agua Ultra pura	15.3µL
ADN(PRODUCTO)	2 µL
Volumen Final 25µL	

2° PCR

Tabla 10. Mix de

reacción para la

segunda PCR del gen Tubulin alpha

Temperatura	Tiempo	Ciclo
94°C	5 minutos	1 Ciclo
94°C	30 segundos	
58°C	45 segundos	35 Ciclos
72°C	1 minuto	
72°C	4 minutos	1 Ciclo
4°C	∞	

Nota: El mix de reacción fue similar al de la primera PCR

C. GEN COX I

- Se hizo PCR para la amplificación de la Región Cytochrome –oxidase I (COI), con su ciclaje correspondiente (tabla 11)
- Los reactivos usados para esta PCR fueron del KIT (tabla 12) de la *Taq Polimerase Recombinant*:

Tabla 11. Ciclaje para la amplificación del gen COI

Temperatura	Tiempo	Ciclo
94°C	5 minutos	1 Ciclo
94°C	30 segundos	
49°C	60 segundos	35 Ciclos
72°C	1 minuto	
72°C	4 minutos	1 Ciclo
4°C	∞	

Tabla 12. Mix de reacción para la segunda PCR del gen COI

Reactivos	Cantidad por muestra
Buffer Taq 10X	2.5µL
MgCl ₂ 25mM	2.5µL
dNTP's 10mM	0.5µL
Taq Polimerase 5U/µL	0.2µL
LCO 1490 15pmol	1.0µL
HCO 2198 15pmol	1.0µL
Agua Ultra pura	14.3µL
ADN	3µL
Volumen Final 25µL	

SECUENCIACION

Tabla 13. Secuenciación de los amplicones del gen 18 S rDNA

Código del DNA/PCR	Intensidad de la banda	Preparación de la muestra				Código de la secuenciación
		Dilución	H ₂ O UP	Amplicon	Volumen Final	
Cp1	+ Fuerte	1/10	27 µL	3 µL	30 µL	TBA18S
Cp1(repetición 01)	+Leve	Sin dilución			20 µL	TBA18S1
Cp2	+ Fuerte	1/10	27 µL	3 µL	30 µL	TBA18S2
Fp1	+ Medio	1/5	24µL	6 µL	30 µL	TBF18S
Fp1(repetición 01)	+Fuerte	1/10	27 µL	3 µL	30 µL	TBF18S1
Fp2	+ Fuerte	1/10	27 µL	3 µL	30 µL	TBF18S2

Tabla 14. Secuenciación a partir de los amplicones del gen Tubulin alpha I

Código del DNA/PCR	Intensidad de la banda	Preparación de la muestra				Código de la secuenciación
		Dilución	H ₂ O UP	Amplicon	Volumen Final	
Cp1	+ Fuerte	1/10	27 µL	3 µL	30 µL	T ATUBC
Cp1(repetición 01)	+Fuerte	1/10	27 µL	3 µL	30 µL	TBATUB1
Fp1	+ Fuerte	1/10	27 µL	3 µL	30 µL	TNTUBN
Fp2	+Fuerte	1/10	27 µL	3 µL	30 µL	TNTUBN1

Tabla 15. Secuenciación a partir del los amplicones del gen COI

Código del DNA/PCR	Intensidad de la banda	Preparación de la muestra				Código de la secuenciación
		Dilución	H ₂ O UP	Amplicon	Volumen Final	
Fp1	+ Mediano	1/5	24 µL	6 µL	30 µL	TCOI1
Fp1(repetición 01)	+ Leve	Sin diluir			20	TCOI2
Fp2(repetición 01)	+ Leve	Sin diluir			20	TCOI2

Aislamiento y caracterización molecular de la microbiota cultivada y no cultivada.

La caracterización molecular se hizo con el propósito de eliminar los ectomicroorganismos de los trips, se usó un protocolo de desinfección.

Las muestras fueron depositadas en tubos eppendorf de 2 ml, luego se adicionó etanol al 70 % por 3 min cumplido este tiempo se retiró el etanol y se adicionó NaCl al 2% por 30 segundos, luego las muestras fueron enjuagadas con agua destilada por tres veces. Posteriormente las muestras se pusieron en tubos eppendorf adicionándoles medio de cultivo LB caldo y se dejaron las muestras por 20 minutos antes de la siembra en placas Petri.

Prueba de desinfección de los trips

La desinfección de los trips se comprobó cuando éstos se colocaron en el medio de cultivo TSA en placas petri, aquí se adicionó parte del medio de cultivo LB caldo conteniendo los “trips” y la siembra se realizó por el método de siembra por estría. Las placas fueron revisadas después de 24, 48 y 72 horas.

Liberación de la microbiota del “trips”

Después de la desinfección de los insectos trips, estos se depositaron en tubos eppendorf con LB caldo, se hizo la liberación de la microbiota utilizando un macerador quirúrgico esterilizado, y se adicionó un control (sin macerar). Los tubos fueron sellados con parafilm por 24 horas y después de este tiempo se hizo la siembra en placas Petri conteniendo medio de cultivo TSA por el método de siembra por estría. Las placas fueron revisadas después de 24, 48 y 72 horas.

Purificación de los microorganismos

La purificación de los microorganismos se hizo teniendo en cuenta características de tamaño, forma y color. Los precultivos se purificaron tres veces, la purificación de los microorganismos se comprobó por tinción de Gram, haciendo el frotis en láminas porta objetos y fueron observadas en un microscopio a 1000X, para su clasificación como bacteria Gram (+) y Gram (-). En cada purificación de uso un control, es decir una placa con medio de cultivo TSA. Ver tabla 16

Tabla 16. Protocolo de tinción gram

Reactivo	Tiempo
Violeta de genciana	1 minuto
Lugol	1 minuto
Alcohol acetona	30 segundos
Safranina	1.5 minutos

En todos los pasos se lavaron las muestras con agua destilada.

EXTRACCION DE ADN Y PCR DE BACTERIAS CULTIVABLES DE *Frankliniella párvula*

Se tomaron bacterias sembradas en caldo LB, se centrifugaron a velocidad máxima durante 1 minuto y se eliminó el sobrenadante. Se resuspendió el sedimento en 546 µl de TE buffer (10 mM Tris pH 8.0, 50 mM EDTA), se adicionó 30 µl de SDS 10% y 3 µl de proteinasa K; se mezcló e incubó a 37 °C durante 1 hora. (al mismo este tiempo se puso a calentar el CTAB/NaCl a 65°C), se añadió 100 µl de NaCl 5M mezclando completamente, en seguida se adicionó 80 µl de CTAB/NaCl (previamente calentado) se mezcló e incubó a 65 °C durante 10 min, seguido se adicionó un volumen igual de cloroformo/alcohol isoamil (24:1) y se mezcló para formar una emulsión (invirtiendo el tubo varias veces), luego se centrifugó a 12 000 rpm durante 5 min, la parte sobrenadante a un nuevo tubo eppendorf al cual se adicionó un volumen igual de fenol/cloroformo/alcohol isoamil (25:24:1), y luego se mezcló hasta formar una emulsión a ésta se centrifugó a 12 000 rpm durante 5 min y la sobrenadante se transfirió a un nuevo tubo eppendorf al cual se le adicionó 0.6 volumen de isopropanol y se mezcló suavemente hasta precipitación del DNA. A este contenido nuevamente se centrifugó a 12 000 rpm durante 5 min, luego se eliminó el sobrenadante y al precipitado se le

adicionó 1ml de Etanol 70% de pureza (frio) y se centrifugó a 12 000 durante 5 min, se le adicionó 30 eliminó el etanol y se dejó secar a T° ambiente por 15 min. Posteriormente se resuspendió el pellet en 30 µl de TE.

El DNA obtenido se le adicionó 1 µl de solución de RNAsa e incubó a 37°C durante 1 hora.

a. PCR (09 – 02- 15 y 11- 02- 15)

Tabla 17. Reacción dirigida hacia el gen 16s ARNr

Reacción dirigida hacia el gen 16s ARNr			Programa del termociclador		
			35 ciclos		
Reactivos	1 Reacción	13 reacciones	Proceso	Temperatura	Tiempo
Buffer Master mix 10X	2.5	32.5	Desnaturalización inicial	94 °C	6 min.
MgCl2	2.5	32.5	Desnaturalización	94 °C	30 seg.
Taq polimerasa	0.1	1.3	Hibridación	58 °C	45 seg.
DNTPs	0.5	6.5	Elongación	72 °C	1 min.
16s ARNr F	0.6	7.8	Elongación final	72 °C	4 min.
16s ARNr R	0.6	7.8	T° final conservación	4 °C	10 horas
Agua ultra pura	16.2	210.6			
2 µl de ADN: 1M, 2F, 2I, 3M, 4M, 5M, 6M, 7M, 8M, 9M, 10M, CE, C- PCR					

EXTRACCIÓN DE ADN Y PCR DE BACTERIAS CULTIVABLES DE *Frankliniella párvula* (restantes)

b. Extracción de DNA bacterias.

Se tomaron bacterias sembradas en caldo LB, se centrifugaron a velocidad máxima durante 1 minuto eliminando el sobrenadante. Al precipitado se resuspendió con 546 µl de TE buffer (10 mM Tris pH 8.0, 50 mM EDTA), se adicionó 30 µl de SDS 10% y 3 µl de proteinasa K y se mezcló e incubó a 37 °C durante 1 hora. (durante este tiempo se puso a calentar el CTAB/NaCl a 65°C).

Al precipitado se le añadió 100 µl de NaCl 5M y se mezcló completamente y se adicionó 80 µl de CTAB/NaCl (previamente calentado) se mezcló e incubó a 65 °C durante 10 min. Posteriormente se le adicionó un volumen igual de cloroformo/alcohol isoamil (24:1) y se mezcló bien para formar una emulsión (invirtiendo el tubo varias veces) luego se centrifugó a 12 000 rpm durante 5 min. Se transfirió la fase sobrenadante a un nuevo tubo eppendorf al cual se le adicionó un volumen igual de fenol/cloroformo/alcohol isoamil (25:24:1), se mezcló hasta formar una emulsión, se centrifugó a 12 000 rpm durante 5 min y se transfirió la fase superior a un nuevo tubo eppendorf.

Posteriormente se adicionó 0.6 volumen de isopropanol y se mezcló suavemente hasta precipitación del DNA. Se centrifugo a 12 000 rpm durante 5 min, luego se eliminó el sobrenadante. Se le adicionó 1ml de Etanol 70% (frio) se centrifugo a 12 000rpm durante 5 min y se eliminó el etanol y se dejó secar a T° ambiente por 15 min resuspendiendo el pellet en 30 ul de TE. Al final se trató el DNA con 1 ul de solución de RNasa e incubo a 37°C durante 1 hora.

c. PCR

Tabla 18. Reacción dirigida hacia el gen 16s ARNr

Reacción dirigida hacia el gen 16s ARNr			Programa del termociclador		
			35 ciclos		
Reactivos	1 Reacción	26 reacciones	Proceso	Temperatura	Tiempo
Buffer Master mix 10X	2.5	65	Desnaturalización inicial	94 °C	6 min.
MgCl2	2.5	65	Desnaturalización	94 °C	30 seg.
Taq polimerasa	0.1	2.6	Hibridación	58 °C	45 seg.
dNTPs	0.5	13	Elongación	72 °C	1 min.
16s ARNr F	0.6	15.6	Elongación final	72 °C	4 min.
16s ARNr R	0.6	15.6	T° final conservación	4 °C	10 horas
Agua ultra pura	16.2	421.2			
2 ul de ADN: 11M, 12M, 13M, 14M, 15M, 16M, 17M, 18M, 19M, 20M, 21M, 22M, 23M, 24M, 26M, 27M, 28M, 29M, 30M, 31M, 32M, 33M, 53M, CE, C- PCR					

EXTRACCIÓN DE ADN PARA MICROBIOTA DE INSECTOS /THRIPS (METAGENOMICA)

A. DESINFECCION DE INSECTOS

La desinfección de los insectos se hizo colocando los thrips en los tubos eppendorf agregandole 600 ul de etanol al 70% de pureza, se centrifugó a 6000 rpm por 1 min, se obtuvo sedimento y se agregó 400 ul de cloro al 2%, nuevamente se centrifugó a 6 000 rpm por 30 segundos obteniendo nuevamente el precipitado al cual se le agregó 600 ul de agua destilada

(autoclavada), una centrifugación final a 6 000 rpm por 1 minuto se obtuvo el precipitado al se lavó por tres veces.

- Nota: para los huevos solo se hizo una desinfección con Etanol al 70%

B. EXTRACCION

- OPCIONAL: Macerar antes de agregar el buffer
- Agregamos 555 ul de Buffer TE (10 mM Tris-HCl (pH 8) – 50 mM EDTA).
- Se agregó 5.0 ul de lisozima y se colocó a baño María a 37°C por 20 minutos.
- Se Agregaron perlas de vidrio (autoclavada) y se centrifugó a 13 000 rpm por 30 min. Se recuperó el sobrenadante y se colocó en otro tubo eppendorf al cual se le agregó 30 ul de SDS al 10% y 3 ul de proteinasa K y se colocó a Baño María a 37 °C por 40 minutos.
- Se agregó 100 ul de NaCl 5M, 80 ul de CTAB/NaCl, y se colocó a baño María a 65 °C por 10 minutos,
- Se agregó un volumen igual de fenol /cloroformo/ alcohol isoamil, centrifugar a 13 000 rpm por 5 min. Se observaran dos fases.
- La fase superior se colocó en otro tubo (aprox. 500 ul). A este se le agregó isopropanol (0.6 v), centrifugamos a 13 000 rpm por 10 min
- Se eliminó el sobrenadante quedando el pellet y se agregó 800 ul de etanol al 70%, y se centrifugó a 13 000 rpm por 10 min, se eliminó el sobrenadante quedando el pellet, el cual se puso a secar a T° ambiente por 25 min. Se agregó TE (resuspender) y se guardó el ADN a -20 °C

CÓDIGOS DE LAS MUESTRAS

- A. Ch.s: Adulto de *Chaetanaphothrips signipennis*
- H. F.p: Adulto de *Frankliniella párvula*
- NOTA: para la extracción se colocaron 50 huevos de F.p. En un tubo eppendorf y entre 50 y 100 adultos de Ch.s.

Tabla 19. Cuantificación de muestras de extracción de ADN
(METAGENOMICA)

MUESTRA	H. F.p	A.Ch.s
CANTIDAD (ug/ml)	59	352
260/280	2.11	2.10
260/230	1.71	2.03

Tabla 20. Reacción dirigida hacia el gen 16s ARNr METAGENOMICA (Bacterias)

Reacción dirigida hacia el gen 16s ARNr			Programa del termociclador		
			35 ciclos		
Reactivos	1 Reacción	4.0 reacciones	Proceso	Temperatura	Tiempo
Buffer Taq. 10X	2.5	10.0	Desnaturalización inicial	94 °C	6 min.
MgCl2	2.5	10.0	Desnaturalización	94 °C	30 seg.
Taq polimerasa	0.1	0.4	Hibridación	58 °C	45 seg.
dNTPs	0.5	2.0	Elongación	72 °C	1 min.
16s ARNr F	0.6	2.4	Elongación final	72 °C	4 min.
16s ARNr R	0.6	2.4	T° final conservación	4 °C	1 horas
Agua ultra pura	16.2	64.8			
2 ul de ADN DILUIDO: Ch, H. F, CE, C- PCR.					

Nota: a todas las muestras se les hizo una dilución de 1:10 (3 ul ADN y 27 ul de AUP)

1.3 Caracterización molecular de la microbiota cultivada a nivel de espectrometría de masas MALDI TOF/TOF

I. PROCEDIMIENTO:

Se centrifugaron los cultivos bacterianos a 10.000 rpm por 10 minutos se eliminó el sobrenadante. Al sedimento celular se congeló durante 15 minutos en hielo seco (-20°C fue por 30 minutos). Se descongeló y adicionó 100ul de Buffer nativo lisis vortex suave y sonicar 5 minutos-

Se Incubó en hielo durante 30 minutos, y se homogenizó por inversión suave (manual) cada 10 minutos. Después nuevamente se centrifugó a 14.000 rpm por 30 minutos a 4 °C y se separan el sedimento y el sobrenadante.

El sobrenadante contiene la fracción de la proteína de las células bacterianas 30 ul de la proteína se trabajó para gel SDS PAGE 10%.

DIGESTIÓN EN GEL DE PROTEÍNAS

- Se cortaron las bandas diferenciales y presenciales (1mm x 3mm) y se colocaron en tubos individualmente.

DECOLORACION DE LAS BANDAS DEL GEL TEÑIDAS CON AZUL DE COOMASSIE

Se logró adicionando 100ul de bicarbonato de amonio 100 Mm /acetonitrilo (1:1) se incubó por agitación ocasional por 30 minutos. Se adicionó nuevamente 500 ul de acetonitrilo puro y se puso a incubar a Temperatura ambiente agitando ocasionalmente hasta que las piezas se tornen blancas y encogidas, luego se extrajo el acetonitrilo.

SATURACION DE LAS PIEZAS DEL GEL CON BUFFER TRIPSINA

Se agregó suficiente buffer tripsina (13 ng/ul) hasta cubrir las piezas del gel Aproximadamente 50 ul y se almacenó en la refrigeradora -4 °C.

- Se adicionó 10 μ l de buffer bicarbonato amonio (10 Mm bicarbonato de amonio 10% acetonitrilo) y mantuvo húmedas durante la actividad enzimática. a mayor tiempo de incubación se observa mayor clivaje de los péptidos.

DIGESTION DE LAS PROTEINAS EN LA PIEZA DEL GEL

- Se Incubó las piezas del gel a 37 °C toda la noche, al día siguiente se centrifugó rápido y se extrajo alícuotas de 1.5 μ l para el análisis directo (mapeo peptídico).

EXTRACION DE PEPTIDOS

1.4 Caracterización molecular de los trips del banano a nivel proteómico.

Colección de los especímenes.

Los especímenes del “trips de la mancha roja del banano” fueron colectados en el centro experimental “Los Cedros”, de la Universidad Nacional de Tumbes, con la ayuda de un aspirador entomológico y depositados en tubos eppendorf de 1.5 ml, autoclavados.

Preparación de las muestras para espectrometría de masas MALDI Tof/Tof.

Extracción de proteínas de insectos

A diez especímenes en tubos eppendorf de 1.5 ml se les adiciono 400 μ l de metanol acidificado, se trituraron con la ayuda de un macerador quirúrgico, se homogenizo la muestra con la ayuda de un vortex y luego se llevó a sonicar por 12 minutos. Se centrifugo 13 000 rpm/25 minutos, luego se recuperó el sobrenadante y se transfirió en un nuevo tubo.se adiciono 2.5 volúmenes de Acetona (pre-enfriada). Se llevó a incubar a – 20 ° C/ 2 horas (cada 10 minutos se homogenizo la muestra). Se centrifugó a 10000 rpm/ 5 minutos. Nuevamente se eliminó el sobrenadante para finalmente resuspender el sedimento con agua grado HPLC.

Digestión de proteínas con tripsina en solución: Reducción y alquilación.

Adicionar 15 μ l de buffer digestión (50mM de bicarbonato de amonio), luego 1.5 μ l de buffer alquilación (100mM de DTT), 10 μ l de proteína, ajustar el volumen a 27 μ l. Incubar la muestra a 95 °C por 5 minutos. Dejar reposar (enfriar). Adicionar 3 μ l de buffer de alquilación e incubar 20 minutos en oscuridad a T° ambiente.

Digestión.

Se adiciono 1 μ l de tripsina bovina e incubo a 37°C por 3 horas. Se agregó 1 μ l de tripsina e incubar 30°C toda la noche. Se agregó 5 μ l de TFA al 20% (parar la digestión).

Enriquecimiento de péptidos después de la digestion Zip Tip (c18).

Se humedeció la columna con una solución de 80% de Acetonitrilo en agua grado HPLC, luego se equilibró la columna con una solución de 0.1% de TFA en agua grado HPLC. Se aspire y dispenso la muestra (proteína 10 veces de igual manera para humedecer, equilibrar, extraer péptidos) en la columna. Se equilibrar la columna con una solución de 0.1% de TFA en agua grado HPLC. Elución de péptidos en una solución de 80% de ACN en agua grado HPLC. Se secó en bomba al vacío y se resuspendió en 0.15TFA en agua grado HPLC, se espoteó 1 μ l de proteínas en la placa MALDO opti –TOF 1-1 V/V. finalmente se adiciono directamente a la muestra 1 μ l de matriz Acido cinapinico.

Parámetros de espectros de masas MALDI Tof/Tof.

El rango de masas en modo Tof reflecton ion positivo, fue de 400 a 8000 kDa y con una intensidad de laser de Nd: YAG, 324 nm wavelength, 3 ns pulse WIVTH, 1000 Hz firing rate. En modo tof/ tof el rango de masas se realizó por defecto del equipo. Se utilizó el espectrómetro de masas 5800 AB Sciex TOF/TOF TM 5800 System, la base de datos para analizar las proteínas encontradas en el software protein pailot versión 4.0.

2. Identificar y caracterización molecular de microorganismos nativos asociados a la filosfera y rizosfera del banano.

En campo

Se colectaron sub-muestras de 1kg de suelo.

Se mezcló y homogeneizó y se obtuvo 1 kg de suelo como muestra representativa del sitio.

Para el caso de la filosfera se llevó tubos eppendorf con medio Luria bertani caldo, se hizo un raspado de las hojas de banano con isopos autocladados y se sumergió en el medio, para luego ser trasladado al laboratorio.

En el laboratorio

El aislamiento del material del suelo se realizó directamente el método de dilución en placa, se diluyó el suelo en proporción 1/1000 (p/v), de esta suspensión se tomó una alícuota de 0.5 mL uniformemente sobre la superficie de una caja Petri con el medio de cultivo papa-dextrosa-agar (PDA).

1 g de suelo a 10 ml de agua destilada estéril y agitando durante 15 min. Cada suspensión fue luego diluida en serie de hasta 10⁻⁶. De esta dilución, una alícuota de 0,1 ml se extendió sobre un medio PDA (hongos y LB agar).

Para el caso de la filosfera el medio líquido fue sembrado en placas LB agar con un fungicida.

Se realizaron tres purificaciones de cada colonia bacteriana y para el caso de los hongos fueron replicados dos veces.

Extracción de ADN bacteriano total (Método TENS):

Los tubos eppendorf conteniendo los cultivos puros en LB caldo, fueron centrifugados en el cultivo por 2 minutos a 10000 rpm y se descartó el sobrenadante.

Al precipitado se le adicionó 400 µl de solución lisis (TENS), 10 mg de lisosima y 2 µl de proteinasa K por cada muestra. A la muestra obtenida se incubó por 2 horas a 56 °C en baño maría.

1.3 Caracterización molecular de la microbiota cultivada a nivel de espectrometría de masas MALDI TOF/TOF

II. PROCEDIMIENTO:

Para hacer la caracterización molecular se centrifugaron los cultivos bacterianos a 10.000 rpm por 10 minutos. Se eliminó el sobrenadante y al precipitado celular se congeló durante 15 minutos en hielo seco (-20°C). después se descongeló y se adicionó 100ul de Buffer nativo lisis y con vortex suave y sonicar por 5 minutos. Luego se incubó en hielo durante 30 minutos y se homogenizó por inversión suave(manual) cada 10 minutos, después de este paso se centrifugó a 14.000 g 30 minutos a 4 °C. se tomó el sobrenadante por contener proteína de las células bacterianas a las cuales se le adicionó 30 ul de la proteína y se trabajó para gel SDS PAGE 10%.

DIGESTIÓN EN GEL DE PROTEÍNAS

Se Cortaron las bandas diferenciales y presenciales con una hoja de bisturí estéril (1mm x 3mm) y fueron colocarlas en tubos individualmente.

DECOLORACION DE LAS BANDAS DEL GEL TEÑIDAS CON AZUL DE COOMASSIE

La decoloración de las bandas se hizo adicionando 100ul de bicarbonato de amonio 100 Mm /acetonitrilo (1:1) se incubó por agitación ocasional por 30 minutos dependiendo del grado de tinción. Se adicionó 500 ul de acetonitrilo puro incubar a T° ambiente con agitación ocasional hasta que las piezas se tornaron blancas y encogidas. luego se extrajo el acetonitrilo.

SATURACION DE LAS PIEZAS DEL GEL CON BUFFER TRIPSINA

Se agregó suficiente buffer tripsina (13 ng/ul) hasta cubrir las piezas del gel Aproximadamente 50 ul y se almacenó en la refrigeradora -4 °C y después de 30 minutos se observó la absorción del buffer tripsina. se adicionó 10 ul de buffer bicarbonato amonio (10 Mm bicarbonato de amonio 10% acetonitrilo) y se mantuvo húmedas durante la actividad enzimática.

DIGESTION DE LAS PROTEINAS EN LA PIEZA DEL GEL

Se incubó las piezas del gel a 37 °C toda la noche y se dio un centrifugado rápido y se extrajo alícuotas de 1.5 ul para el análisis directo. (mapeo peptídico).

EXTRACION DE PEPTIDOS

1.4 Caracterización molecular de los trips del banano a nivel proteómico.

Colección de los especímenes.

Los especímenes del “trips de la mancha roja del banano” fueron colectados en el centro experimental “Los Cedros”, de la Universidad Nacional De Tumbes, con la ayuda de un aspirador entomológico y depositados en tubos eppendorf de 1.5 ml, autoclavados.

Preparación de las muestras para espectrometría de masas MALDI Tof/Tof.

Extracción de proteínas de insectos

A diez especímenes en tubos eppendorf de 1.5 ml se les adiciono 400 µl de metanol acidificado, se trituraron con la ayuda de un macerador quirúrgico, se homogenizo la muestra con la ayuda de un vortex y luego se llevó a sonicar por 12 minutos. Se centrifugo 13 000 rpm/25 minutos, luego se recuperó el sobrenadante y

se transfirió en un nuevo tubo. se adiciono 2.5 volúmenes de Acetona (pre-enfriada). Se llevó a incubar a -20°C / 2 horas (cada 10 minutos se homogenizo la muestra). Se centrifugo a 10000 rpm/ 5 minutos. Se eliminó el sobrenadante para finalmente resuspender el sedimento con agua grado HPLC.

- Digestión de proteínas con tripsina en solución: Reducción y alquilación.

Adicionar 15 μl de buffer digestión (50mM de bicarbonato de amonio), luego 1.5 μl de buffer alquilación (100mM de DTT), 10 μl de proteína, ajustar el volumen a 27 μl . Incubar la muestra a 95°C por 5 minutos. Dejar reposar (enfriar). Adicionar 3 μl de buffer de alquilación e incubar 20 minutos en oscuridad a T° ambiente.

Digestión.

Se adiciono 1 µl de tripsina bovina e incubo a 37°C por 3 horas. Se agregó 1 µl de tripsina e incubar 30°C toda la noche. Se agregó 5 µl de TFA al 20% (parar la digestión).

Enriquecimiento de péptidos después de la digestion Zip Tip (c18).

Se humedeció la columna con una solución de 80% de Acetonitrilo en agua grado HPLC, luego se equilibró la columna con una solución de 0.1% de TFA en agua grado HPLC. Se aspire y dispenso la muestra (proteína 10 veces de igual manera para humedecer, equilibrar, extraer péptidos) en la columna. Se equilibrar la columna con una solución de 0.1% de TFA en agua grado HPLC. Elución de péptidos en una solución de 80% de ACN en agua grado HPLC. Se secó en bomba al vacío y se resuspendió en 0.15TFA en agua grado HPLC, se espoteó 1 µl de proteínas en la placa MALDO opti –TOF 1-1 V/V. finalmente se adiciono directamente a la muestra 1 µl de matriz Acido cinapinico.

Parámetros de espectros de masas MALDI Tof/Tof.

El rango de masas en modo Tof reflecton ion positivo, fue de 400 a 8000 kDa y con una intensidad de laser de Nd: YAG, 324 nm wavelength, 3 ns pulse WIVTH, 1000 Hz firing rate. En modo tof/ tof el rango de masas se realizó por defecto del equipo. Se utilizó el espectrómetro de masas 5800 AB Sciex TOF/TOF TM 5800 System, la base de datos para analizar las proteínas encontradas en el software protein pailot versión 4.0.

3. Identificar y caracterización molecular de microorganismos nativos asociados a la filosfera y rizosfera del banano.

En campo

- Se colectaron sub-muestras de 1kg de suelo.
- Se mezcló y homogeneizó, 1 kg como muestra representativa del sitio.
- Se considera cada sub-muestra de suelo de los primeros 20 cm de profundidad, eliminando la materia orgánica superficial.
- Para el caso de la filosfera se llevó tubos eppendorf con medio Luria bertani caldo, se hizo un raspado de las hojas de banano con isopos autocladados y se sumergió en el medio, para luego ser trasladado al laboratorio.

En el laboratorio

El aislamiento se realizó directamente del suelo por el método de dilución en placa.

Se diluyó el suelo en proporción 1/1000 (p/v), de esta suspensión, dispersar una alícuota de 0.5 mL uniformemente sobre la superficie de una caja Petri con el medio de cultivo papa-dextrosa-agar (PDA).

1 g de suelo a 10 ml de agua destilada estéril y agitando durante 15 min. Cada suspensión fue luego diluida en serie de hasta 10⁻⁶. De esta dilución, una alícuota de 0,1 ml se extendió sobre un medio PDA (hongos y LB agar).

Para el caso de la filosfera el medio líquido fue sembrado en placas LB agar con un fungicida.

Se realizaron tres purificaciones de cada colonia bacteriana y para el caso de los hongos fueron replicados dos veces.

Extracción de ADN bacteriano total (Método TENS):

- Los tubos eppendorf conteniendo los cultivos puros en LB caldo fueron centrifugados en el cultivo por 2 minutos a 10000 rpm y se obtuvo el precipitado y se descartó el sobrenadante.

- Al precipitado se le añadió 400 µl de solución lisis (TENS), 10 mg de lisosima y 2 µl de proteinasa K por cada muestra y se incubó por 2 horas a 56 °C en baño maría.

Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

Para la caracterización molecular se amplificó mediante la técnica de PCR el gen 16S ADN ribosomal con primers universales 27-f y 1492-r. Los protocolos de replicación artificial para la amplificación del gen 16S ADN ribosomal se detallan en la tabla 21.

Tabla 21. Secuencia nucleotídica de los primers 27- f 1492-r para amplificar el gen 16S ADN ribosomal.

Primers	Sentido	Secuencia
27- f	Forward	5'- AGAGTTTGATCMTGGCTC- 3'
1492-r	Reverse	5'- TACGGYTACCTTGTTACGACTT- 3'
M : Adenina o Citosina Y : Timina o Citosina.		

Tabla 22. Composición del Mix de reacción para la amplificación del gen 16S ADN ribosomal.

Volumen de reacción de 23 µl para muestras, incluyendo un control (+) de extracción + un control (-) de PCR y un control (-) de extracción.	
	µl
AUP	16.2
Buffer	2.5
Cl ₂ Mg	2.5
dNTPs	0.5
Iniciador Fower	0.6
Iniciador Rever	0.6
Taq polimerasa	0.1
ADN (*)	2 µl por cada muestra.
Total	25

(*) Se adiciona en el momento de desarrollar el protocolo de replicación artificial para la amplificación.

Tabla 23. Protocolo de replicación artificial para la amplificación del gen 16S ADN ribosomal, según fase, tiempo, ciclos y temperatura.

Fase	Tiempo	Ciclos	Temperatura
Desnaturalización del ADN	1 minuto	35	94 °C
Hibridación	1 minuto		58 °C
Polimerización	1 minuto		72 °C

Electroforesis

Los amplicones obtenidos (producto de la PCR), fueron observados en gel de migración preparado con 1,8 gr de agarosa, 120 ml de TAE y 6 µl de bromuro de etidio. Se utilizó un marcador de peso molecular para la determinación del tamaño del amplicón.

Secuenciación

Los amplicones obtenidos en la PCR, se enviaron a secuenciar. Las bandas fuertes y medianamente fuertes fueron previamente diluidas en agua ultra pura.

3) Evaluación de cepas benéficas para la alteración de la microbiota de los trips, basándose en el análisis funcional de las pruebas de antagonismos

Para las pruebas de antagonismo se utilizaron las cepas bacterianas de la microbiota intestinal de los “trips del banano” que por referencia son simbioses obligados y no transitorios; de la misma manera hemos seleccionados cepas de la filosfera y rizosfera para compararlas con las de la microbiota intestinal. Las pruebas de antagonismo se midieron según la siguiente tabla:

Tabla 24. Análisis funcional de pruebas de antagonismo

DIÁMETRO DE INHIBICIÓN	CÓDIGO	CONDICIÓN DE LA INHIBICIÓN
>10 mm	+++	Inhibición fuerte
2 – 10 mm	++	Inhibición moderada
>2mm	+	Inhibición débil

Para el caso de hongos, estos fueron aplicados en “tarrinas de crianzas” conteniendo “trips del banano” para poder observar el efecto citotóxico obre los “trips del banano”.

4. RESULTADOS

Respecto a la Identificación molecular de las especies *Ch. signipennis* y *F. párvula*, las secuencias obtenidas producto de la amplificación de los tres locis genéticos diferentes: 18S ADN ribosomal, Tubulin -alfa I y citocromo oxidasa C subunidad I fueron analizados en la herramienta básica de búsqueda de alineamiento local (BLAST) <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>. Los datos son presentados en la siguiente tabla:

Tabla 25.Resultados del alineamiento de las secuencias en BLAST.

INSECTO	codigo	Primer	ESPECIE POR SECUENCIACION	IDENT
Chaetanaphothrips signipennis	TATUBC_THTubAF	TUBULIN ALFA	Frankliniella occidentalis (Pergande)	88%
Chaetanaphothrips signipennis	TBA18S_18STHa07	18 S	Palmiothrips sp.	98%
Chaetanaphothrips signipennis	TBA18S1_18STHa07	18 S	Palmiothrips sp.	98%
Chaetanaphothrips signipennis	TBA18S2_18SThbi	18 S	Palmiothrips sp.	98%
Chaetanaphothrips signipennis	TBATUB1_THTubAF	TUBULIN ALFA	Heliothrips haemorrhoidalis	83%
Frankliniella parvula	TBF18S_18STHa07	18 S	Frankliniella occidentalis	99%

Frankliniella parvula	TBF18S1_18STHa07	18 S	Frankliniella occidentalis	99%
Frankliniella parvula	TBF18S2_18STHa07	18 S	Frankliniella occidentalis	99%
Frankliniella parvula	TCOI1_HCO2198	COI	Frankliniella tritici	86%
Frankliniella parvula	TCOI2_HCO2198	COI	Frankliniella tritici	85%
Frankliniella parvula	TCOI3_LCO1490	COI	Frankliniella tritici	85%
Frankliniella parvula	TNTUBN_THTubAF	TUBULIN ALFA	NO HAY IDENTIDAD	
Frankliniella parvula	TNTUBN1_THTubAF	TUBULIN ALFA	Heliothrips haemorrhoidalis	83%

Para el aislamiento y caracterización molecular de la microbiota cultivada y no cultivada, Los datos de las secuencias de 16S ADNr de las bacterias cultivadas, han sido analizados en la herramienta básica de búsqueda de alineamiento local (BLAST) <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>; que está conectado con el centro nacional de información biotecnológica y para el caso de los Metagenómas. La microbiota intestinal de los trips del banano fueron analizados en la plataforma MG RAST.

Tabla 26. Aislamiento y caracterización molecular de la microbiota cultivada y no cultivada.

ESPECIE	ESTADO	CEPA	ORGANISMO	SECUENCIA MÁS CERCANA	COD. ABSESION	%IDENTIDAD
<i>F. párvula</i>	ADULTOS DESINFECTADOS	1M	<i>Acinetobacter</i>	<i>Acinetobacter soli</i>	GB859739.1	99
<i>F. párvula</i>		2M	<i>Serratia</i>	<i>Serratia nematodiphila</i>	EU914257.1	99
<i>F. párvula</i>		3M	<i>Acinetobacter</i>	<i>Acinetobacter baumannii</i>	KC900896.1	99
<i>F. párvula</i>		4M	<i>Acinetobacter</i>	<i>Acinetobacter baumannii</i>	KC900896.1	99
<i>F. párvula</i>		5M	<i>Acinetobacter</i>	<i>Acinetobacter baumannii</i>	KC900896.1	99
<i>F. párvula</i>	NINFAS DESINFECTADAS	6M	<i>Pantoea</i>	<i>Pantoea cypripedii</i>	KC153127.1	99
<i>F. párvula</i>		7M	<i>Pantoea</i>	<i>Pantoea agglomerans</i>	GQ374472.2	99
<i>F. párvula</i>		8M	<i>Pantoea</i>	<i>Pantoea cypripedii</i>	KC153127.1	99
<i>F. párvula</i>		9M	<i>Pantoea</i>	<i>Pantoea cypripedii</i>	KC153127.1	99
<i>F. párvula</i>		10M	<i>Serratia</i>	<i>Serratia marcescens</i>	GQ465847.1	100
<i>F. párvula</i>		11M	<i>Pantoea</i>	<i>Pantoea cypripedii</i>	KC153127.1	99
<i>F. párvula</i>		12M	<i>Pantoea</i>	<i>Pantoea cypripedii</i>	KC153127.1	99
<i>F. párvula</i>		13M	<i>Pantoea</i>	<i>Pantoea cypripedii</i>	KC153127.1	99
<i>F. párvula</i>	HUEVOS SIN DESINFECTAR	14M	<i>Acinetobacter</i>	<i>Acinetobacter baumannii</i>	KC900896.1	100
<i>F. párvula</i>		15M	<i>Acinetobacter</i>	<i>Acinetobacter sp.</i>	GQ478266.1	100
<i>F. párvula</i>		16M	<i>Acinetobacter</i>	<i>Acinetobacter sp.</i>	GQ478266.1	100
<i>F. párvula</i>		17M	<i>Acinetobacter</i>	<i>Acinetobacter sp.</i>	GQ478266.1	100

ESPECIE	ESTADO	CEPA	ORGANISMO	SECUENCIA MÁS CERCANA	COD. ABSESION	%IDENTIDAD
<i>F. párvula</i>	HUEVOS SIN DESINFECTADOS	18M	Acinetobacter	<i>Acinetobacter sp.</i>	GQ478266.1	100
<i>F. párvula</i>		19M	Acinetobacter	<i>Acinetobacter sp.</i>	JQ433924.1	99
<i>F. párvula</i>		20M	Acinetobacter	<i>Acinetobacter sp.</i>	JQ433924.1	99
<i>F. párvula</i>		21M	Acinetobacter	<i>Acinetobacter sp.</i>	JQ433924.1	99
<i>F. párvula</i>		22M	Acinetobacter	<i>Acinetobacter baumannii</i>	KC900896.1	100
<i>F. párvula</i>		23M	Acinetobacter	<i>Acinetobacter sp.</i>	JQ433924.1	99
<i>F. párvula</i>		24M	Acinetobacter	<i>Acinetobacter sp.</i>	JQ433924.1	99
<i>F. párvula</i>		25M	Acinetobacter	<i>Acinetobacter soli.</i>	JX966422.1	99
<i>F. párvula</i>		26M	Pantoea	<i>Pantoea cypripedii</i>	KC153127.1	99
<i>F. párvula</i>		27M	Acinetobacter	<i>Acinetobacter baumannii</i>	KC900896.1	100
<i>F. párvula</i>		28M1	Acinetobacter	<i>Acinetobacter baumannii</i>	KC900896.1	100
<i>F. párvula</i>		28M2	Acinetobacter	<i>Acinetobacter baumannii</i>	KC900896.1	100
<i>F. párvula</i>		29M	Acinetobacter	<i>Acinetobacter baumannii</i>	KC900896.1	100
<i>F. párvula</i>		30M	Acinetobacter	<i>Acinetobacter baumannii</i>	KC900896.1	100
<i>F. párvula</i>		31M	-----	<i>Uncultured bacterium</i>	JX222871.1	93
<i>F. párvula</i>	NINFAS SIN DESINFECTAR	32M	Acinetobacter	<i>Acinobacter baumannii</i>	KC900896.1	100
<i>F. párvula</i>		33M	Acinetobacter	<i>Acinetobacter sp.</i>	GQ478266.1	100
<i>F. párvula</i>		34M	Acinetobacter	<i>Acinetobacter sp.</i>	KF999996.1	99
<i>F. párvula</i>		35M	Acinetobacter	<i>Acinetobacter baylyi.</i>	Kj143626.1	99
<i>F. párvula</i>		36M	Acinetobacter	<i>Acinetobacter sp</i>	KF999996.1	99
<i>F. párvula</i>		37M	Acinetobacter	<i>Acinetobacter sp.</i>	<u>KF999996.1</u>	99

ESPECIE	ESTADO	CEPA	ORGANISMO	SECUENCIA MÁS CERCANA	COD. ABSESION	%IDENTIDAD
<i>F. párvula</i>	NINFAS S/DESI N.	38M				
<i>F. párvula</i>		39M	Serratia	<i>Serratia sp.</i>	<u>KR058830.1</u>	96
<i>F. párvula</i>		40M	Serratia	<i>Serratia sp.</i>	KF135458.1	92
<i>F. párvula</i>		41M	Acinetobacter	<i>Acinetobacter baumannii</i>	KC900896.1	99
<i>F. párvula</i>	ADULTOS SIN DESINFECTAR	44M	Erwinia	<i>Erwinia sp</i>	HQ154553.1	99
<i>F. párvula</i>		45M	Pantoea	<i>Pantoea cypripedii</i>	KC153127.1	99
<i>F. párvula</i>		46M	Acinetobacter	<i>Acinetobacter sp.</i>	JQ433924.1	99
<i>F. párvula</i>		47M	Acinetobacter	<i>Acinetobacter sp.</i>	GQ478266.1	100
<i>F. párvula</i>		48M	Pantoea	<i>Pantoea sp.</i>	KF514103.1	99
<i>F. párvula</i>		49M	Pantoea	<i>Pantoea agglomerans</i>	GQ374472.1	98
<i>F. párvula</i>		50M	Pantoea	<i>Pantoea cypripedii</i>	KC153127.1	99
<i>F. párvula</i>		51M	Pantoea	<i>Pantoea agglomerans</i>	GQ374472.1	100
<i>F. párvula</i>		52M	Acinetobacter	<i>Acinetobacter sp.</i>	GQ478266.1	100
<i>F. párvula</i>		53M	Acinetobacter	<i>Acinetobacter sp.</i>	GQ478266.1	100
<i>F. párvula</i>		54M	Acinetobacter	<i>Acinetobacter sp.</i>	GQ478266.1	100
<i>F. párvula</i>		55M	Acinetobacter	<i>Acinetobacter soli.</i>	AB859739.1	99
<i>F. párvula</i>		56M	Acinetobacter	<i>Acinetobacter sp.</i>	JQ433924.1	99
<i>F. párvula</i>		57M	Pantoea	<i>Pantoea dispersa</i>	AB273743.1	99
<i>F. párvula</i>		58M		<i>gamma proteobacterium</i>	<u>LC007678.1</u>	92
<i>F. párvula</i>		59M	Acinetobacter	<i>Acinetobacter sp</i>	JQ433924.1	99
<i>F. párvula</i>		60M	Acinetobacter	<i>Acinetobacter sp</i>	JQ433924.1	99
<i>F. párvula</i>		61M	Acinetobacter	<i>Acinetobacter sp</i>	JQ433924.1	99
<i>F. párvula</i>		62M	Acinetobacter	<i>Acinetobacter sp</i>	GQ478266.1	99
<i>F. párvula</i>		63M	Acinetobacter	<i>Acinetobacter sp</i>	GQ478266.1	99
<i>F. párvula</i>		64M	Acinetobacter	<i>Acinetobacter sp.</i>	JQ433924.1	99
<i>F. párvula</i>		65M	Pantoea	<i>Pantoea cypripedii</i>	KC153127.1	99
<i>F. párvula</i>		66M	Erwinia	<i>Erwinia sp.</i>	KF956604.1	99
<i>F. párvula</i>		67M	Erwinia	<i>Erwinia sp.</i>	HQ154553.1	99
<i>F. párvula</i>		68M	Pantoea	<i>Pantoea dispersa</i>	AB273743.1	99

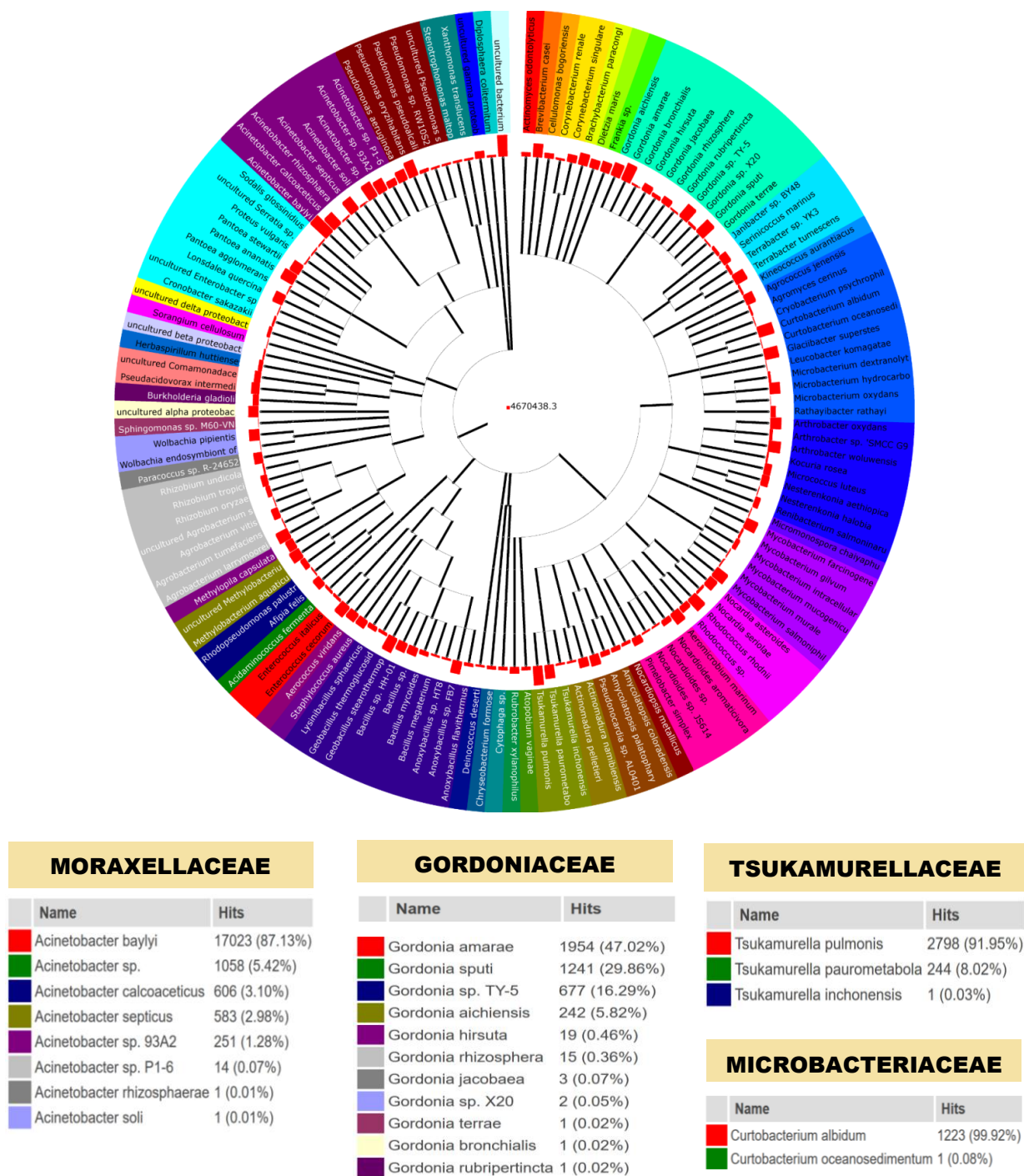


Figura 01. Metagenomas de la microbiota intestinal del estado adulto del “trips del mancha roja del banano” *C. siggnipennis*. Se lograron identificar ciento treinta y nueve especies distribuidas en cincuenta y un familias. Siendo las especies más abundantes: *Acinetobacter baylyi* y *Acinetobacter sp* (Moraxellaceae), *Tsukamurella pulmonis* (Tsukamurellaceae), *Gordonia amarae* y *Gordonia sputi* (Gordoniaceae) y *Curtobacterium albidum* (Microbacteriaceae).

Se presenta la lista completa de las bacterias según el metagenóma, familia, especie y abundancia relativa, en el estado adulto de *Ch. siggnipennis*

Tabla 27. Clasificación de bacterias en el estado adulto de *C. siggnipennis*

N°	METAGENOMA	FAMILIA	ESPECIE	ABUNDANCIA
1	ADULTO	Moraxellaceae	Acinetobacter baylyi	17022
2	ADULTO	unclassified (derived from Bacteria)	uncultured bacterium	8204
3	ADULTO	Tsukamurellaceae	Tsukamurella pulmonis	2798
4	ADULTO	Gordoniaceae	Gordonia amarae	1954
5	ADULTO	Gordoniaceae	Gordonia sputi	1241
6	ADULTO	Microbacteriaceae	Curtobacterium albidum	1223
7	ADULTO	Moraxellaceae	Acinetobacter sp.	1069
8	ADULTO	Pseudomonadaceae	Pseudomonas oryzihabitans	930
9	ADULTO	Microbacteriaceae	Glaciibacter superstes	679
10	ADULTO	Nocardiaceae	Rhodococcus rhodnii	679
11	ADULTO	Gordoniaceae	Gordonia sp. TY-5	677
12	ADULTO	Moraxellaceae	Acinetobacter calcoaceticus	597
13	ADULTO	Moraxellaceae	Acinetobacter septicus	583
14	ADULTO	Enterobacteriaceae	Pantoea ananatis	472
15	ADULTO	Mycobacteriaceae	Mycobacterium salmoniphilum	402
16	ADULTO	Rhizobiaceae	Agrobacterium larrymoorei	300
17	ADULTO	Micrococcaceae	Arthrobacter woluensis	278
18	ADULTO	Intrasporangiaceae	Terrabacter tumescens	256
19	ADULTO	Moraxellaceae	Acinetobacter sp. 93 ^a 2	251
20	ADULTO	Tsukamurellaceae	Tsukamurella paurometabola	244
21	ADULTO	Gordoniaceae	Gordonia aichiensis	242

22	ADULTO	Mycobacteriaceae	Mycobacterium farcinogenes	241
23	ADULTO	Brevibacteriaceae	Brevibacterium casei	216
24	ADULTO	Enterococcaceae	Enterococcus cecorum	202
25	ADULTO	Bacillaceae	Geobacillus stearothermophilus	177
26	ADULTO	Bacillaceae	Anoxybacillus sp. FB7	164
27	ADULTO	Micrococcaceae	Arthrobacter oxydans	152
28	ADULTO	Methylobacteriaceae	uncultured Methylobacterium sp.	134
29	ADULTO	Microbacteriaceae	Microbacterium hydrocarbonoxydans	129
30	ADULTO	Anaplasmataceae	Wolbachia pipientis	112
31	ADULTO	Enterobacteriaceae	Lonsdalea quercina	111
32	ADULTO	Dermabacteraceae	Brachybacterium paraconglomeratum	104
33	ADULTO	unclassified (derived from Alphaproteobacteria)	uncultured alpha proteobacterium	100
34	ADULTO	Nocardioidaceae	Aeromicrobium marinum	98
35	ADULTO	Enterobacteriaceae	Pantoea stewartii	98
36	ADULTO	Microbacteriaceae	Agrococcus jenensis	77
37	ADULTO	Pseudonocardiaceae	Pseudonocardia sp. AL040118-01	72
38	ADULTO	Pseudomonadaceae	Pseudomonas aeruginosa	72
39	ADULTO	Frankiaceae	Frankia sp.	61
40	ADULTO	Nocardiaceae	Nocardia asteroides	59
41	ADULTO	Rhodobacteraceae	Paracoccus sp. R-24652	53
42	ADULTO	Bacillaceae	Bacillus sp. HH-01	46

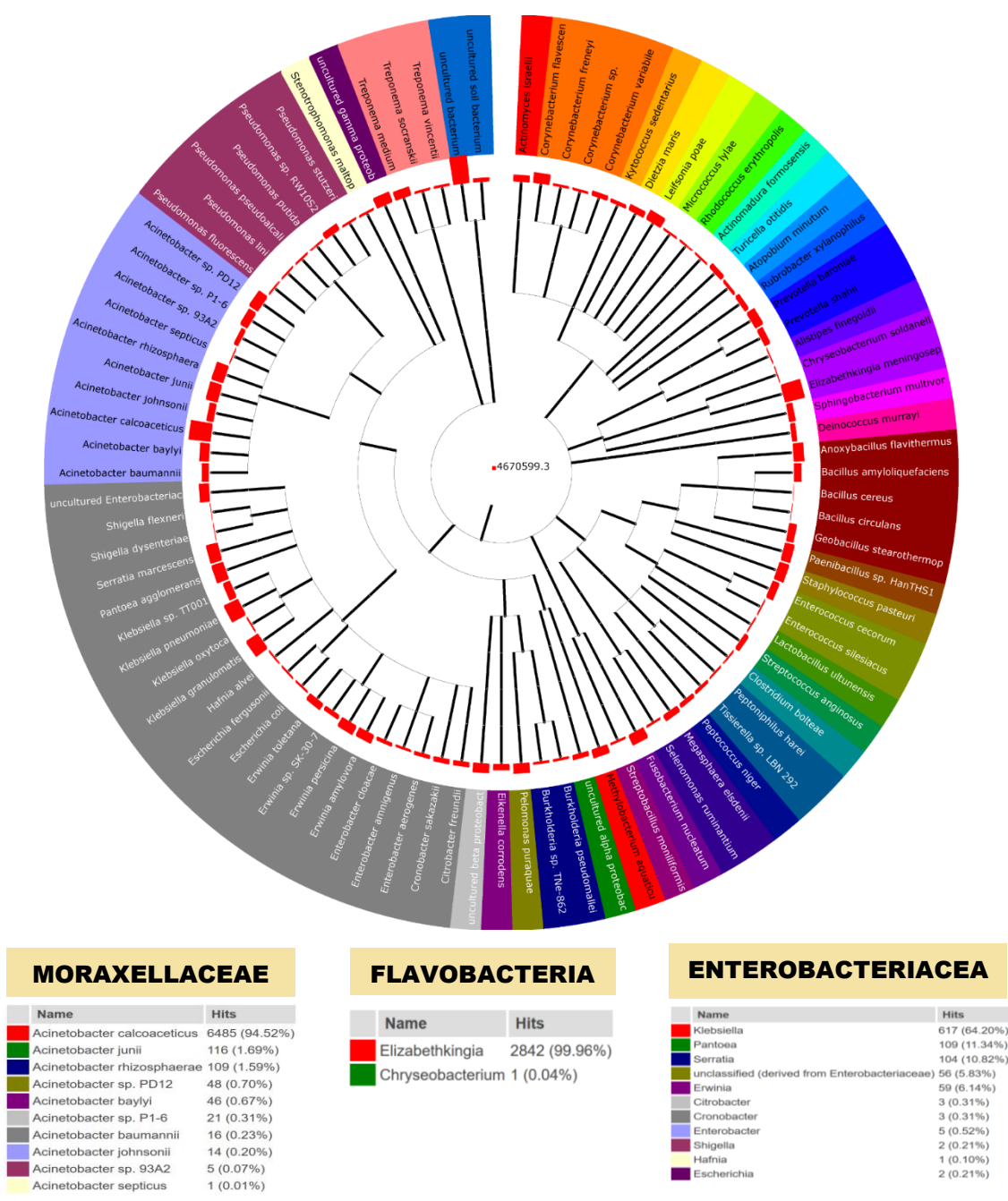
43	ADULTO	Aerococcaceae	Aerococcus viridans	44
44	ADULTO	Methylocystaceae	Methylopila capsulata	41
45	ADULTO	Comamonadaceae	Pseudacidovorax intermedius	40
46	ADULTO	Intrasporangiaceae	Serinicoccus marinus	39
47	ADULTO	Staphylococcaceae	Staphylococcus aureus	34
48	ADULTO	Thermomonosporaceae	Actinomadura namibiensis	32
49	ADULTO	Bradyrhizobiaceae	Afipia felis	31
50	ADULTO	Dietziaceae	Dietzia maris	29
51	ADULTO	Micrococcaceae	Nesterenkonia aethiopica	28
52	ADULTO	Bacillaceae	Bacillus sp.	25
53	ADULTO	Micrococcaceae	Micrococcus luteus	24
54	ADULTO	Rhizobiaceae	Agrobacterium vitis	22
55	ADULTO	Nocardioidaceae	Pimelobacter simplex	21
56	ADULTO	Gordoniaceae	Gordonia hirsuta	19
57	ADULTO	Comamonadaceae	uncultured Comamonadaceae bacterium	18
58	ADULTO	Rhizobiaceae	Rhizobium tropici	17
59	ADULTO	Corynebacteriaceae	Corynebacterium singulare	16
60	ADULTO	Gordoniaceae	Gordonia rhizosphaera	15
61	ADULTO	Burkholderiaceae	Burkholderia gladioli	15
62	ADULTO	Nocardiaceae	Rhodococcus sp.	14
63	ADULTO	Moraxellaceae	Acinetobacter sp. P1-6	14
64	ADULTO	unclassified (derived from Gammaproteobacteria)	uncultured gamma proteobacterium	12
65	ADULTO	Microbacteriaceae	Rathayibacter rathayi	11

66	ADULTO	Micrococcaceae	Renibacterium salmoninarum	10
67	ADULTO	Methylobacteriaceae	Methylobacterium aquaticum	10
68	ADULTO	Rubrobacteraceae	Rubrobacter xylanophilus	9
69	ADULTO	Nocardioideaceae	Nocardioides aromaticivorans	8
70	ADULTO	Rhizobiaceae	Rhizobium oryzae	7
71	ADULTO	Mycobacteriaceae	Mycobacterium intracellulare	6
72	ADULTO	Oxalobacteraceae	Herbaspirillum huttiense	6
73	ADULTO	Cellulomonadaceae	Cellulomonas bogoriensis	5
74	ADULTO	Pseudonocardiaceae	Amycolatopsis palatopharyngis	5
75	ADULTO	Bacillaceae	Lysinibacillus sphaericus	5
76	ADULTO	Micrococcaceae	Arthrobacter sp. 'SMCC G965'	4
77	ADULTO	Pseudonocardiaceae	Amycolatopsis coloradensis	4
78	ADULTO	Bacillaceae	Bacillus mycoides	4
79	ADULTO	unclassified (derived from Deltaproteobacteria)	uncultured delta proteobacterium	4
80	ADULTO	Actinomycetaceae	Actinomyces odontolyticus	3
81	ADULTO	Gordoniaceae	Gordonia jacobaea	3
82	ADULTO	Intrasporangiaceae	Janibacter sp. BY48	3
83	ADULTO	Intrasporangiaceae	Terrabacter sp. YK3	3
84	ADULTO	Microbacteriaceae	Microbacterium dextranolyticum	3
85	ADULTO	Gordoniaceae	Gordonia sp. X20	2
86	ADULTO	Kineosporiaceae	Kineococcus aurantiacus	2
87	ADULTO	Microbacteriaceae	Agromyces cerinus	2

88	ADULTO	Micrococcaceae	Kocuria rosea	2
89	ADULTO	Mycobacteriaceae	Mycobacterium gilvum	2
90	ADULTO	Nocardiaceae	Nocardia seriolae	2
91	ADULTO	Nocardiopsaceae	Nocardiopsis metallicus	2
92	ADULTO	Coriobacteriaceae	Atopobium vaginae	2
93	ADULTO	Cytophagaceae	Cytophaga sp.	2
94	ADULTO	Flavobacteriaceae	Chryseobacteriu m formosense	2
95	ADULTO	Bacillaceae	Anoxybacillus flavithermus	2
96	ADULTO	Bacillaceae	Geobacillus thermoglucosidas ius	2
97	ADULTO	Enterococcaceae	Enterococcus italicus	2
98	ADULTO	Acidaminococcaceae	Acidaminococcus fermentans	2
99	ADULTO	Rhizobiaceae	Rhizobium undicola	2
100	ADULTO	unclassified (derived from Betaproteobacteria)	uncultured beta proteobacterium	2
101	ADULTO	Enterobacteriaceae	Cronobacter sakazakii	2
102	ADULTO	Pseudomonadaceae	Pseudomonas pseudoalcaligene s	2
103	ADULTO	Corynebacteriaceae	Corynebacterium renale	1
104	ADULTO	Gordoniaceae	Gordonia bronchialis	1
105	ADULTO	Gordoniaceae	Gordonia rubripertincta	1
106	ADULTO	Gordoniaceae	Gordonia terrae	1
107	ADULTO	Microbacteriaceae	Cryobacterium psychrophilum	1
108	ADULTO	Microbacteriaceae	Curtobacterium oceanosedimentu m	1
109	ADULTO	Microbacteriaceae	Leucobacter komagatae	1

110	ADULTO	Microbacteriaceae	Microbacterium oxydans	1
111	ADULTO	Micrococcaceae	Nesterenkonia halobia	1
112	ADULTO	Micromonosporaceae	Micromonospora chaiyaphumensis	1
113	ADULTO	Mycobacteriaceae	Mycobacterium mucogenicum	1
114	ADULTO	Mycobacteriaceae	Mycobacterium murale	1
115	ADULTO	Nocardiodaceae	Nocardioides sp.	1
116	ADULTO	Nocardiodaceae	Nocardioides sp. JS614	1
117	ADULTO	Thermomonosporaceae	Actinomadura pelletieri	1
118	ADULTO	Tsukamurellaceae	Tsukamurella inchonensis	1
119	ADULTO	Deinococcaceae	Deinococcus deserti	1
120	ADULTO	Bacillaceae	Anoxybacillus sp. HT8	1
121	ADULTO	Bacillaceae	Bacillus megaterium	1
122	ADULTO	Bradyrhizobiaceae	Rhodopseudomonas palustris	1
123	ADULTO	Rhizobiaceae	Agrobacterium tumefaciens	1
124	ADULTO	Rhizobiaceae	uncultured Agrobacterium sp.	1
125	ADULTO	Anaplasmataceae	Wolbachia endosymbiont of Drosophila willistoni	1
126	ADULTO	Sphingomonadaceae	Sphingomonas sp. M60-VN10-2W	1
127	ADULTO	Polyangiaceae	Sorangium cellulosum	1
128	ADULTO	Enterobacteriaceae	uncultured Enterobacter sp.	1
129	ADULTO	Enterobacteriaceae	Pantoea agglomerans	1
130	ADULTO	Enterobacteriaceae	Proteus vulgaris	1

131	ADULTO	Enterobacteriaceae	uncultured Serratia sp.	1
132	ADULTO	Enterobacteriaceae	Sodalis glossinidius	1
133	ADULTO	Moraxellaceae	Acinetobacter rhizosphaerae	1
134	ADULTO	Moraxellaceae	Acinetobacter soli	1
135	ADULTO	Pseudomonadaceae	Pseudomonas sp. RW10S2	1
136	ADULTO	Pseudomonadaceae	uncultured Pseudomonas sp.	1
137	ADULTO	Xanthomonadaceae	Stenotrophomona s maltophilia	1
138	ADULTO	Xanthomonadaceae	Xanthomonas translucens	1
139	ADULTO	Opitutaceae	Diplosphaera colitermitum	1



FiURA 02. Metagenóma de la microbiota intestinal del huevo del “trips de la flor del banano” *F. occidentalis*. Se lograron identificar noventiun especies distribuidas en cuarenta y un familias. Siendo las especies más abundantes: *Acinetobacter calcoaceticus*, *Acinetobacter junii* y *Acinetobacter rhizosphaerae* (Moraxellaceae), *Elizabethkingia meningoseptica* (Flavobacteriaceae) *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella granulomatis*, *Serratia marcescens*, *Pantoea agglomerans* (Enterobacteriaceae).

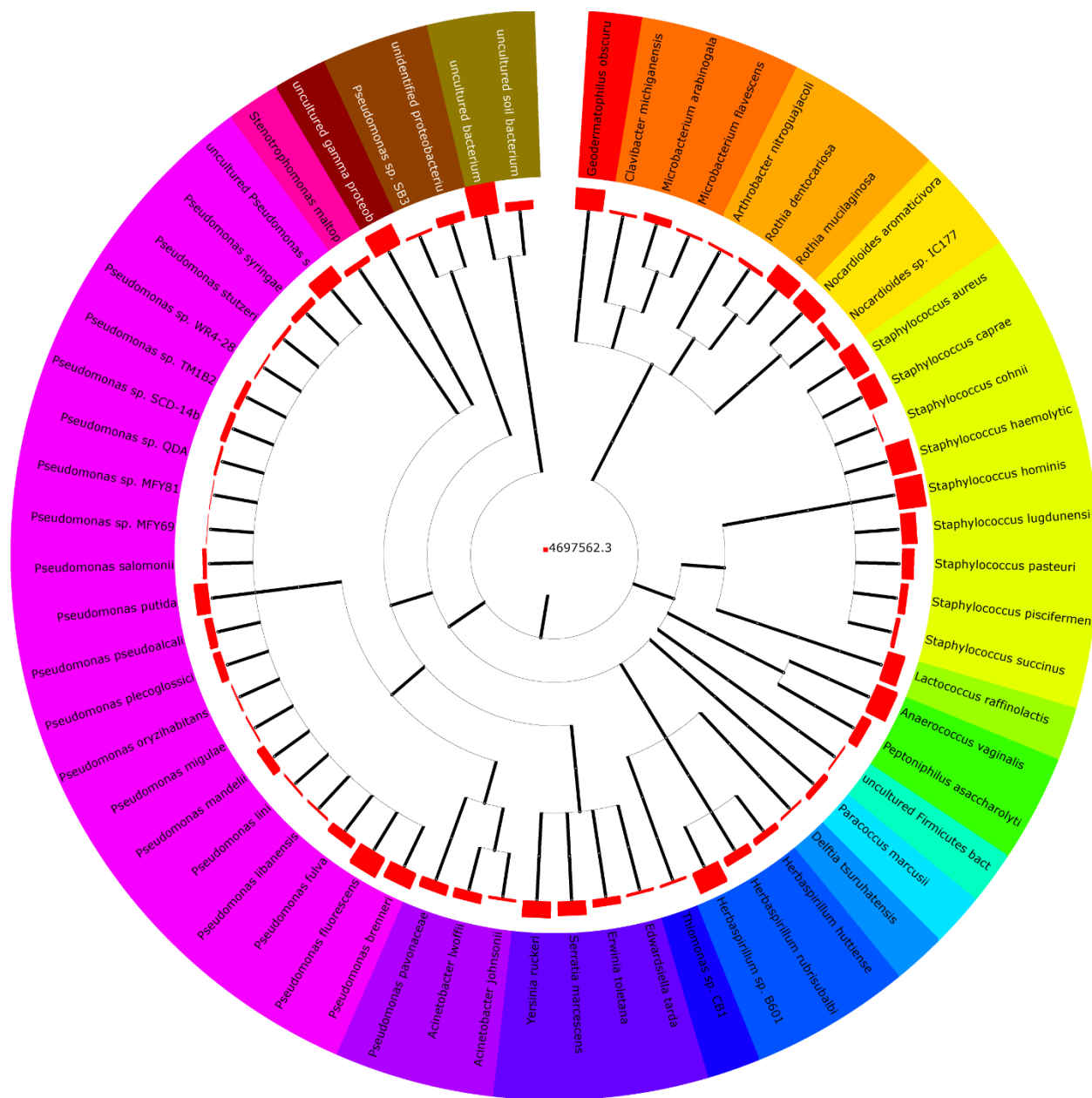


Figura 03. Metagenóma de la microbiota intestinal de estado ninfal del “trips de la flor del banano” *F. occidentalis*. Se lograron identificar sesenta y dos, distribuidas en diecinueve familias. Siendo las especies más abundantes unclassified bacterium (unclassified derived from Bacteria), *Staphylococcus hominis*, *Staphylococcus haemolyticus*, *Staphylococcus caprae*, *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus lugdunensis* (Staphylococcaceae), *Herbaspirillum* sp. B601 (Oxalobacteraceae), *Anaerococcus vaginalis* (Clostridiales Family XI. Incertae Sedis), *Pseudomonas fluorescens*, unclassified *Pseudomonas* sp y *Pseudomonas brenneri* (Pseudomonadaceae), unclassified gamma proteobacterium (unclassified derived from Gammaproteobacteria), *Geodermatophilus obscurus* (Geodermatophilaceae), (Staphylococcaceae), *Rothia mucilaginosa* (Micrococcaceae), *Lactococcus*

raffinolactis (Streptococcaceae), (Staphylococcaceae), *Nocardioides aromaticivorans* (Nocardioidaceae), *Yersinia ruckeri* (Enterobacteriaceae).

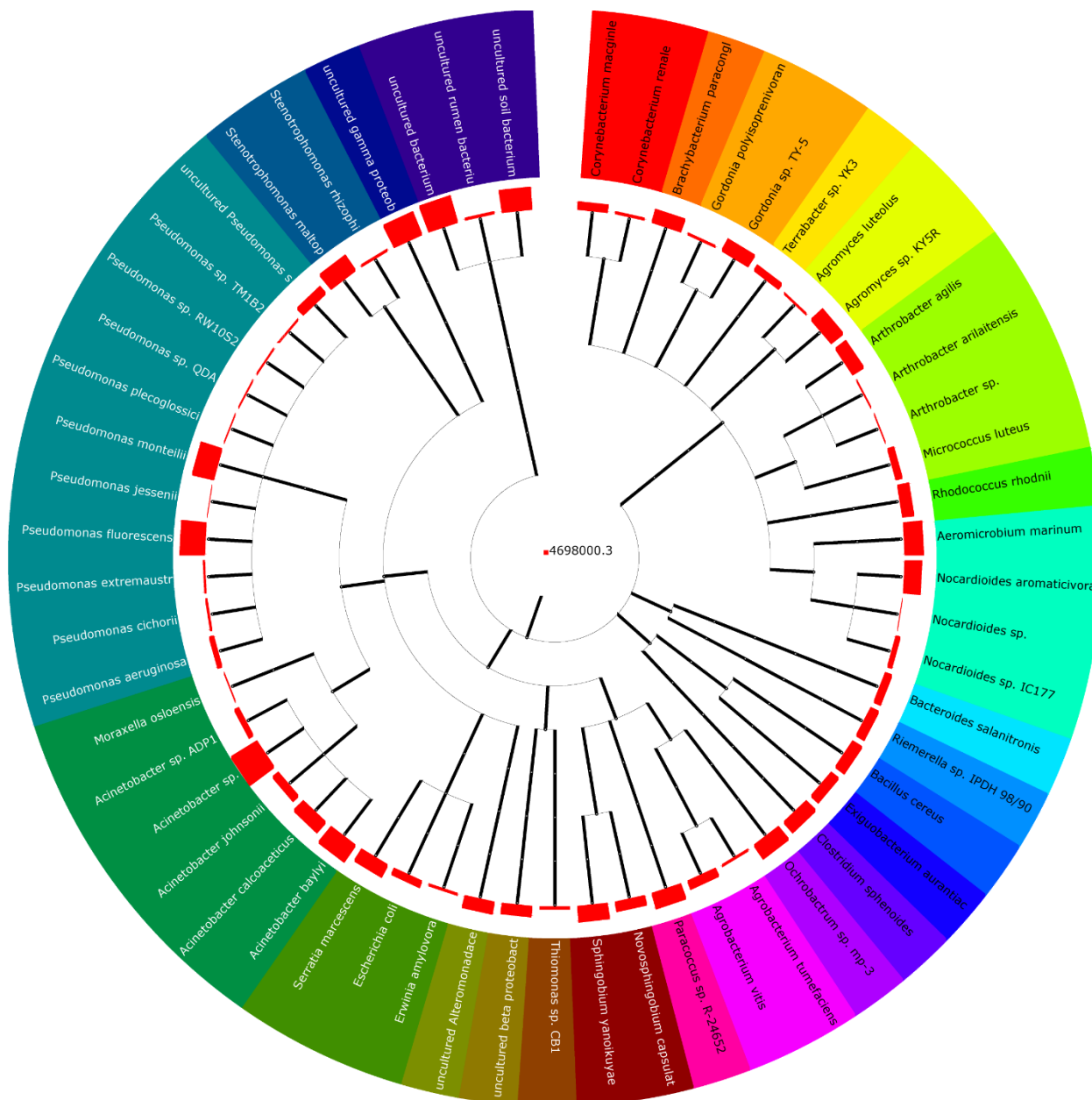


Figura 04. Metagenoma de la microbiota intestinal de estado Adulto del "trips de la flor del banano" *F. occidentalis*. Se lograron identificar cincuenta y siete especies, distribuidas en veintiséis familias. Siendo las especies más abundantes *Acinetobacter sp* y *Acinetobacter baylyi* (Moraxellaceae), *uncultured bacterium* y *uncultured soil bacterium* (unclassified derived from Bacteria), *Pseudomonas fluorescens* y *Pseudomonas monteilii* (Pseudomonadaceae), *uncultured gamma proteobacterium* (unclassified (derived from Gammaproteobacteria), *Nocardioides aromaticivorans* y *Aeromicrobium marinum* (Nocardioidaceae), *Stenotrophomonas maltophilia* (Xanthomonadaceae), *Ochrobactrum sp. mp-3* (Brucellaceae), *Agromyces sp.*

KY5R(Microbacteriaceae), *Paracoccus* sp. R-24652 (Rhodobacteraceae),
Sphingobium yanoikuyae (Sphingomonadaceae).

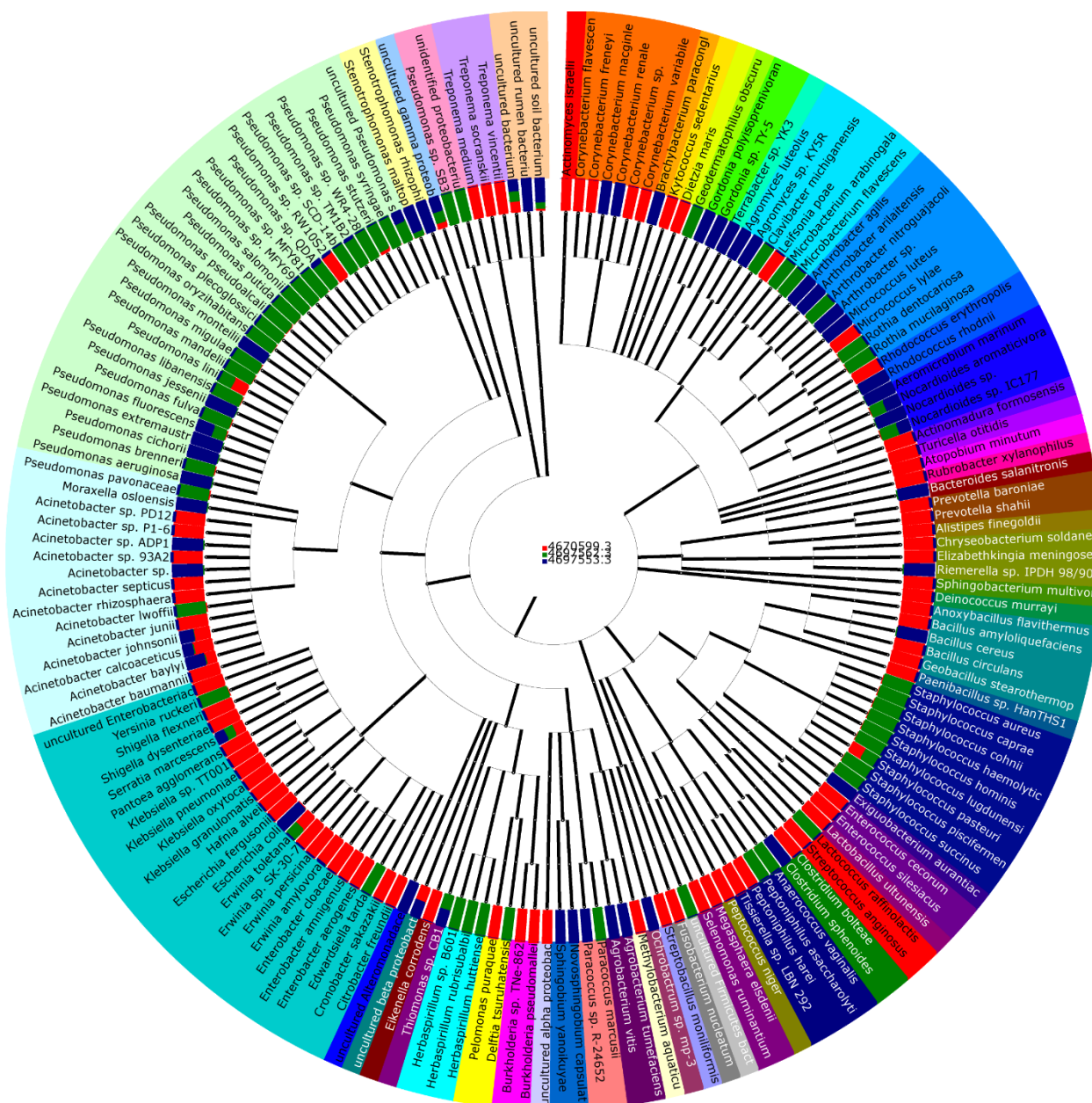
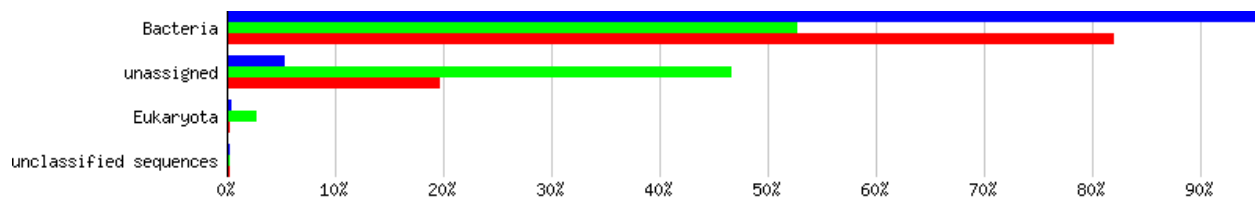


Figura 05. Metagenómas de la microbiota del huevo (azul), ninfa (verde) y adulto (rojo) “trips de la flor del banano” *F. occidentalis*. Las especies que se han encontrado en los tres metagenómas son: *Acinetobacter johnsonii*, *Pseudomonas fluorescens*, *Serratia marcescens*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *uncultured*

bacterium, uncultured gamma proteobacterium y uncultured soil bacterium.

Figura 6. Distribución de dominios encontrados en los metagenómas de la microbiota del huevo (azul), ninfa (verde) y adulto (rojo) “trips de la flor del banano” *F. occidentalis*.



Los patrones de asignación al 16S ARNr presentes en la muestra representan el 94.72 % en el metagenóma bacteriano de huevos, 51.74 % en ninfa y 80.70 % en Adulto. Las secuencias unassigned (no asignadas) han sido obtenidas de los productos de amplificación en la PCR en la secuenciación, sin embargo no tienen un patrón de asignación a la región 16S ARNr y representan un 5.06 % en huevo, 45.79 % en Ninfa y 19.28 % en adulto. Secuencias que poseen un patrón de similitud a organismos eucariotas (Eukaryota), y secuencias no clasificadas (unclassified sequences), obtenidas de los productos de amplificación en la PCR en la secuenciación, sin embargo no se pueden clasificar en ningún taxón existente en la base de datos del centro nacional de información biotecnológica (NCBI por sus siglas en ingles).

Tabla 29. Bacterias según el metagenoma, familia, especie y abundancia relativa en cada muestra (huevo, ninfa y adulto).

N°	METAGENOMA	FAMILIA	ESPECIES	ABUNDANCIA
1	HUEVO	unclassified (derived from Bacteria)	uncultured bacterium	29515
2	ADULTO	Moraxellaceae	Acinetobacter sp.	27542
3	NINFA	unclassified (derived from Bacteria)	uncultured bacterium	22745
4	NINFA	Staphylococcaceae	Staphylococcus hominis	14522
5	ADULTO	unclassified (derived from Bacteria)	uncultured bacterium	6833
6	HUEVO	Moraxellaceae	Acinetobacter calcoaceticus	6474
7	ADULTO	Pseudomonadaceae	Pseudomonas fluorescens	6181
8	NINFA	Staphylococcaceae	Staphylococcus haemolyticus	4613
9	NINFA	Oxalobacteraceae	Herbaspirillum sp. B601	4429
10	HUEVO	Flavobacteriaceae	Elizabethkingia meningoseptica	2841
11	ADULTO	unclassified (derived from Gammaproteobacteria)	uncultured gamma proteobacterium	2768
12	NINFA	Clostridiales Family XI. Incertae Sedis	Anaerococcus vaginalis	2002
13	ADULTO	Pseudomonadaceae	Pseudomonas monteilii	1928
14	NINFA	Pseudomonadaceae	Pseudomonas fluorescens	1135
15	NINFA	unclassified (derived from Gammaproteobacteria)	uncultured gamma proteobacterium	1098
16	ADULTO	unclassified (derived from Bacteria)	uncultured soil bacterium	1095
17	NINFA	Geodermatophilaceae	Geodermatophilus obscurus	779
18	NINFA	Staphylococcaceae	Staphylococcus caprae	778
19	ADULTO	Moraxellaceae	Acinetobacter baylyi	716
20	NINFA	Micrococcaceae	Rothia	491

			mucilaginoso	
21	NINFA	Streptococcaceae	Lactococcus raffinolactis	422
22	ADULTO	Nocardiodaceae	Nocardioide aromaticivorans	404
23	HUEVO	Enterobacteriaceae	Klebsiella pneumoniae	371
24	ADULTO	Nocardiodaceae	Aeromicrobium marinum	368
25	ADULTO	Xanthomonadaceae	Stenotrophomonas maltophilia	365
26	NINFA	Staphylococcaceae	Staphylococcus aureus	363
27	NINFA	Nocardiodaceae	Nocardioide aromaticivorans	331
28	NINFA	Pseudomonadaceae	uncultured Pseudomonas sp.	297
29	NINFA	Staphylococcaceae	Staphylococcus lugdunensis	219
30	HUEVO	Enterobacteriaceae	Klebsiella granulomatis	213
31	ADULTO	Brucellaceae	Ochrobactrum sp. mp-3	192
32	NINFA	Pseudomonadaceae	Pseudomonas brenneri	181
33	ADULTO	Microbacteriaceae	Agromyces sp. KY5R	180
34	ADULTO	Rhodobacteraceae	Paracoccus sp. R-24652	135
35	NINFA	Enterobacteriaceae	Yersinia ruckeri	125
36	HUEVO	Moraxellaceae	Acinetobacter junii	116
37	ADULTO	Sphingomonadaceae	Sphingobium yanoikuyae	112
38	HUEVO	Enterobacteriaceae	Pantoea agglomerans	110
39	HUEVO	Moraxellaceae	Acinetobacter rhizosphaerae	109
40	HUEVO	Enterobacteriaceae	Serratia marcescens	104
41	NINFA	Pseudomonadaceae	Pseudomonas putida	92
42	ADULTO	Clostridiaceae	Clostridium sphenoides	85

43	ADULTO	Moraxellaceae	Acinetobacter calcoaceticus	82
44	ADULTO	Micrococcaceae	Arthrobacter agilis	77
45	ADULTO	Enterobacteriaceae	Serratia marcescens	72
46	HUEVO	Bacillaceae	Anoxybacillus flavithermus	68
47	ADULTO	Gordoniaceae	Gordonia sp. TY-5	61
48	ADULTO	Nocardiaceae	Rhodococcus rhodnii	59
49	HUEVO	Enterobacteriaceae	uncultured Enterobacteriaceae bacterium	58
50	ADULTO	Dermabacteraceae	Brachybacterium paraconglomeratum	57
51	NINFA	Enterobacteriaceae	Serratia marcescens	57
52	NINFA	Staphylococcaceae	Staphylococcus pasteurii	54
53	HUEVO	Moraxellaceae	Acinetobacter sp. PD12	48
54	HUEVO	Staphylococcaceae	Staphylococcus pasteurii	47
55	HUEVO	Moraxellaceae	Acinetobacter baylyi	46
56	HUEVO	Paenibacillaceae	Paenibacillus sp. HanTHS1	45
57	HUEVO	Fusobacteriaceae	Fusobacterium nucleatum	44
58	ADULTO	Alteromonadaceae	uncultured Alteromonadaceae bacterium	36
59	HUEVO	unclassified (derived from Gammaproteobacteria)	uncultured gamma proteobacterium	36
60	ADULTO	Bacillaceae	Bacillus cereus	33
61	HUEVO	Microbacteriaceae	Leifsonia poae	32
62	NINFA	Clostridiales Family XI. Incertae Sedis	Peptoniphilus asaccharolyticus	30
63	HUEVO	Corynebacteriaceae	Corynebacterium flavescens	29
64	HUEVO	Enterobacteriaceae	Erwinia	29

			amylovora	
65	HUEVO	Prevotellaceae	Prevotella baroniae	28
66	HUEVO	Enterobacteriaceae	Erwinia persicina	27
67	ADULTO	unclassified (derived from Bacillales)	Exiguobacterium aurantiacum	24
68	HUEVO	Comamonadaceae	Pelomonas puraquae	23
69	HUEVO	Moraxellaceae	Acinetobacter sp. P1-6	21
70	ADULTO	Flavobacteriaceae	Riemerella sp. IPDH 98/90	21
71	HUEVO	Bacillaceae	Bacillus amyloliquefaciens	20
72	HUEVO	Bacillaceae	Geobacillus stearothermophilus	19
73	NINFA	Moraxellaceae	Pseudomonas pavonaceae	19
74	ADULTO	unclassified (derived from Betaproteobacteria)	uncultured beta proteobacterium	19
75	HUEVO	unclassified (derived from Betaproteobacteria)	uncultured beta proteobacterium	18
76	HUEVO	Enterobacteriaceae	Klebsiella sp. TT001	17
77	HUEVO	Spirochaetaceae	Treponema medium	17
78	HUEVO	Moraxellaceae	Acinetobacter baumannii	16
79	HUEVO	Enterococcaceae	Enterococcus cecorum	16
80	HUEVO	Methylobacteriaceae	Methylobacterium aquaticum	16
81	NINFA	Pseudomonadaceae	Pseudomonas mandelii	16
82	ADULTO	Sphingomonadaceae	Novosphingobium capsulatum	15
83	NINFA	Pseudomonadaceae	Pseudomonas fulva	15
84	NINFA	Pseudomonadaceae	Pseudomonas pseudoalcaligenes	15

85	HUEVO	Moraxellaceae	Acinetobacter johnsonii	14
86	NINFA	Staphylococcaceae	Staphylococcus piscifermentans	13
87	ADULTO	Pseudomonadaceae	uncultured Pseudomonas sp.	13
88	NINFA	Moraxellaceae	Acinetobacter lwoffii	12
89	ADULTO	Rhizobiaceae	Agrobacterium vitis	12
90	ADULTO	Bacteroidaceae	Bacteroides salanitronis	12
91	NINFA	Oxalobacteraceae	Herbaspirillum rubrisubalbicans	12
92	HUEVO	Sphingobacteriaceae	Sphingobacterium multivorum	12
93	NINFA	unclassified (derived from Proteobacteria)	unidentified proteobacterium	12
94	ADULTO	Moraxellaceae	Acinetobacter johnsonii	10
95	HUEVO	Enterobacteriaceae	Erwinia toletana	10
96	ADULTO	Micrococcaceae	Micrococcus luteus	10
97	NINFA	Nocardioidaceae	Nocardioides sp. IC177	10
98	HUEVO	Prevotellaceae	Prevotella shahii	9
99	NINFA	unclassified (derived from Bacteria)	uncultured soil bacterium	9
100	HUEVO	Pseudomonadaceae	Pseudomonas sp. RW10S2	8
101	ADULTO	Corynebacteriaceae	Corynebacterium macginleyi	7
102	HUEVO	Deinococcaceae	Deinococcus murrayi	7
103	NINFA	Enterobacteriaceae	Erwinia toletana	7
104	HUEVO	Veillonellaceae	Megasphaera elsdenii	7
105	NINFA	Microbacteriaceae	Microbacterium arabinogalactanolyticum	7
106	NINFA	Pseudomonadaceae	Pseudomonas sp. SCD-14b	7
107	HUEVO	Actinomycetaceae	Actinomyces	6

			israelii	
108	HUEVO	Dietziaceae	Dietzia maris	6
109	ADULTO	Enterobacteriaceae	Escherichia coli	6
110	NINFA	Pseudomonadaceae	Pseudomonas plecoglossicida	6
111	NINFA	Pseudomonadaceae	Pseudomonas sp. TM1B2	6
112	NINFA	Pseudomonadaceae	Pseudomonas syringae	6
113	ADULTO	Intrasporangiaceae	Terrabacter sp. YK3	6
114	HUEVO	Moraxellaceae	Acinetobacter sp. 93 ^a 2	5
115	ADULTO	Moraxellaceae	Acinetobacter sp. ADP1	5
116	HUEVO	Neisseriaceae	Eikenella corrodens	5
117	ADULTO	Nocardioidaceae	Nocardioides sp. IC177	5
118	NINFA	Rhodobacteraceae	Paracoccus marcusii	5
119	ADULTO	Pseudomonadaceae	Pseudomonas aeruginosa	5
120	HUEVO	Rubrobacteraceae	Rubrobacter xylanophilus	5
121	HUEVO	Streptococcaceae	Streptococcus anginosus	5
122	HUEVO	unclassified (derived from Bifidobacteriales)	Turicella otitidis	5
123	NINFA	Pseudomonadaceae	Pseudomonas salomonii	4
124	NINFA	Xanthomonadaceae	Stenotrophomonas maltophilia	4
125	HUEVO	Enterobacteriaceae	Citrobacter freundii	3
126	HUEVO	Corynebacteriaceae	Corynebacterium variable	3
127	HUEVO	Enterobacteriaceae	Cronobacter sakazakii	3
128	HUEVO	Enterobacteriaceae	Erwinia sp. SK- 30-7	3
129	HUEVO	Peptococcaceae	Peptococcus niger	3
130	NINFA	Staphylococcaceae	Staphylococcus succinus	3

131	HUEVO	unclassified (derived from Alphaproteobacteria)	uncultured alpha proteobacterium	3
132	HUEVO	Coriobacteriaceae	Atopobium minutum	2
133	HUEVO	Enterobacteriaceae	Enterobacter aerogenes	2
134	HUEVO	Enterobacteriaceae	Enterobacter cloacae	2
135	NINFA	Oxalobacteraceae	Herbaspirillum huttiense	2
136	HUEVO	Dermacoccaceae	Kytococcus sedentarius	2
137	ADULTO	Pseudomonadaceae	Pseudomonas cichorii	2
138	ADULTO	Pseudomonadaceae	Pseudomonas extremaustralis	2
139	NINFA	Pseudomonadaceae	Pseudomonas lini	2
140	NINFA	Pseudomonadaceae	Pseudomonas sp. QDA	2
141	NINFA	Pseudomonadaceae	Pseudomonas stutzeri	2
142	NINFA	Micrococcaceae	Rothia dentocariosa	2
143	HUEVO	Clostridiales Family XI. Incertae Sedis	Tissierella sp. LBN 292	2
144	HUEVO	unclassified (derived from Bacteria)	uncultured soil bacterium	2
145	NINFA	Moraxellaceae	Acinetobacter johnsonii	1
146	HUEVO	Moraxellaceae	Acinetobacter septicus	1
147	HUEVO	Thermomonosporaceae	Actinomadura formosensis	1
148	ADULTO	Rhizobiaceae	Agrobacterium tumefaciens	1
149	ADULTO	Microbacteriaceae	Agromyces luteolus	1
150	HUEVO	Rikenellaceae	Alistipes finegoldii	1
151	ADULTO	Micrococcaceae	Arthrobacter arilaitensis	1
152	NINFA	Micrococcaceae	Arthrobacter nitroguajacolicus	1

153	ADULTO	Micrococcaceae	Arthrobacter sp.	1
154	HUEVO	Bacillaceae	Bacillus cereus	1
155	HUEVO	Bacillaceae	Bacillus circulans	1
156	HUEVO	Burkholderiaceae	Burkholderia pseudomallei	1
157	HUEVO	Burkholderiaceae	Burkholderia sp. TNe-862	1
158	HUEVO	Flavobacteriaceae	Chryseobacterium soldanellicola	1
159	NINFA	Microbacteriaceae	Clavibacter michiganensis	1
160	HUEVO	Clostridiaceae	Clostridium bolteae	1
161	HUEVO	Corynebacteriaceae	Corynebacterium freneyi	1
162	ADULTO	Corynebacteriaceae	Corynebacterium renale	1
163	HUEVO	Corynebacteriaceae	Corynebacterium sp.	1
164	NINFA	Comamonadaceae	Delftia tsuruhatensis	1
165	NINFA	Enterobacteriaceae	Edwardsiella tarda	1
166	HUEVO	Enterobacteriaceae	Enterobacter amnigenus	1
167	HUEVO	Enterococcaceae	Enterococcus silesiacus	1
168	ADULTO	Enterobacteriaceae	Erwinia amylovora	1
169	HUEVO	Enterobacteriaceae	Escherichia coli	1
170	HUEVO	Enterobacteriaceae	Escherichia fergusonii	1
171	ADULTO	Gordoniaceae	Gordonia polyisoprenivorans	1
172	HUEVO	Enterobacteriaceae	Hafnia alvei	1
173	HUEVO	Enterobacteriaceae	Klebsiella oxytoca	1
174	HUEVO	Lactobacillaceae	Lactobacillus ultunensis	1
175	NINFA	Microbacteriaceae	Microbacterium flavescens	1
176	HUEVO	Micrococcaceae	Micrococcus lylae	1
177	ADULTO	Moraxellaceae	Moraxella	1

			osloensis	
178	ADULTO	Nocardioideaceae	Nocardioideus sp.	1
179	HUEVO	Clostridiales Family XI. Incertain Sedis	Peptoniphilus harei	1
180	HUEVO	Pseudomonadaceae	Pseudomonas fluorescens	1
181	ADULTO	Pseudomonadaceae	Pseudomonas jessenii	1
182	NINFA	Pseudomonadaceae	Pseudomonas libanensis	1
183	HUEVO	Pseudomonadaceae	Pseudomonas lini	1
184	NINFA	Pseudomonadaceae	Pseudomonas migulae	1
185	NINFA	Pseudomonadaceae	Pseudomonas oryzihabitans	1
186	ADULTO	Pseudomonadaceae	Pseudomonas plecoglossicida	1
187	HUEVO	Pseudomonadaceae	Pseudomonas pseudoalcaligenes	1
188	HUEVO	Pseudomonadaceae	Pseudomonas putida	1
189	NINFA	Pseudomonadaceae	Pseudomonas sp. MFY69	1
190	NINFA	Pseudomonadaceae	Pseudomonas sp. MFY81	1
191	ADULTO	Pseudomonadaceae	Pseudomonas sp. QDA	1
192	ADULTO	Pseudomonadaceae	Pseudomonas sp. RW10S2	1
193	NINFA	unclassified (derived from Proteobacteria)	Pseudomonas sp. SB3	1
194	ADULTO	Pseudomonadaceae	Pseudomonas sp. TM1B2	1
195	NINFA	Pseudomonadaceae	Pseudomonas sp. WR4-28	1
196	HUEVO	Pseudomonadaceae	Pseudomonas stutzeri	1
197	HUEVO	Nocardiaceae	Rhodococcus erythropolis	1
198	HUEVO	Veillonellaceae	Selenomonas ruminantium	1
199	HUEVO	Enterobacteriaceae	Shigella dysenteriae	1

200	HUEVO	Enterobacteriaceae	<i>Shigella flexneri</i>	1
201	NINFA	Staphylococcaceae	<i>Staphylococcus cohnii</i>	1
202	HUEVO	Xanthomonadaceae	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	1
203	ADULTO	Xanthomonadaceae	<i>Stenotrophomonas rhizophila</i>	1
204	HUEVO	Leptotrichiaceae	<i>Streptobacillus moniliformis</i>	1
205	NINFA	unclassified (derived from Burkholderiales)	<i>Thiomonas</i> sp. CB1	1
206	ADULTO	unclassified (derived from Burkholderiales)	<i>Thiomonas</i> sp. CB1	1
207	HUEVO	Spirochaetaceae	<i>Treponema socranskii</i>	1
208	HUEVO	Spirochaetaceae	<i>Treponema vincentii</i>	1
209	NINFA	unclassified (derived from Firmicutes)	uncultured Firmicutes bacterium	1
210	ADULTO	unclassified (derived from Bacteria)	uncultured rumen bacterium	1

Respecto a la caracterización molecular de la microbiota cultivada a nivel de espectrometría de masas MALDI TOF/TOF, se presentan los picos de espectros de masas del primer tiempo de vuelo (TOF), de cada muestra y las secuencias peptídicas de la fragmentación del ión precursor de los picos representativos de cada muestra (TOF/TOF).

Figura 07. Perfil de masas obtenidos por MS MALDI TOF de muestra: *Serratia marcescens*

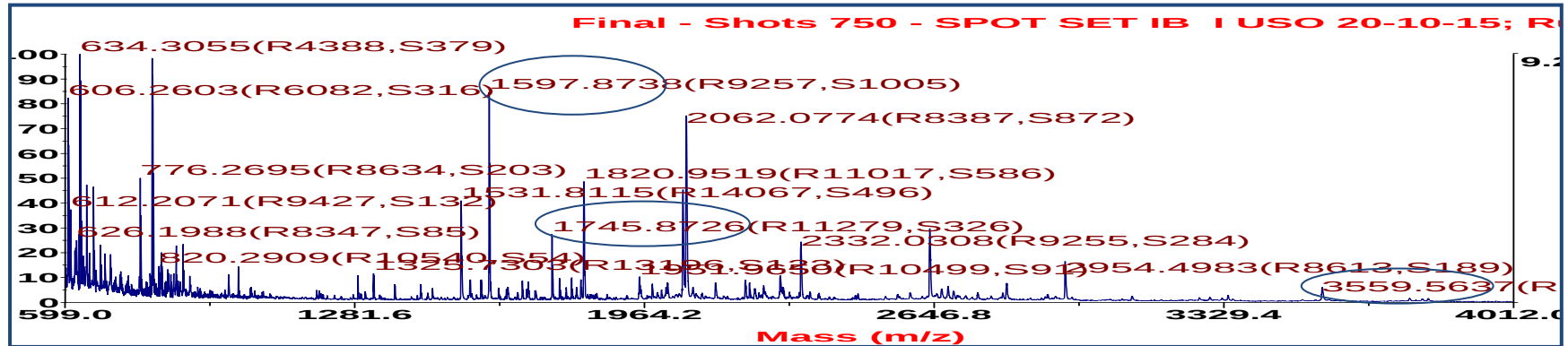


Figura 08. Fragmentos del ion precursor obtenidos por MS MALDI TOF – TOF

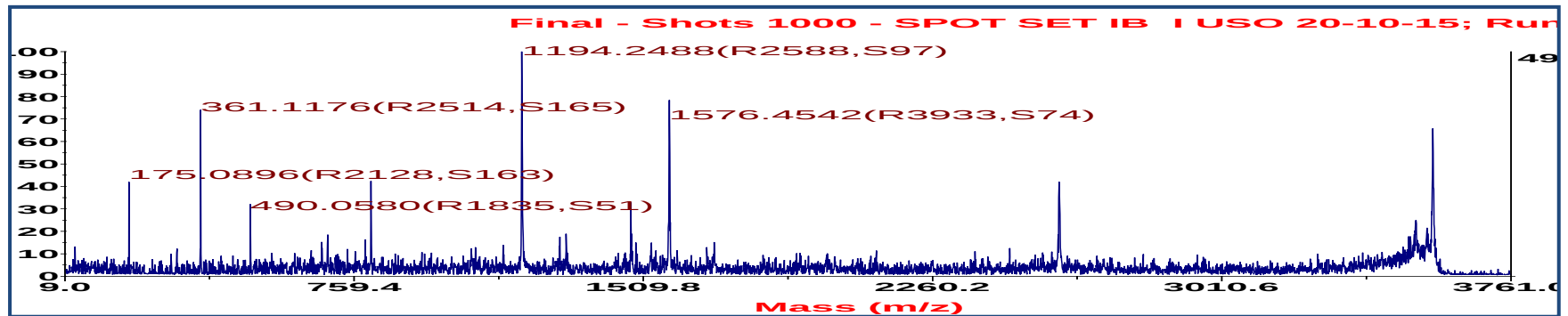


Figura 09. Fragmentos del ion precursor obtenido por MS MALDI TOF – TOF.

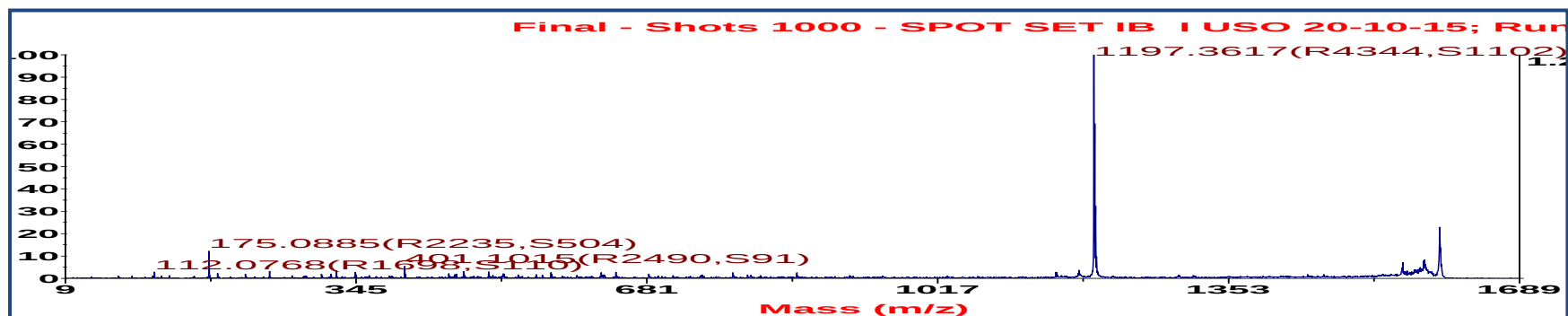
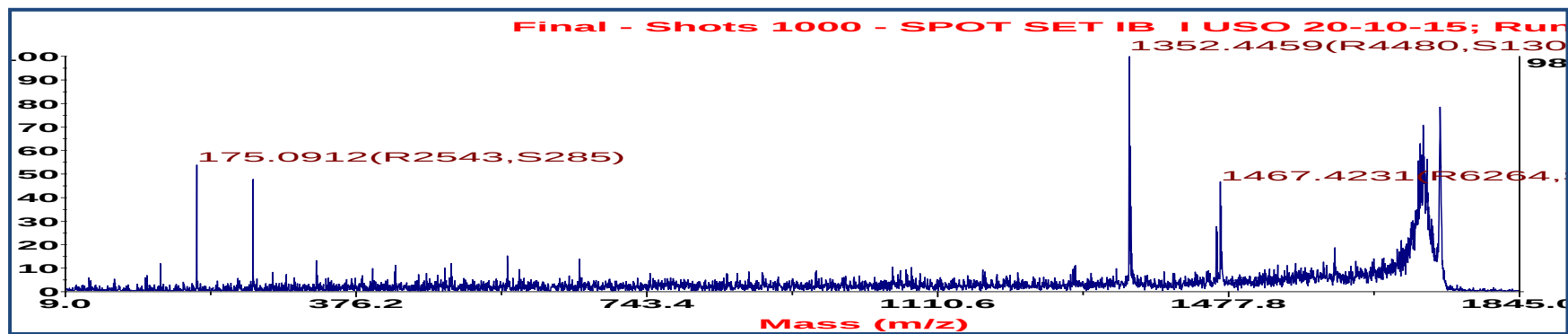


Figura 10. Fragmentos del ion precursor obtenido por MS MALDI TOF – TOF



Código de muestra: R3 (REPLICA3) caracterizada por gen 16S rRNA (*Serratia marcescens*) Con el ProteinPilot™ Software 4.0, Paragon™ Algorithm: Detected Protein Threshold [Unused ProtScore (Conf)] >0.70 (80.0%) se logró la identificación de secuencias de más de 90% de confianza utilizando como Data base: Uniprot-Serratia+marcescens.fasta. En la tabla N°30 se muestra la secuencia de aminoácidos del ion precursor fragmentada por espectrometría de masas MS MALDI TOF-TOF.

Tabla 30. Secuencia de aminoácidos del ion precursor fragmentada por espectrometría de masas MS MALDI TOF-TOF

Spectrum	Time	Prec MW	Prec m/z	Prec z	Prot N	Best Sequence	Modifications	Conf	Theor MW	z
1.B13.8.1.1	0	2061.07	2062.0769	1	2	IHAEVPLSEMFYATQLR		99	2061.0354	1
1.B13.8.1.2	0	1596.867	1597.874	1	2	IATDPFVGNLTFFR		99	1596.8301	1
1.B13.8.1.12	0	1744.866	1745.873	1	2	YDDAPNNVAQAVIEAR		99	1744.838	1
1.B13.8.1.17	0	3558.557	3559.564	1	2	AINWNEEDAGVTFEYEDVPADMMELAEWR		99	3558.5232	1
1.B15.8.1.1	0	1956.987	1957.994	1	1	IIELAEALDSYIPEPER		99	1957.0044	1
1.B15.8.1.2	0	1918.953	1919.96	1	1	ELLSAYDFPGDDLPIR		99	1918.9677	1
1.B15.8.1.4	0	2116.132	2117.1389	1	1	AIDKPFLLPIEDVFSISGR		99	2116.1567	1
1.B15.8.1.5	0	2236.967	2237.9741	1	1	CDMVDDEELLELVEMEV	Carbamidomethyl@1, Asp->Glu@2	99	2236.9902	1
1.B15.8.1.6	0	2728.305	2729.312	1	1	NMITGAAQMDGAILVVAATDGPMPQTR		99	2728.3347	1
1.D16.8.1.8	0	1968.938	1969.9449	1	3	FIEQDPEGQYGLEAAFR		99	1968.9218	1
1.D17.8.1.14	0	2083.998	2085.0049	1	3	GSWLDFEFDPKDNLFVR		99	2084.0002	1
1.D18.8.1.2	0	2061.039	2062.0459	1	2	IHAEVPLSEMFYATQLR		99	2061.0354	1
1.D20.8.1.5	0	1918.95	1919.957	1	1	ELLSAYDFPGDDLPIR		99	1918.9677	1
1.D20.8.1.7	0	1956.984	1957.991	1	1	IIELAEALDSYIPEPER		99	1957.0044	1
1.D20.8.1.11	0	2236.964	2237.9709	1	1	CDMVDDEELLELVEMEV	Carbamidomethyl@1, Asp->Glu@5	99	2236.9902	1
1.D21.8.1.4	0	1918.951	1919.958	1	1	ELLSAYDFPGDDLPIR		99	1918.9677	1
1.D21.8.1.7	0	1956.981	1957.988	1	1	IIELAEALDSYIPEPER		99	1957.0044	1
1.D21.8.1.8	0	2728.346	2729.353	1	1	NMITGAAQMDGAILVVAATDGPMPQTR		99	2728.3347	1

Figura 11. Detección de proteínas – group 1. Elongation factor Tu OS= Serratia marcescens SM39 GN=yufB PE=3 SV=1

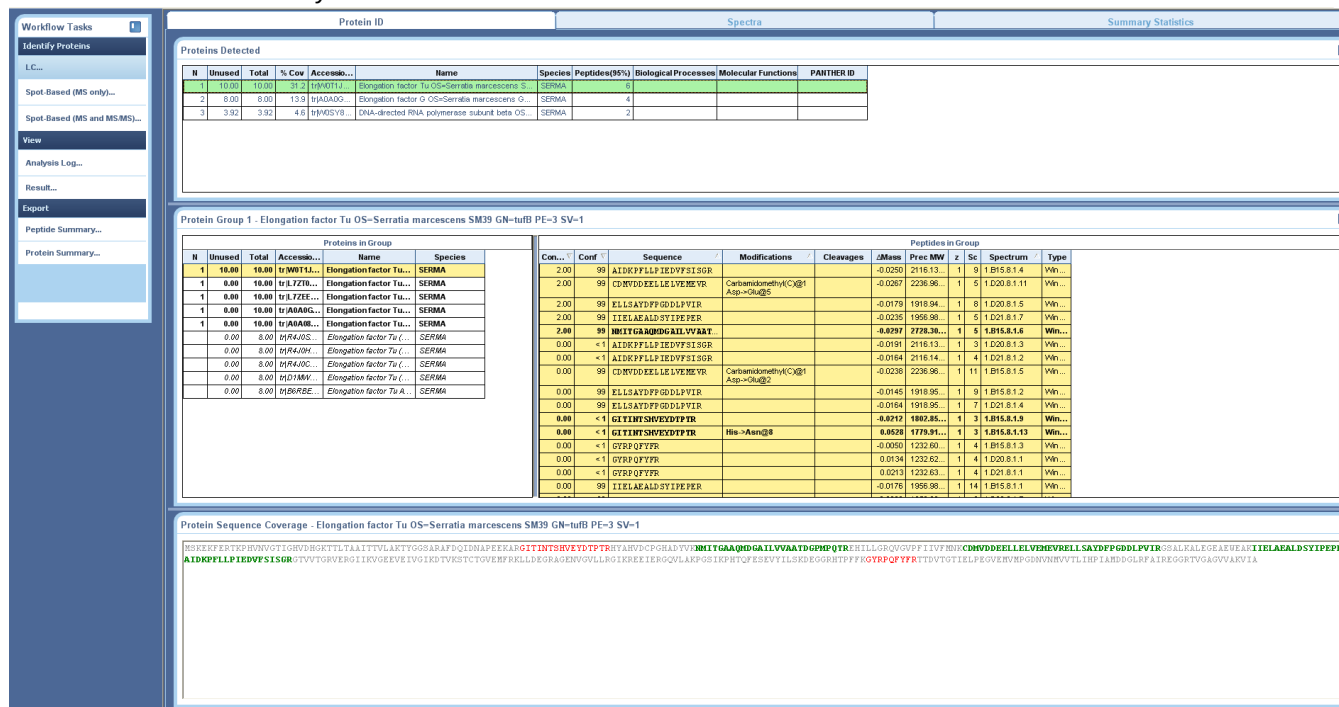


Figura 12. Figura 11. Detección de proteínas – group 1. Elongation factor G OS= Serratia marcescens SM39 GN=fusA PE=4 SV=1

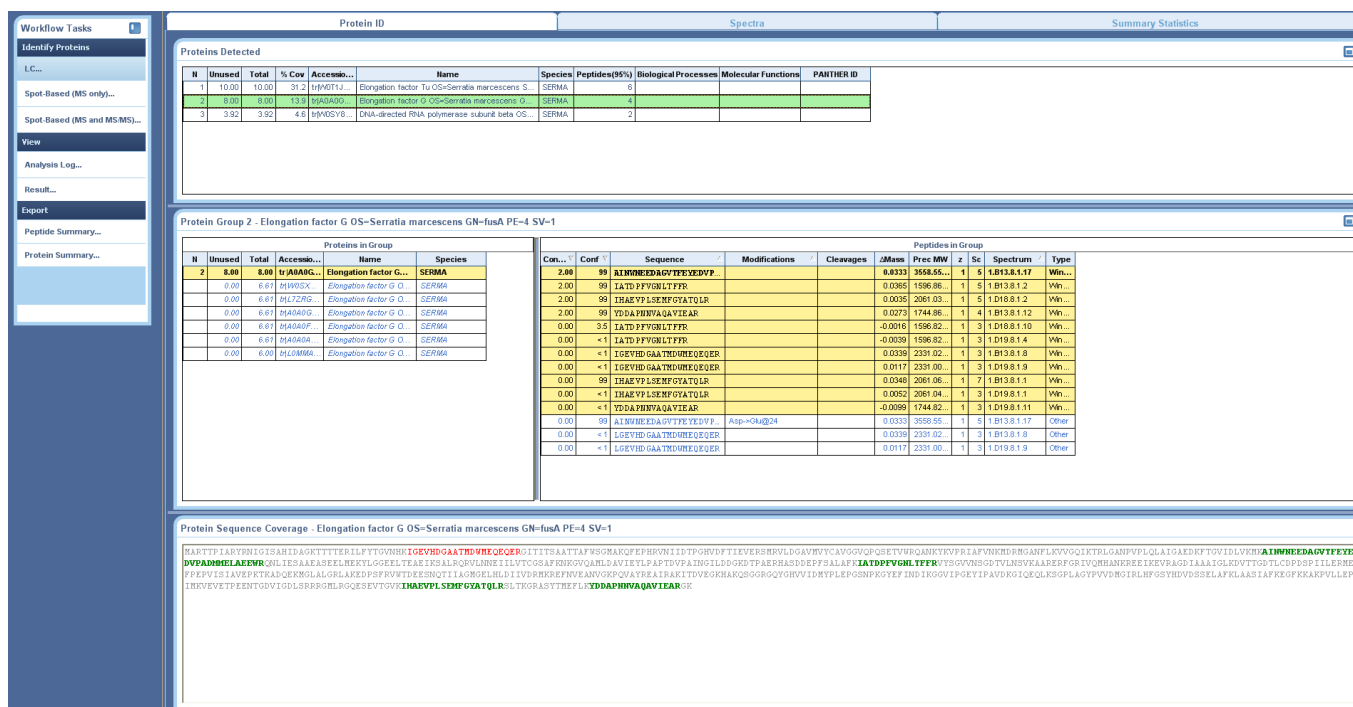
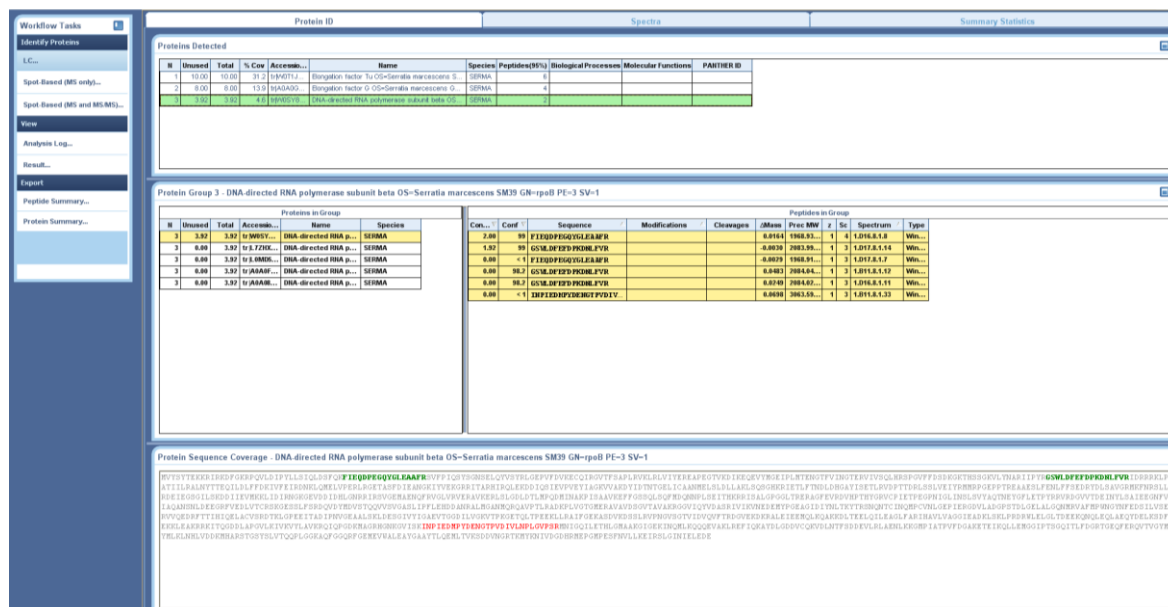


Figura 13. Detección de proteínas – group 3. DNA RNA polymerase subunit beta OS = *Serratia marcescens* SM39 GN=rpoB PE=3 SV=1



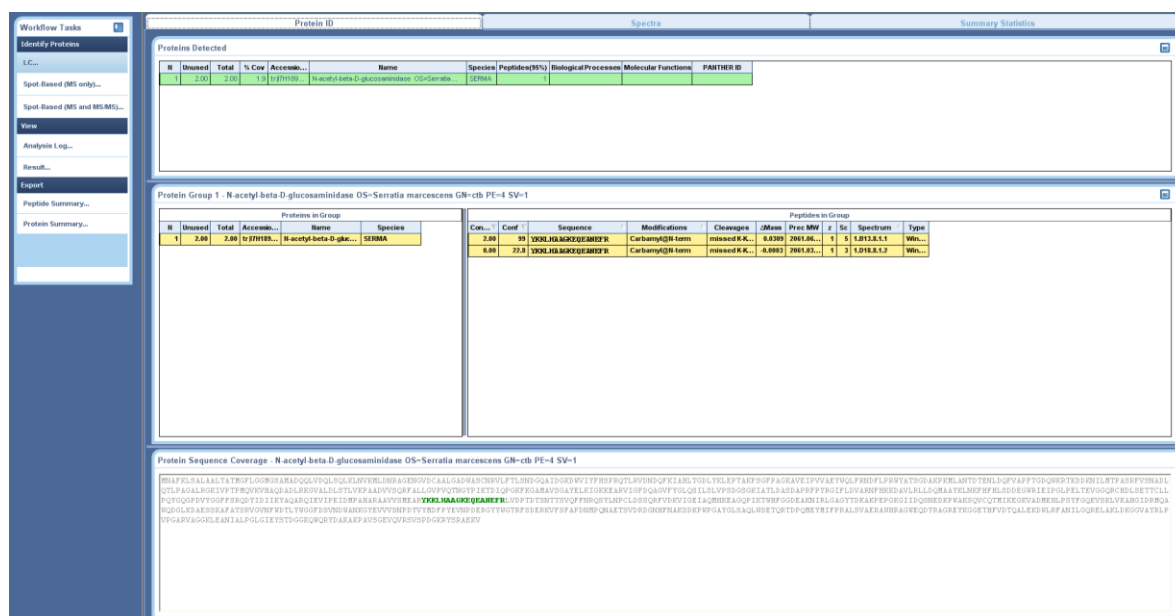
Código de muestra: 10M R2 (REPLICA) caracterizada por gen 16S rRNA (*Serratia marcescens*) Con el ProteinPilot™ Software 4.0, Paragon™ Algorithm: Detected Protein Threshold [Unused ProtScore (Conf)] >0.70 (80.0%) se logro la identificación de secuencias de más de 90% de confianza utilizando como Data base: uniprot-chitinase+serratia.fasta.

En la tabla 32 se muestra la secuencia de aminoácidos del ion precursor fragmentadas por espectrometría de masas MS MALDI TOF-TOF.

Tabla 32. Secuencia de aminoácidos del ion precursor fragmentadas por espectrometría de masas MS MALDI TOF-TOF.

Spectrum	Time	Prec MW	Prec m/z	Prec z	Prot N	Best Sequence	Modifications	Conf	Theor MW	Z
1.B13.8.1.1	0	2061.0696	2062.0769	1	1	YKKLHAAGKEQEANEFR	Carbamyl@N-term	99	2061.039	1
1.B15.8.1.2	0	1918.9526	1919.96	1		ELIKLSGSVTVGETPVIR	Cation:Na(E)@13	99	1919.07	1
1.B13.8.1.2	0	1596.8667	1597.874	1		WTLLFEKVSGVFR	Phe->Tyr@5	98.7	1596.867	1

Figura 14. Detección de proteínas – group 1. N-acetyl-beta-glucosamidase OS= *Serratia marcescens* GN=ctb PE=4 SV=1



Código de muestra: 10M R2 (REPLICA) R3 (REPLICA3) caracterizada por gen 16S rRNA (*Serratia marcescens*) Con el ProteinPilot™ Software 4.0, Paragon™ Algorithm: Detected Protein Threshold [Unused ProtScore (Conf)] >0.70 (80.0%) se logro la identificación de secuencias de más de 90% de confianza utilizando como Data base: uniprot-TSWV.fasta.

En la tabla 33 se muestra la secuencia de aminoácidos del ion precursor fragmentadas por espectrometría de masas MS MALDI TOF-TOF

Spectrum	Time	Prec MW	Prec m/z	Prec z	Prot N	Best Sequence	Modifications	Conf	Theor MW	z
1.B13.8.1.1	0	2061.0696	2062.0769	1	2	SLEEVKDSVSSSSYLQMR	Deamidated(Q)@16, Oxidation(M)@17	99	2060.9573	1
1.B15.8.1.1	0	1956.9867	1957.994	1	1	LSILLFRATDAKVEIIR		99	1957.1725	1
1.B15.8.1.5	0	2236.9668	2237.9741	1	1	SKIEDDDLEIKEPMMVR	Ser->Asn@1, Oxidation(P)@14, Oxidation(M)@15, Oxidation(M)@16	99	2237.019	1
1.B11.8.1.44	0	791.4619	792.4692	1		TSGTPSSR		< 1	791.3773	1
1.B15.8.1.2	0	1918.9526	1919.96	1	2	IKPKQRSEVIDHALR	Deamidated(Q)@5	< 1	1919.0588	1
1.B15.8.1.9	0	1802.8586	1803.866	1	2	NISYVGQIVGTTPTVVR		< 1	1802.989	1
1.B15.8.1.20	0	2681.1658	2682.1731	1		LMLSTTSVENESSDDYIEPHDGR	Propionamide@N-term, Oxidation(M)@2	< 1	2681.1763	1
1.B19.8.1.8	0	1065.5967	1066.604	1		YSGNKVYGR	Tyr->Trp@7	< 1	1065.5355	1
1.B21.8.1.4	0	2219.0286	2220.0359	1		GANKYNITMFCSANPDKKK	Oxidation(M)@9, Carbamidomethyl@11, Deamidated(N)@14, Oxidation(P)@15	< 1	2219.0352	1

Figura 15. Detección de proteínas – group 1. Glycoprotein OS= Tomato spotted wilt virus (strain Brazilian Br-03) GN=GP PE=4 SV=1

Workflow Tasks

Identify Proteins

LC...

Spot-Based (MS only)...

Spot-Based (MS and MS/MS)...

View

Analysis Log...

Result...

Export

Peptide Summary...

Protein Summary...

Protein ID

Spectra

Summary Statistics

Proteins Detected

N	Unused	Total	% Cov	Accessio...	Name	Species	Peptides(95%)	Biological Processes	Molecular Functions	PANTHER ID
1	2.42	2.42	3.1	tr06720...	Glycoprotein OS=Tomato spotted wilt virus (strain Brazilian Br-03)	TSWV3	2			
2	2.00	2.00	1.8	tr06720...	RNA polymerase OS=Tomato spotted wilt virus GN=GP PE=4 SV=1	TSWV1	1			
3	2.00	2.00	8.0	tr06720...	NSm non-structural protein (Fragment) OS=Tomato spotted wilt virus	TSWV1	1			

Protein Group 1 - Glycoprotein OS=Tomato spotted wilt virus (strain Brazilian Br-03) GN=GP PE=4 SV=2

Proteins in Group

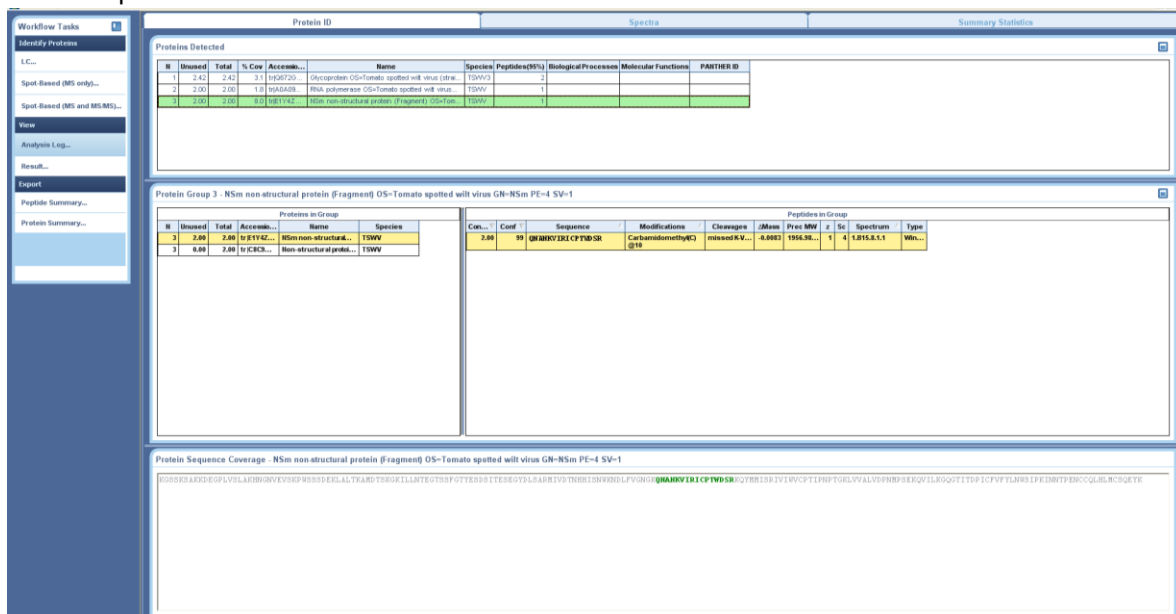
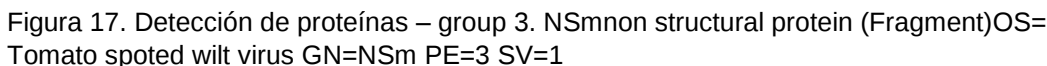
N	Unused	Total	Accessio...	Name	Species
1	2.42	2.42	tr06720...	Glycoprotein OS=To...	TSWV3
1	6.88	2.42	tr06720...	Glycoprotein OS=To...	TSWV5

Peptides in Group

Con...	Conf	Sequence	Modifications	Cleavages	Mass	Prec MW	z	Sc	Spectrum	Type
2.88	99	LSILLFRATDAKVEIIR		cleaved L...	-0.1856	1956.98...	1	5	1.B15.8.1.1	Win...
6.42	99	SKIEDDDLEIKEPMMVR	Ser->Asn@1 Oxidation(P)@14 Oxidation(M)@15 Oxidation(M)@16	misses KL...	-0.0528	2236.96...	1	5	1.B15.8.1.5	Win...

Protein Sequence Coverage - Glycoprotein OS=Tomato spotted wilt virus (strain Brazilian Br-03) GN=GP PE=4 SV=2

HLIKLLELMIKLSLFAIALSSVLSILLFRATDAKVEIIRGHLEIYDDSSSENEVSTSLHLRRTVPEVLNPNGNFKASDKSRTERAEKQAPILQDETSSSEKAVSIQEVNPNCLNASLKEIKGVSTNVVYQVESNGVITSVSDSADNLGCDNSQNLKPKFPIPVIPITKLANKRHSVGTFFITENLASGNYPVSYHLHQTGEIVSLQTVLSDGCRITKSNFANPYVITSPEKIRGTIIRFGEDEGRKVNAPSGSVSITFSEMLDGNHMLGQDSAKIPKTNKRVRDCLIKTSKSIYKQACINFSWIRLIALLIYFPIRULVNKTKPLPLWDLIGLITPPLLLILNYLNYTFPRCANGCLVTHECTKCCIONKSKASREHFSECPILSKPPDEETNKTWTSSEWPHLINTKLSLLHITELILGLILSRPBERAQTACLNOCFVPPQOKWTSSEFERCEANOCFSVRKEIVSIFGIVNIVGPHDILAKQDCLSSPHDTIKRLODCTELFNNPLNFWLDFLOTSGLLTSASLYTKRLBNGIISDNTWTKISGIVAGDSLAKWETSIPENILPQSLIFDSIVEGKRYRIEQSLGGGQTVMLNDRTSGAAKFTIYIRSTGIRYEVSEKTYTAPINSTHTDYSTCTGNCDCRKNQALTFQDFCIPITSYGCGCEARCFAMEGATGFCRNVYDNDKSVRIYSVLSTIIADVCISGLGDOQCTKIREVPYFENSFQADLQADLNDGITYGELIAGPDPHIYAGNIANLNDPVKNFGRPOLSHDGPVIFTKTLSGEDMSWDCAIGKSVTIKSCGYDTYRFESGLEQISDIPVTFKDLSSFFLEKTFSLGKLKRVIDLPSDLFVAPKPSITSTRLENCGLSCGKLSNCFEFSDLVSTSTISNESCSLSYQLAVKKGNNKNTIYTCVNPDKKKIKMTFEGNPELSVEVPINTVVVDPENIIPQNDIYAREEQNTSSSANGFDYIKSPFNFAVYFQSFPTTIRVILLIAFIFLVLYLCSMLVSHCRGVYNGSKYIKSKIEDDDLEIKEPMMVRDTHTRRPNDPFSBLV



Código de muestra: 35M R2 (REPLICA 2) R3 (REPLICA3) caracterizada por gen 16S rRNA (*Acinetobacter baylyi*) Con el ProteinPilot™ Software 4.0, Paragon™ Algorithm: Detected Protein Threshold [Unused ProtScore (Conf)] >0.70 (80.0%) se logró la identificación de secuencias de más de 90% de confianza utilizando como Data base: uniprot-Acinetobacter+baylyi%2C.fasta.

En la tabla N°1 se muestra la secuencia de aminoácidos del ion precursor fragmentadas por espectrometría de masas MS MALDI TOF-TOF.

Tabla 34. Secuencia de aminoácidos del ion precursor fragmentadas por espectrometría de masas MS MALDI TOF-TOF.

Spectrum	Time	Prec MW	Prec m/z	Prec z	Prot N	Best Sequence	Modifications	Conf	Theor MW	Z
1.B19.8.1.3	0	2053.053	2054.0601	1	1	INVIDTPGHVDFTIEVER		99	2053.0481	1
1.B19.8.1.6	0	2181.963	2182.97	1	1	VEVETPEDYMGDIMGDLNR		99	2181.9558	1
1.B19.8.1.8	0	1065.597	1066.604	1	3	AMQATMLER	Oxidation(M)@2	99	1065.4948	1
1.B21.8.1.1	0	1680.863	1681.87	1	2	AFLMPIEDVFSISGR		99	1680.8545	1
1.B21.8.1.2	0	1936.947	1937.954	1	2	ELLSTYDFPGDDTPVIR		99	1936.9418	1
1.B21.8.1.4	0	2219.029	2220.0359	1	2	CDLVDDEELLELVEMEVR	Carbamidomethyl@1, Asp->Glu@5	99	2219.0337	1
1.D24.8.1.2	0	2123.997	2125.0039	1	1	FEYADIPADLVDTSEWR	Ser->Ala@14	99	2123.98	1
1.D24.8.1.3	0	1812.867	1813.874	1	1	AEVPLAEMFGYATQMR		99	1812.8539	1
1.E1.8.1.4	0	1812.878	1813.885	1	1	AEVPLAEMFGYATQMR		99	1812.8539	1
1.E2.8.1.6	0	1680.886	1681.8929	1	2	AFLMPIEDVFSISGR		99	1680.8545	1
1.E3.8.1.9	0	1680.89	1681.897	1	2	AFLMPIEDVFSISGR		99	1680.8545	1
1.E1.8.1.3	0	2124.011	2125.0181	1		AVPIHQHFSLKISSWR	Oxidation(P)@3, HexNAc(S)@9	84.3	2124.1116	1
1.B19.8.1.2	0	2123.983	2124.99	1		AVPIHQHFSLKISSWR	Oxidation(P)@3, HexNAc(S)@9	78.3	2124.1116	1
1.E3.8.1.1	0	1942.02	1943.027	1	2	HTPFLNGYRPQFYFR		72.7	1941.9639	1
1.E2.8.1.1	0	1942.019	1943.026	1	2	HTPFLNGYRPQFYFR		61.3	1941.9639	1
1.B19.8.1.4	0	2331.003	2332.01	1	1	IGEVHDGAATMDWMEQEQR		58.6	2330.9895	1
1.D24.8.1.5	0	2672.24	2673.2471	1		PQLDNFAETETIQNDAAMDEQHR		35.2	2672.1772	1
1.D23.8.1.10	0	2362.099	2363.106	1		MAFEHGEPVAPLEVLGKAPKR	Oxidation(M)@1	29.4	2362.2468	1
1.D24.8.1.7	0	2330.998	2332.0049	1	1	IGEVHDGAATMDWMEQEQR		28.1	2330.9895	1
1.B21.8.1.12	0	1781.803	1782.8101	1		IEGNAMQYSTESSIPR		9.2	1781.8254	1

Workflow Tasks

Identify Proteins

LC...

Spot-Based (MS only)...

Spot-Based (MS and MS/MS)...

View

Analysis Log...

Result...

Export

Peptide Summary...

Protein Summary...

Protein ID

Spectra

Summary Statistics

Proteins Detected

#	Unused	Total	% Cov	Accession	Name	Species	Peptides(95%)	Biological Processes	Molecular Functions	PANTHER ID
1	8.38	8.38	17.1	sp Q6FD...	Elongation factor G OS=Acinetobacter baylii (str...	ACIAD	4			
2	5.82	5.82	20.5	sp Q6FF...	Elongation factor Tu OS=Acinetobacter baylii (s...	ACIAD	3			
3	1.74	1.74	5.6	tr Q6FC...	Peptide deformylase OS=Acinetobacter baylii (s...	ACIAD	1			

Protein Group 1 - Elongation factor G OS=Acinetobacter baylii (strain ATCC 33305 / BD413 / ADP1) GN-fusA PE=3 SV=1

Proteins in Group

#	Unused	Total	Accession	Name	Species
1	8.38	8.38	sp Q6FD...	Elongation factor G...	ACIAD

Peptides in Group

Cont...	Conf	Sequence	Modifications	Cleavages	ΔMass	Prec	MW	z	Sc	Spectrum	Type
2.00	99	REVPLAENFGVATQNR			0.0127	1812.86...	1	6	1.0244.1.3	Win...	
2.00	99	FEYADI FRLVDTSNENR	Ser->Ala@14		0.0169	2123.99...	1	8	1.0244.1.2	Win...	
2.00	99	INVIDTFGHVDTIEVER			0.0050	2853.85...	1	4	1.019.1.3	Win...	
2.00	99	WEVETPEDYNGDINGDLNR			0.0048	2191.96...	1	4	1.019.1.1	Win...	
0.30	54.4	ICEVHDGATDWRQEQDER			0.0137	2321.00...	1	4	1.019.1.1	Win...	
0.00	98	REVPLAENFGVATQNR			0.0236	1812.87...	1	5	1.1.1.1.1.4	Win...	
0.00	< 1	REVPLAENFGVATQNR			0.0035	1812.85...	1	3	1.019.1.1	Win...	
0.00	23.4	FEYADI FRLVDTSNENR	Ser->Ala@14		0.0030	2123.98...	1	4	1.019.1.2	Win...	
0.00	< 1	FGHYVVR			-0.0073	876.4533	1	3	1.019.1.12	Win...	
0.00	< 1	GITITSARTTCFVSGHQNR	Carbamidomethyl(C)@11 Oxidation(M)@16 Asn->Glu@18		0.0204	2672.23...	1	3	1.0244.1.1	Win...	
0.00	28.1	ICEVHDGATDWRQEQDER			0.0085	2330.99...	1	4	1.0244.1.7	Win...	

Protein Sequence Coverage - Elongation factor G OS=Acinetobacter baylii (strain ATCC 33305 / BD413 / ADP1) GN-fusA PE=3 SV=1

RARQTPISNYRNIQISAHIDAKTTTTILFTYGVSRKIGRVHIDGAATHDWDQEQERGITITSAAITTCFVSGRGNQFAGRRINVIDTFGHVDTIEVERSEVLDGACRVYCAVGQVQPSQETVWRQANKYEVFRLAFVNEEDRTGANFRAVEQVKTLGNQVPPIVVPISAEETFAQGVVDLIERKAIINDEASQQRDIFEYADIPADLVDTSNENRTRPVKAAARASHEELNDKYLEEGDLSEKEITAGLRAPTLASEIQVRLCORAFNGKQVQRLDAVIEFLPSPVVKALIEGLDQKDTKASREASDEAPPBALAFKIMDKFVGNLTPVTVTSQVLRQDPVTVNPSRKREIORIVQRHANEPQLDEIRAGDILACVOLKDVTTGDTLCDEKNIITLERREPVFPTSLSLAYSPSTAGQRENTALGRLEKEDSPFVETDRESQTTIAKQDELHLDIVSRSEKDFGVENIGSDVAVETTESVTEGGRFVDTQSGRRFPQHYVRLPDMVDKAGEVQFAEEVGGTVPRKEFFGAVRSGQRBNQVLAGTPVVGKATLFPQSTREVDSEBELFRRAGGYAFRDPQREADPVLEPFIWVEVETPEDYNGDINGDLNRIRGRVQNDLPGTKALIAFVPLAENFGVATQNRINSQGRATTSREFAKYATPPNVAKGIIAKFQSGGKRDDE

Figura 18. Detección de proteínas – group 2. Elongation factor Tu OS=Acinetobacter baylyi(strain ATCC33305 / BD413 /ADP1) GN=tuf1 PE=3 SV=1

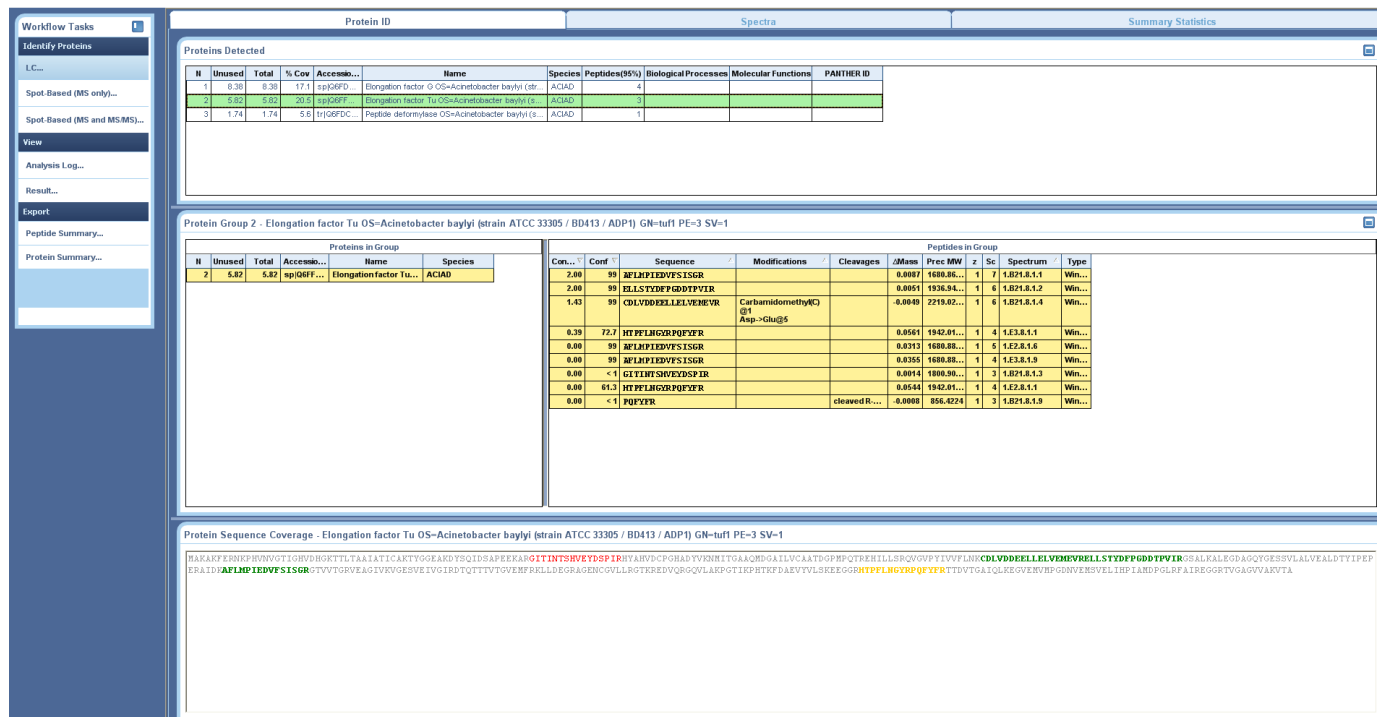
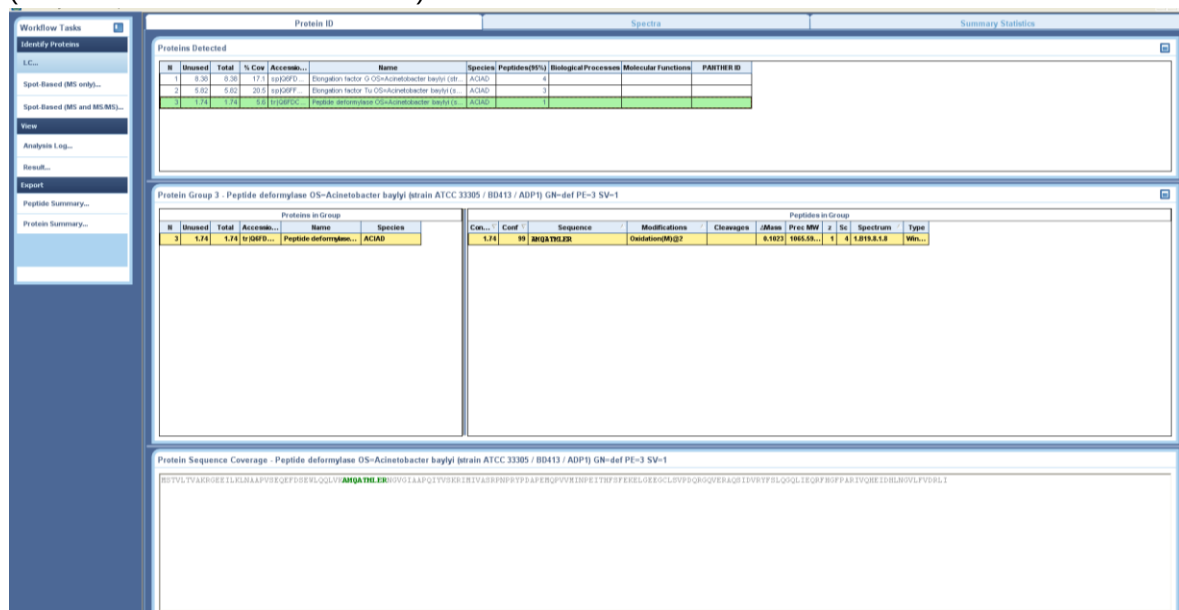


Figura 19. Detección de proteínas – group 3. Peptide deformylase OS= Acinetobacterbaylyi (strain atcc33305 / BD 413 / ADP1)GN=DEF PE=3 SV=1



Código de muestra: 35M R2 (REPLICA 2) R3 (REPLICA3) caracterizada por gen 16S rRNA (*Acinetobacter baylyi*) Con el ProteinPilot™ Software 4.0, Paragon™ Algorithm: Detected Protein Threshold [Unused ProtScore (Conf)] >0.70 (80.0%) se logro la identificación de secuencias de más de 90% de confianza utilizando como Data base: uniprot-Acinetobacter+soli.fasta.

En la tabla 35 se muestra la secuencia de aminoácidos del ion precursor fragmentadas por espectrometría de masas MS MALDI TOF-TOF

Figura 20. Detección de proteínas – group 1. Elongation factor G OS *Acinetobacter soli* NIPH 2989 GN=fusA PE=3 SV=1

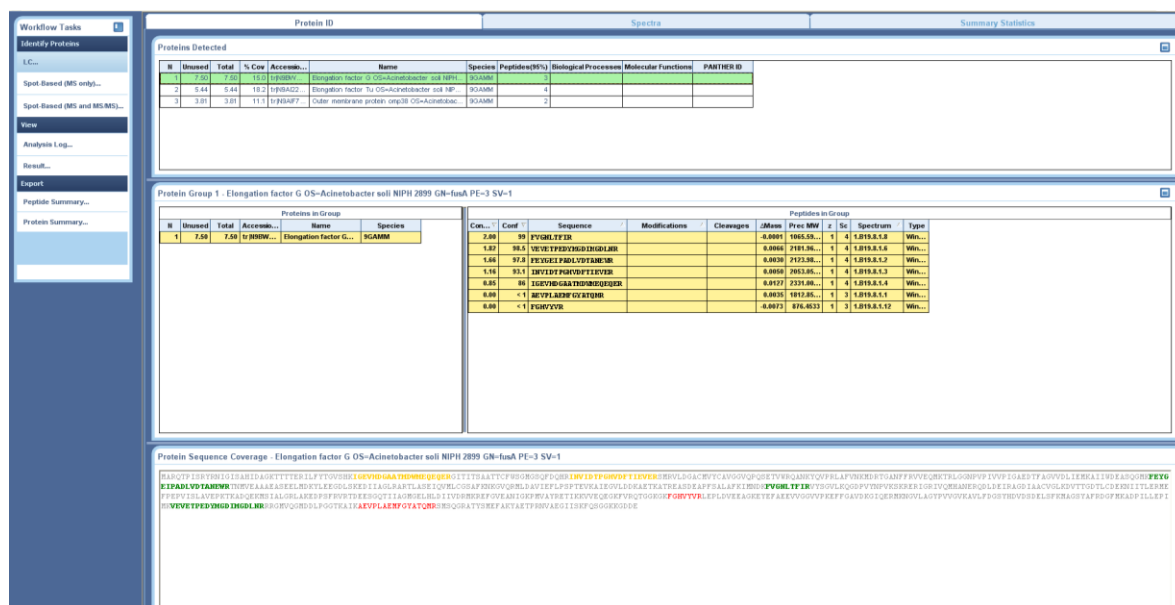


Figura 21. Detección de proteínas – group 2. Elongation factor Tu OS *Acinetobacter soli* NIPH 2989 GN=tuf PE=3 SV=1

Tabla 35. Secuencia de aminoácidos del ion precursor fragmentadas por espectrometría de masas MS MALDI TOF-TOF.

Spectrum	Time	Prec MW	Prec m/z	Prec z	Prot N	Best Sequence	Modifications	Conf	Theor MW	z
1.C21.8.1.7	0	2570.3638	2571.3711	1	1	LENDVRVETTLHQNTRIYDVR		99	2570.3201	1
1.F1.10.1.12	0	1846.9717	1847.979	1	2	RAMGKKKPEEMVKQR	Oxidation(M)@3, Oxidation(M)@11	96.4	1846.9869	1
1.C19.8.1.6	0	1162.6456	1163.653	1		DEWVAPGHPR		86.7	1162.552	1
1.C21.8.1.5	0	1953.9376	1954.9449	1		AGDTLQLIQPFVNRNPR	Oxidation(P)@16	37.4	1954.0385	1
1.C23.8.1.6	0	1717.8226	1718.83	1		ESPRMGVLGDYVIER	Glu->pyro-Glu@N-term, Oxidation(P)@3	28.2	1717.8457	1

Figura 22. Detección de proteínas – group 1. Putative sulfate transporter OS *Acinetobacter bayyi* (strain ATCC 33305 / BD413 /ADP1) GN=ACIAD1241 PE=3 SV=1

[illegible]

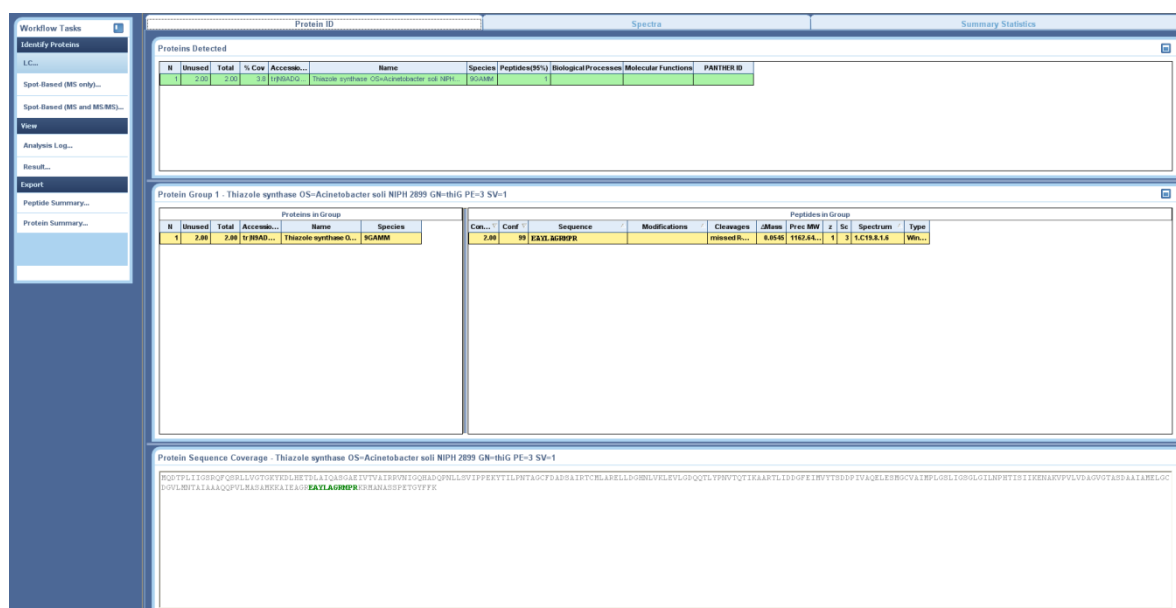
Código de muestra: CO-CULTIVO T.A R5 (thrips amarillo replica cinco) Con el
ProteinPilot™ Software 4.0, Paragon™ Algorithm: Detected Protein Threshold [Unused

ProtScore (Conf)] >0.70 (80.0%) se logro la identificación de secuencias de más de 90% de confianza utilizando como Data base: uniprot-Acinetobacter+soli.fasta.

Tabla 36. Secuencia de aminoácidos del ion precursor fragmentadas por espectrometría de masas MS MALDI TOF-TOF

Spectrum	Time	Prec MW	Prec m/z	Prec z	Prot N	Best Sequence	Modifications	Conf	Theor MW	z
1.C19.8.1.6	0	1162.6456	1163.653	1	1	EAYLAGRMPPR		99	1162.5917	1
1.C21.8.1.7	0	2570.3638	2571.3711	1		GDEVVLKAHFVDSILRQYALAR	Propionamide@N-term	98.9	2570.397	1
1.C17.8.1.1	0	803.3333	804.3406	1		WGLWAR	Oxidation(W)@4	< 1	803.4078	1
1.C19.8.1.5	0	1846.9607	1847.968	1		INVVGGMAGNGYRAAAPGR	Oxidation(M)@7, Deamidated(N)@10	< 1	1846.9108	1
1.C21.8.1.5	0	1953.9376	1954.9449	1		AGDQVIDDSALNKLEKMR	Dethiomethyl(M)@17	< 1	1954.012	1

Figura 24. Detección de proteínas – group 1. Thiazole synthase OS Acinetobacter soli NIPH 2899 GN=fusA PE=3 SV=1



Código de muestra: CO-CULTIVO T.A R5, R6, R7 (thrips amarillo replica cinco, seis, siete)
Con el ProteinPilot™ Software 4.0, Paragon™ Algorithm: Detected Protein Threshold [Unused ProtScore (Conf)] >0.70 (80.0%) se logro la identificación de secuencias de más de 90% de confianza utilizando como Data base: uniprot-Serratia+nematodiphila%2C.fasta.

Tabla 37. Secuencia de aminoácidos del ion precursor fragmentadas por espectrometría de masas MS MALDI TOF-TOF.

Spectrum	Time	Prec MW	Prec m/z	Prec z	Prot N	Best Sequence	Modifications	Conf	Theor MW	z
1.C19.8.1.6	0	1162.6456	1163.653	1	4	VTAFPVVQMR	Oxidation(M)@9	99	1162.6168	1
1.C21.8.1.5	0	1953.9376	1954.9449	1	2	VGSHWGHGSGDIALAFSTR		99	1953.9446	1
1.C21.8.1.7	0	2570.3638	2571.3711	1	3	VS RNEDGVFFCFIEVL SVTPVR	Deamidated(N)@4, Carbamidomethyl@11	99	2570.2839	1
1.C23.8.1.6	0	1717.8226	1718.83	1	1	QEAPSFDFQQGPVER	Gln->pyro-Glu@N-term, Deamidated(Q)@10	99	1717.7584	1
1.C17.8.1.1	0	803.3333	804.3406	1		SLRCLR	Carbamidomethyl@4	95.4	803.4436	1
1.C11.8.1.19	0	1006.4357	1007.443	1		IGGSAKFNGR	Deamidated(N)@8	38.7	1006.5196	1

Figura 25. Detección de proteínas – group 1. Enoyl-CoA hydratase
OS=Serratianematodiphila GN=JL05_19845 PE=3 SV=1

Workflow Tasks

- Identify Proteins
- LC...
- Spot Based (MS only)...
- Spot Based (MS and MS/MS)...
- View
- Analysis Log...
- Result...
- Export
- Peptide Summary...
- Protein Summary...

Protein ID

Spectra

Summary Statistics

Proteins Detected

#	Unused	Total	% Cov	Accession	Name	Species	Peptides(%)	Biological Processes	Molecular Functions	PANTHER ID
1	200	200	6.3	HA0A08	Enoyl-CoA hydratase OS=Serratia nematodiphila	SENR	1			
2	200	200	5.4	HA0A08	D-aminopeptidase OS=Serratia nematodiphila	SENR	1			
3	200	200	21.6	HA0A08	LPF267 protein JL05_1489 OS=Serratia nem.	SENR	1			
4	200	200	4.6	HA0A08	Uncharacterized protein OS=Serratia nematodiphila	SENR	1			
5	200	200	1.2	HA0A08	Acyl-CoA dehydrogenase OS=Serratia nematodiphila	SENR	1			
6	200	200	7.2	HA0A08	Deaminoperoxidase epimerase OS=Serratia nematodiphila	SENR	1			

Protein Group 1 - Enoyl-CoA hydratase OS=Serratia nematodiphila GN=JL05_19845 PE=3 SV=1

Proteins in Group					Peptides in Group												
#	Unused	Total	% Cov	Accession	Name	Species	Cov.	Conf	Sequence	Modifications	Cleavages	Obs	Prec MW	z	Sc	Spectrum	Type
1	200	200	6.3	HA0A08	Enoyl-CoA hydratase	SENR	2.00	99	QEAPSFDFQQGPVER	Gln->pyro-Glu@N-term, Deamidated(Q)@10		6.8647	1717.82...	1	3	1.C23.8.1.6	Wh...

Protein Sequence Coverage - Enoyl-CoA hydratase OS=Serratia nematodiphila GN=JL05_19845 PE=3 SV=1

MSRPPLTETSTTQVATLTPFEDKHAIDHQAELITLTLQANDSYRAIVLAQAVFAARDINAFRQIELFVTPFSGLSIAQIARVIAAVDGIATGSGFELACELVAGQRAFFSPTSLGLVAAQOCARLPARISPVVALSWLLFORTVAGELSRGASISASAPKELRTASQIAGDLAARQAPRAVTPGQLAFQEAPSFDFQQGPVERLHQAAR

Figura 26. Detección de proteínas – group 2. D-aminopeptidase OS = Serratia nematodiphila GN=JL05_17250 PE=4 SV=1

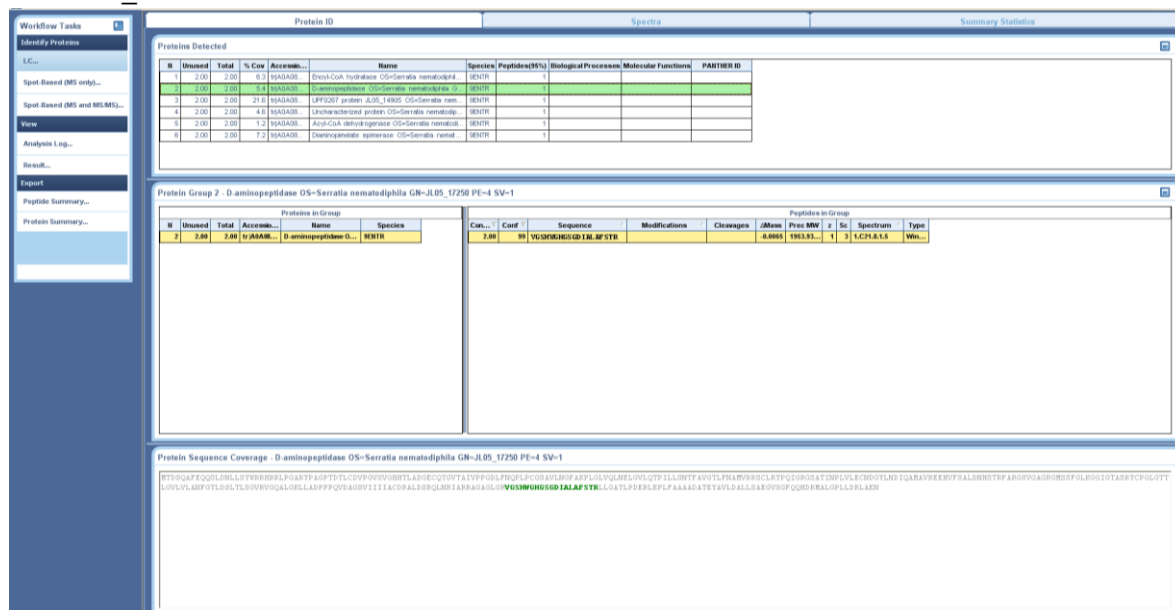


Figura 27. Detección de proteínas – group 3. UPF0267 protein JL05_14905 OS Serratia nematodiphila GN=JL05_14905 PE=3 SV=1

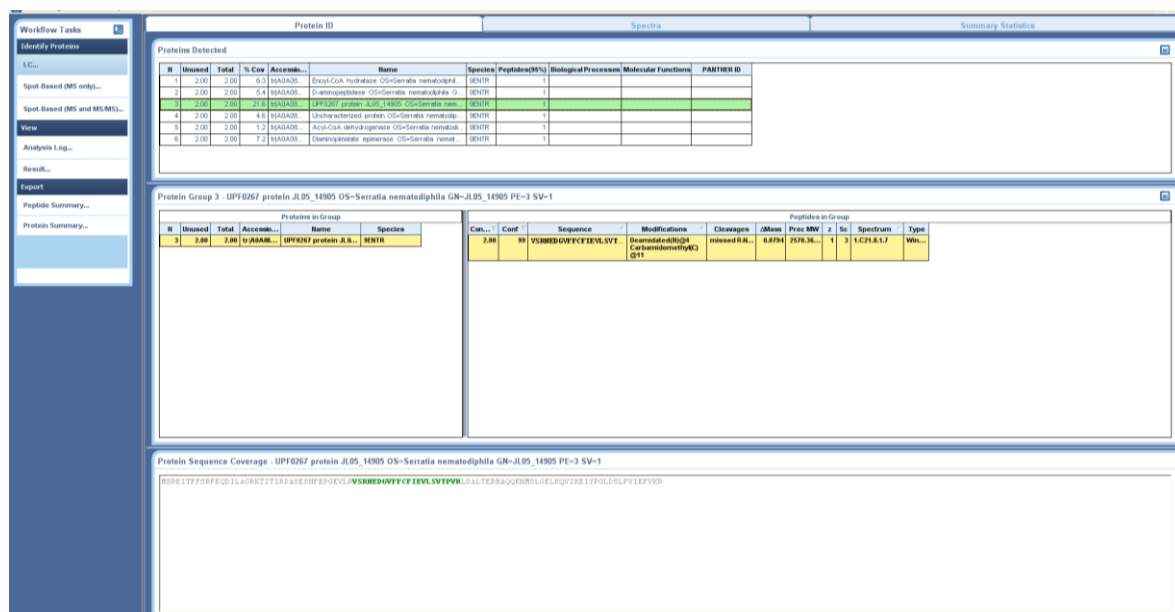


Figura 28. Detección de proteínas – group 4. Uncharacterized protein OS Serratia nematodiphila GN=JLO5_10085 PE=4 SV=1

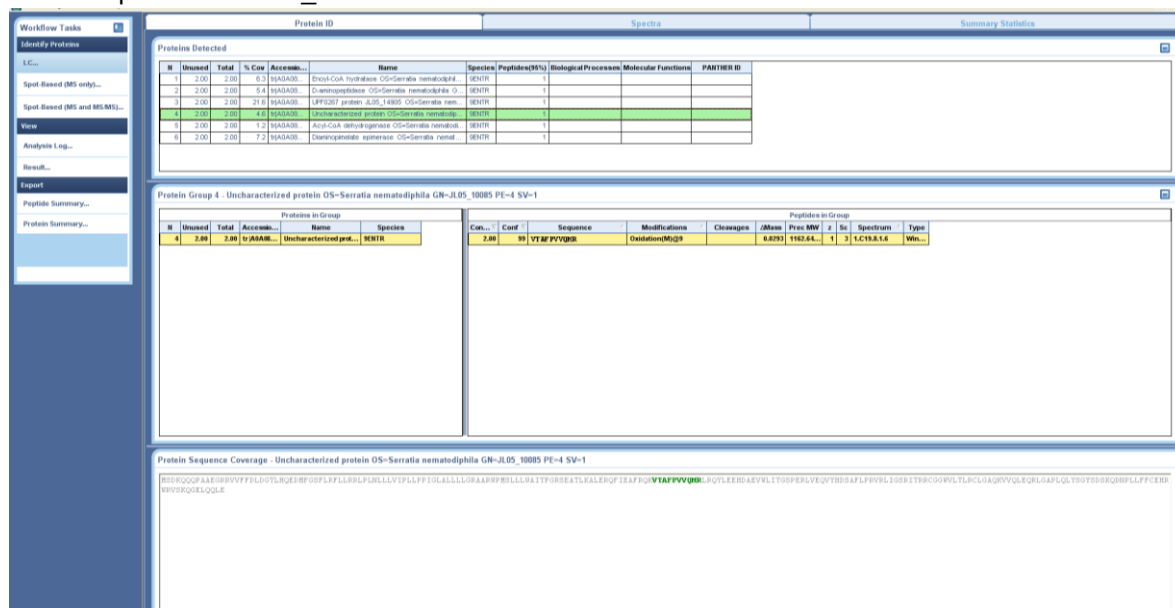


Figura 29. Detección de proteínas – group 5. Acyl-CoA dehydrogenase OS Serratia nematodiphila GN=fadE PE=4 SV=1

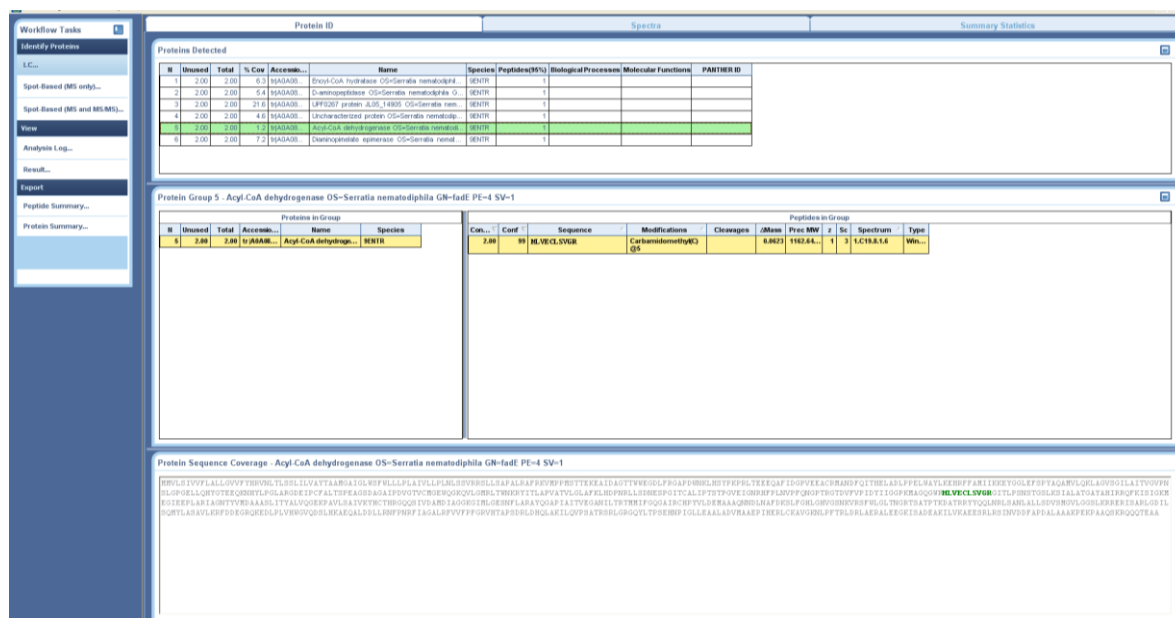
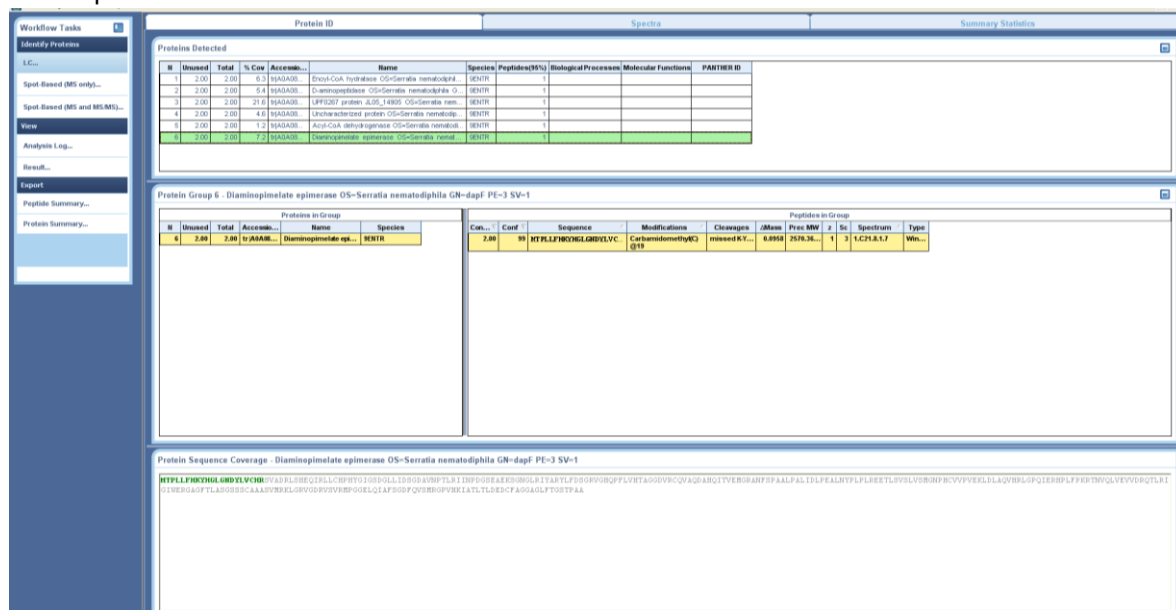


Figura 30. Detección de proteínas – group 6. Diaminopimelate OS *Serratia nematodiphila* GN=dapF PE=3 SV=1



Código de muestra: CO-CULTIVO T.A R6, R1 (thrips amarillo replica seis, uno) Con el ProteinPilot™ Software 4.0, Paragon™ Algorithm: Detected Protein Threshold [Unused ProtScore (Conf)] >0.70 (80.0%) se logro la identificación de secuencias de más de 90% de confianza utilizando como Data base: uniprot-Serratia+marcescens.fasta.

Tabla 38. Secuencia de aminoácidos del ion precursor fragmentadas por espectrometría de masas MS MALDI TOF-TOF.

Spectrum	Time	Prec MW	Prec m/z	Prec z	Prot N	Best Sequence	Modifications	Conf	Theor MW	z
1.C21.8.1.5	0	1953.94	1954.945	1	3	VGSHWGHGSGDIALAFSTR		99	1953.9446	1
1.C21.8.1.7	0	2570.36	2571.371	1	2	VSRNEDGVFFCFIEVLSVTPVR	Deamidated(N)@4, Carbamidomethyl@11	99	2570.2839	1
1.E16.10.1.9	0	1943.86	1944.867	1	1	NDEAGETVTVQVNGAGYR	Deamidated(N)@1	99	1943.8497	1

Figura 31. Detección de proteínas – group 1. Uncharacterized protein OS= *Serratia marcescens* SM39 GN=SM39_3702 PE=4 SV=1

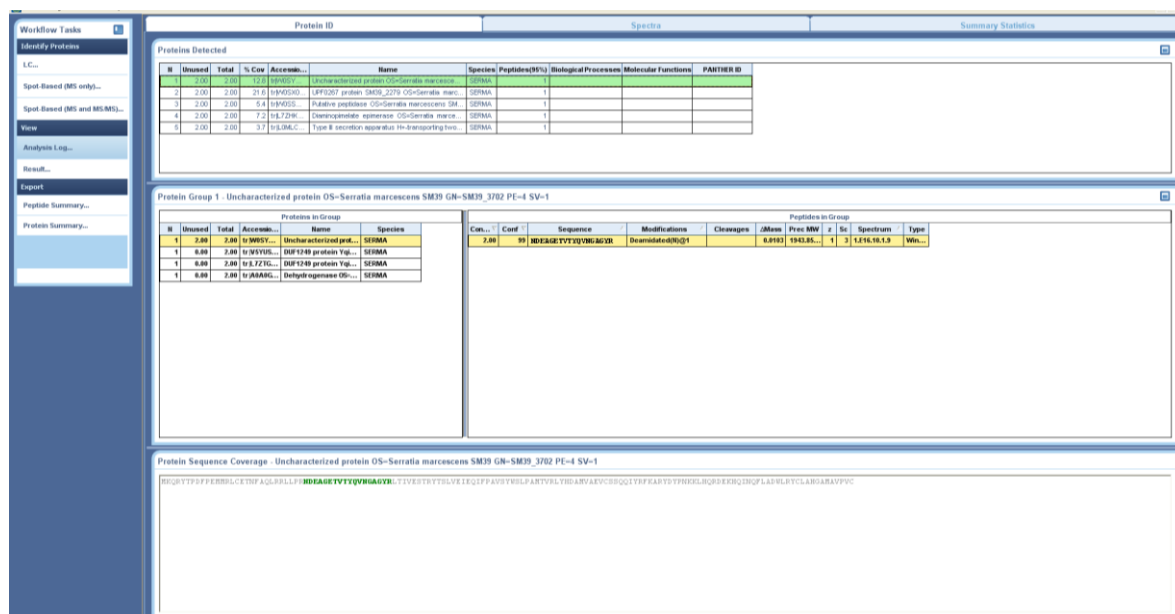


Figura 32. Detección de proteínas – group 2. UPF0267 protein SM39 OS = Serratia marcescens SM39 GN=SM39_2279 PE=4 SV=1

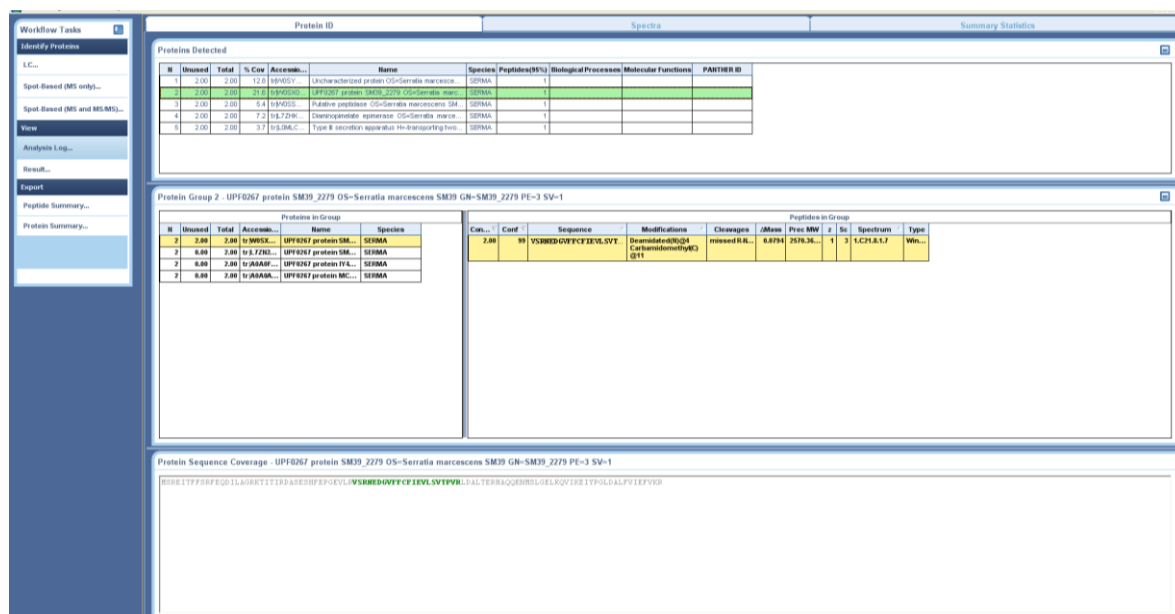


Figura 33. Detección de proteínas – group 3. Putative peptidase OS= Serratia marcescens SM39 GN=SM39_1783 PE=4 SV=1

Workflow Tasks

- Identify Proteins
- Spot-Based (MS only)...
Spot-Based (MS and MS/MS)...
- View
Analysis Log...
- Results...
Export
Peptide Summary...
Protein Summary...

Protein ID		Species		Summary Statistics						
Proteins Detected										
#	Unseqd	Total	% Cov	Accession	Name	Species	Peptides(PSM)	Biological Processes	Molecular Functions	PANTHER ID
1	2.00	2.00	12.0	EPMDSV	Uncharacterized protein OS=Serratia marcescens...	SERMA	1			
2	2.00	2.00	21.6	HMGDXX	LPF0267 protein OMDS_2276 OS=Serratia marc...	SERMA	1			
3	2.00	2.00	6.4	HMSSS	Kelative peptidase OS=Serratia marcescens SM	SERMA	1			
4	2.00	2.00	7.2	IS-27H	Diaminopimelate epimerase OS=Serratia marc...	SERMA	1			
5	2.00	2.00	3.7	VLDALC	Type II secretion apparatus Trn-tranporting hns.	SERMA	1			

Protein Group 4 : Diaminopimelate epimerase OS=Serratia marcescens WWI GN-dapF PE-3 SV-1

Proteins In Group					Peptides In Group											
#	Unseqd	Total	Accession	Name	Species	Cov...	Conf	Sequence	Modifications	Cleavages	Mass	Prac MW	p I	Iso	Spectrum	Type
4	2.00	2.00	v3.7ZHC	Diaminopimelate ep...	SERMA	2.00	99	MTPLLFYKCNGLGRDVLVC	Carbamidomethyl(C) Q19	missesd K.T...	6.056	2676.36	1	3	LCPI.6.1.7	Wm...
6	6.68	2.80	trAAAGC	Diaminopimelate ep...	SERMA											

Protein Sequence Coverage : Diaminopimelate epimerase OS=Serratia marcescens WWI GN-dapF PE-3 SV-1

```

MTPLLFYKCNGLGRDVLVCVADFLDRQITSLCLDFPTSTIDEGLLSDGDAVNPFLRIIDPDSAEKDGRLRTARTLFDSPDPDPNGFTLVHTAIDGVPCQVAGARGITVTERDANFSFAALFALILFPAINTPLFLRETLVSIVSRNFCVPYVEELAQVRDLQIPDIHRPLFFPRTHVQLAYVDVQTLTIT
OIGVERAFITLAGDGGSCAAAVSYRDKLGRVDDGVVSRPGDELAFSDPFGVRRDPPVKATLTLDSECDAGSGAALLFTOSTPVA
    
```

Figura 35. Detección de proteínas – group 4. Diaminopimelate epimerase OS= *Serratia marcescens* ww4 GN=dapF PE=3 SV=1

Workflow Tasks

Identify Proteins

LC...

Spot Based (MS only)...

Spot Based (MS and MS/MS)...

View

Analysis Log...

Results...

Export

Peptide Summary...

Protein Summary...

Protein ID
Spectra
Summary Statistics

Proteins Detected

#	Unseqd	Total	% Cov	Accession	Name	Species	Peptides(%)	Biological Processes	Molecular Functions	PANTHER ID
1	2.00	2.00	12.9	U04567	Uncharacterized protein OS=Serratia marcescens	SERMA	1			
2	2.00	2.00	21.6	U04568	LEP1087 protein OS=Serratia marcescens	SERMA	1			
3	2.00	2.00	5.4	U04569	Putative peptidase OS=Serratia marcescens	SERMA	1			
4	2.00	2.00	7.2	U04570	Dehydrogenase subunit OS=Serratia marcescens	SERMA	1			
5	2.00	2.00	3.7	U04571	Type III secretion apparatus Htr-translocating htr	SERMA	1			

Protein Group 5 - Type III secretion apparatus Htr-translocating htr OS=Serratia marcescens FGB4 GN-D781_3942 PE-4 SV-1

Proteins in Group				Peptides in Group												
#	Unseqd	Total	Accession	Name	Species	Cov...	Conf	Sequence	Modifications	Charged	JMass	Prox (MW)	Z	Sc	Spectrum	Type
5	2.00	2.00	U04571	Type III secretion apparatus Htr-translocating htr	SERMA	2.00	99	SRVYLSCASIDRSSSR	Carbamidomethyl(C)	missed RT...	6.009	195.93	1	3	1.C71.8.1.4	Win...

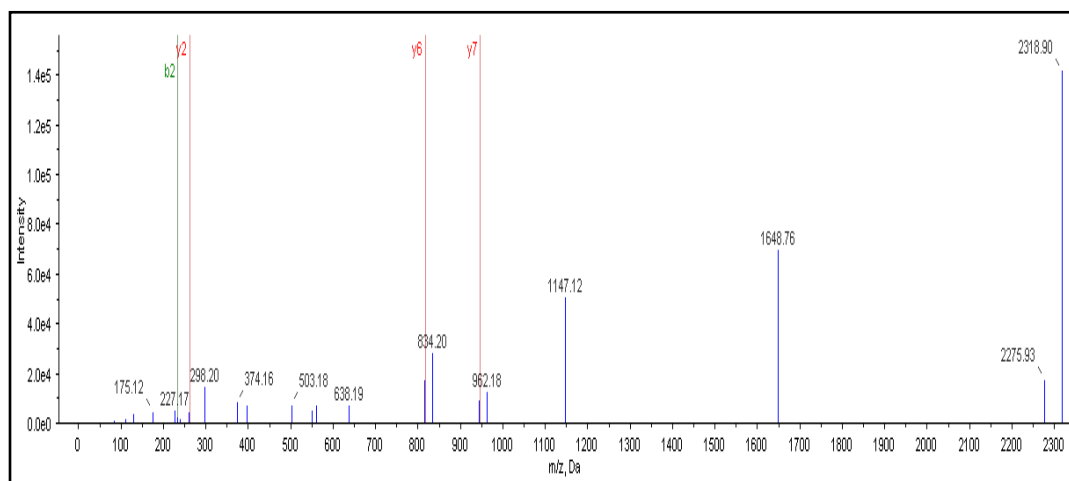
Protein Sequence Coverage - Type III secretion apparatus Htr-translocating htr OS=Serratia marcescens FGB4 GN-D781_3942 PE-4 SV-1

RTTIAQGTAAKSPRRRLGAAAVATGTGTGTGTLLECLFPAKTRIGDLCRTHRQENVLYVYQNPQRTLLALGLGTARQAVPTPLRLRNRDVEYVALLGVPLRQFPLRQVVSFAFLPQROVVTVPVVDAPPTTAAKPIAALPITGVRAIDQLTLQVQRRVQVYAGACQRTLLAELEKPTPCSAITPGLTDEGRGKPEFLSRELDEALSPVYLCAEASIDRSSSRRLAAPTATATAAEARQKQVYLLILDLTKPFAAQKGLIDALGEPFRQGLFPVVTYLLPQLERAAQKTRQITITALYTLLEADSRMSVPAEVRKSLIDQIVLTPLAERGRTPAIVSLAEVRSITRNSVAREKQLTATRLRLSLNQVQVELTLKLEGTEDPDRITDAVPEAQAIDNPILQETRAFAKERTTQGLTREVYTPAFQQR

Los mejores espectros en términos de número de picos, intensidad de la señal, resolución del pico, y la relación señal-ruido, fueron seleccionados para un segundo tiempo de vuelo, un ion- precursor de 2,322 KD en relación su masa/carga, fue fragmentado (Fig. ..)

Los resultados muestran un péptido de 18 aminoácidos que tiene un porcentaje de homología del 100 % con el ARN polimerasa dependiente de ARN del TSWV (Fig. ..)

Figura 38. Fragmentación del ion precursor, de las proteínas extraídas del “trips de la mancha roja del banano” *Chaetanaphothrips signipennis*.



Sequences producing significant alignments:

Select: [All](#) [None](#) Selected:0

[Alignments](#) [Download](#) [GenPept](#) [Graphics](#) [Distance tree of results](#) [Multiple alignment](#)

	Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
☐	RdRp [Tomato spotted wilt virus]	61.7	61.7	94%	2e-09	100%	AIA24439.1
☐	RNA polymerase [Tomato spotted wilt virus]	49.4	49.4	94%	2e-05	82%	AEI70839.1
☐	RdRp [Tomato spotted wilt virus]	49.4	49.4	94%	2e-05	82%	AIX02806.1
☐	RNA polymerase [Tomato spotted wilt virus]	49.4	49.4	94%	2e-05	82%	BAP63975.1

Figura 39. Alineamiento de la secuencia de 18 aminoácidos detectados en las proteínas extraídas del *C. signipennis*.

ORIGIN

```

1 mniqkiqkli engttlllsi edcvgsnhd1 aldlhkrnsd eipedviinn naknyetmre
61 livkitadge glngkmatvd vkklsemsvl feqkyletel arhdifgeli srhlrikpkq
121 rneveiehal reyldelnkk scinklsdde ferinkevva thatpdnyvi ykesknselc
181 liiydwkiv dartetktme kyykniwksf kdikvngkpf ledhpfvsvi vilkpiagmp
241 itvtssrvlg kfedspsalh gerikhakna kllnisvvgq ivgttptvvr nyyantqkik
301 sevrilgdd fgskdvffsh wtskykernp teiaysedie riidslvtde ipreeihfl
361 fgnfcfhiet vndqhiadkf kgyqnscinl kiepktldlad lkdlliikqq iwsdlygkhl
421 ekimlrerek kkkekeipdi ttafnqnaae yeekypncft ndlsetktnf smtwspsfek
481 velssvodyn naiinkfres fksssrvvyn spyscinnqt nkarditnlv rlcletelscd
541 ttmekqele deidintgsi kvertkkske wnkgqscltr nknefcmket grenktyfk
601 glavmnigms skkrilkee ikeriskgle ydtserqadp nddyssidms slthmkkkir
661 hdnedsldwc ekikdslfvl hngdireegk itsvynnyak npeclyiqds vlkaeletck
721 kinklcndla iyhysedmmq fskglmvadr ymtkesfkil ttantsmml afkgdgmntg
781 gsgvpyialh ivdedmsdqf nicytkeiys yfrsgsnyiy imrpqrlnqv rllslfktps
841 kvpvcydqls kkanemekwl knkdiekvnv fsmtmtvkqi linivfssvm igtvtklrm
901 gifdfmryag flplsdysni keyirdkfdp ditnvadiyf vngikkllfr medlnlstna
961 kpvvdhend iiggitdlni kcpitgstll tledlynnvy laiymmrksl hnhvhltsl
1021 lnvpaewelk frkelgfnif ediyppkamf ddkdlfsing alnvkalsdy ylgnienvgl
1081 mrseienked flspcykist lksskkcsqs niistdeiie clqnakvqdi gnwkggnlai

```

Alineamiento en BLAST.

Las cepas identificadas y caracterizadas molecularmente de microorganismos nativos asociados a la filosfera y rizosfera del banano, que son reportadas por tener efectos antagónicos y que han sido evaluadas se presentan en la siguiente tabla:

Tabla 39. Especies bacterianas de interés en control biológico, presentes en la filosfera y rizosfera del banano.

PROCEDENCIA	ESPECIE	HOMOLOGÍA %
Filosfera	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	100
Filosfera	<i>Bacillus megaterium</i>	99
Filosfera	<i>Bacillus pumilus</i>	99
Filosfera	<i>Bacillus megaterium</i>	100
Filosfera	<i>Bacillus megaterium</i>	99
Filosfera	<i>Lysinibacillus sphaericus</i>	100
Filosfera	<i>Bacillus pumilus</i>	99
Rizosfera	<i>Lysinibacillus sphaericus</i>	100
Rizosfera	<i>Bacillus aryabhattai</i>	100
Rizosfera	<i>Bacillus thuringiensis</i>	100
Rizosfera	<i>Bacillus megaterium</i>	99
Rizosfera	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	100
Rizosfera	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	100
Rizosfera	<i>Bacillus pumilus</i>	100
Rizosfera	<i>Lysinibacillus sphaericus</i>	100

3.- Evaluación de cepas benéficas para la alteración de la microbiota de los trips, basándose en el análisis funcional de las pruebas de antagonismos.

Tabla 39. Evaluación de cepas benéficas.

N°	PROCEDENCIA DE LA MUESTRA	BACTERIA ANTAGONICA	BACTERIA DE LA MICROBIOTA	DIÁMETRO DE INHIBICIÓN	CONDICIÓN DE LA ZONA DE INHIBICIÓN
1	Filosfera	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	<i>Erwinia sp. R8-2</i>	>10 mm	Inhibición fuerte
2	Filosfera	<i>Bacillus megaterium</i>	<i>Erwinia sp. R8-2</i>	2 – 10 mm	Inhibición moderada
3	Filosfera	<i>Bacillus pumilus</i>	<i>Erwinia sp. R8-2</i>	>10 mm	Inhibición fuerte
4	Filosfera	<i>Bacillus megaterium</i>	<i>Erwinia sp. R8-2</i>	2 – 10 mm	Inhibición moderada
5	Filosfera	<i>Bacillus megaterium</i>	<i>Erwinia sp. R8-2</i>	2 – 10 mm	Inhibición moderada
6	Filosfera	<i>Lysinibacillus sphaericus</i>	<i>Erwinia sp. R8-2</i>	>10 mm	Inhibición fuerte
7	Filosfera	<i>Bacillus pumilus</i>	<i>Erwinia sp. R8-2</i>	>10 mm	Inhibición fuerte
8	Rizosfera	<i>Lysinibacillus sphaericus</i>	<i>Erwinia sp. R8-2</i>	>10 mm	Inhibición fuerte
9	Rizosfera	<i>Bacillus aryabhattai</i>	<i>Erwinia sp. R8-2</i>	>2mm	Inhibición débil
10	Rizosfera	<i>Bacillus thuringiensis</i>	<i>Erwinia sp. R8-2</i>	>10 mm	Inhibición fuerte
11	Rizosfera	<i>Bacillus megaterium</i>	<i>Erwinia sp. R8-2</i>	2 – 10 mm	Inhibición moderada
12	Rizosfera	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	<i>Erwinia sp. R8-2</i>	>10 mm	Inhibición fuerte
13	Rizosfera	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	<i>Erwinia sp. R8-2</i>	>10 mm	Inhibición fuerte
14	Rizosfera	<i>Bacillus pumilus</i>	<i>Erwinia sp. R8-2</i>	>10 mm	Inhibición fuerte
15	Rizosfera	<i>Lysinibacillus sphaericus</i>	<i>Erwinia sp. R8-2</i>	>10 mm	Inhibición fuerte

N°	PROCEDENCIA DE LA MUESTRA	BACTERIA ANTAGONICA	BACTERIA DE LA MICROBIOTA	DIÁMETRO DE INHIBICIÓN	CONDICIÓN DE LA ZONA DE INHIBICIÓN
1	Filosfera	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	<i>Pantoea dispersa</i> strain GTC 1472.	>10 mm	Inhibición fuerte
2	Filosfera	<i>Bacillus megaterium</i>	<i>Pantoea dispersa</i> strain GTC 1472.	2 – 10 mm	Inhibición moderada
3	Filosfera	<i>Bacillus pumilus</i>	<i>Pantoea dispersa</i> strain GTC 1472.	2 – 10 mm	Inhibición moderada
4	Filosfera	<i>Bacillus megaterium</i>	<i>Pantoea dispersa</i> strain GTC 1472.	2 – 10 mm	Inhibición moderada
5	Filosfera	<i>Bacillus megaterium</i>	<i>Pantoea dispersa</i> strain GTC 1472.	2 – 10 mm	Inhibición moderada
6	Filosfera	<i>Lysinibacillus sphaericus</i>	<i>Pantoea dispersa</i> strain GTC 1472.	>10 mm	Inhibición fuerte
7	Filosfera	<i>Bacillus pumilus</i>	<i>Pantoea dispersa</i> strain GTC 1472.	2 – 10 mm	Inhibición moderada
8	Rizosfera	<i>Lysinibacillus sphaericus</i>	<i>Pantoea dispersa</i> strain GTC 1472.	>10 mm	Inhibición fuerte
9	Rizosfera	<i>Bacillus aryabhattai</i>	<i>Pantoea dispersa</i> strain GTC 1472.	0 mm	No inhibición
10	Rizosfera	<i>Bacillus thuringiensis</i>	<i>Pantoea dispersa</i> strain GTC 1472.	>10 mm	Inhibición fuerte
11	Rizosfera	<i>Bacillus megaterium</i>	<i>Pantoea dispersa</i> strain GTC 1472.	2 – 10 mm	Inhibición moderada
12	Rizosfera	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	<i>Pantoea dispersa</i> strain GTC 1472.	>10 mm	Inhibición fuerte
13	Rizosfera	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	<i>Pantoea dispersa</i> strain GTC 1472.	>10 mm	Inhibición fuerte
14	Rizosfera	<i>Bacillus pumilus</i>	<i>Pantoea dispersa</i> strain GTC 1472.	2 – 10 mm	Inhibición moderada
15	Rizosfera	<i>Lysinibacillus sphaericus</i>	<i>Pantoea dispersa</i> strain GTC 1472.	>10 mm	Inhibición fuerte

Nº	PROCEDENCIA DE LA MUESTRA	BACTERIA ANTAGONICA	BACTERIA DE LA MICROBIOTA	DIÁMETRO DE INHIBICIÓN	CONDICIÓN DE LA ZONA DE INHIBICIÓN
1	Filosfera	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	<i>Serratia nematodiphila</i>	>10 mm	Inhibición fuerte
2	Filosfera	<i>Bacillus megaterium</i>	<i>Serratia nematodiphila</i>	2 – 10 mm	Inhibición moderada
3	Filosfera	<i>Bacillus pumilus</i>	<i>Serratia nematodiphila</i>	2 – 10 mm	Inhibición moderada
4	Filosfera	<i>Bacillus megaterium</i>	<i>Serratia nematodiphila</i>	2 – 10 mm	Inhibición moderada
5	Filosfera	<i>Bacillus megaterium</i>	<i>Serratia nematodiphila</i>	2 – 10 mm	Inhibición moderada
6	Filosfera	<i>Lysinibacillus sphaericus</i>	<i>Serratia nematodiphila</i>	>10 mm	Inhibición fuerte
7	Filosfera	<i>Bacillus pumilus</i>	<i>Serratia nematodiphila</i>	2 – 10 mm	Inhibición moderada
8	Rizosfera	<i>Lysinibacillus sphaericus</i>	<i>Serratia nematodiphila</i>	>10 mm	Inhibición fuerte
9	Rizosfera	<i>Bacillus aryabhattai</i>	<i>Serratia nematodiphila</i>	0 mm	No inhibición
10	Rizosfera	<i>Bacillus thuringiensis</i>	<i>Serratia nematodiphila</i>	>10 mm	Inhibición fuerte
11	Rizosfera	<i>Bacillus megaterium</i>	<i>Serratia nematodiphila</i>	2 – 10 mm	Inhibición moderada
12	Rizosfera	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	<i>Serratia nematodiphila</i>	>10 mm	Inhibición fuerte
13	Rizosfera	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	<i>Serratia nematodiphila</i>	>10 mm	Inhibición fuerte
14	Rizosfera	<i>Bacillus pumilus</i>	<i>Serratia nematodiphila</i>	2 – 10 mm	Inhibición moderada
15	Rizosfera	<i>Lysinibacillus sphaericus</i>	<i>Serratia nematodiphila</i>	>10 mm	Inhibición fuerte

N°	PROCEDENCIA DE LA MUESTRA	BACTERIA ANTAGONICA	BACTERIA DE LA MICROBIOTA	DIÁMETRO DE INHIBICIÓN	CONDICIÓN DE LA ZONA DE INHIBICIÓN
1	Filosfera	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	<i>Acinetobacter baumannii</i>	>10 mm	Inhibición fuerte
2	Filosfera	<i>Bacillus megaterium</i>	<i>Acinetobacter baumannii</i>	2 – 10 mm	Inhibición moderada
3	Filosfera	<i>Bacillus pumilus</i>	<i>Acinetobacter baumannii</i>	2 – 10 mm	Inhibición moderada
4	Filosfera	<i>Bacillus megaterium</i>	<i>Acinetobacter baumannii</i>	2 – 10 mm	Inhibición moderada
5	Filosfera	<i>Bacillus megaterium</i>	<i>Acinetobacter baumannii</i>	2 – 10 mm	Inhibición moderada
6	Filosfera	<i>Lysinibacillus sphaericus</i>	<i>Acinetobacter baumannii</i>	>10 mm	Inhibición fuerte
7	Filosfera	<i>Bacillus pumilus</i>	<i>Acinetobacter baumannii</i>	2 – 10 mm	Inhibición moderada
8	Rizosfera	<i>Lysinibacillus sphaericus</i>	<i>Acinetobacter baumannii</i>	>10 mm	Inhibición fuerte
9	Rizosfera	<i>Bacillus aryabhattai</i>	<i>Acinetobacter baumannii</i>	0 mm	No inhibición
10	Rizosfera	<i>Bacillus thuringiensis</i>	<i>Acinetobacter baumannii</i>	>10 mm	Inhibición fuerte
11	Rizosfera	<i>Bacillus megaterium</i>	<i>Acinetobacter baumannii</i>	2 – 10 mm	Inhibición moderada
12	Rizosfera	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	<i>Acinetobacter baumannii</i>	>10 mm	Inhibición fuerte
13	Rizosfera	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	<i>Acinetobacter baumannii</i>	>10 mm	Inhibición fuerte
14	Rizosfera	<i>Bacillus pumilus</i>	<i>Acinetobacter baumannii</i>	2 – 10 mm	Inhibición moderada
15	Rizosfera	<i>Lysinibacillus sphaericus</i>	<i>Acinetobacter baumannii</i>	>10 mm	Inhibición fuerte

N°	PROCEDENCIA DE LA MUESTRA	BACTERIA ANTAGONICA	BACTERIA DE LA MICROBIOTA	DIÁMETRO DE INHIBICIÓN	CONDICIÓN DE LA ZONA DE INHIBICIÓN
1	Filosfera	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	<i>Pantoea agglomerans</i>	>10 mm	Inhibición fuerte
2	Filosfera	<i>Bacillus megaterium</i>	<i>Pantoea agglomerans</i>	>10 mm	Inhibición fuerte
3	Filosfera	<i>Bacillus pumilus</i>	<i>Pantoea agglomerans</i>	2 – 10 mm	Inhibición moderada
4	Filosfera	<i>Bacillus megaterium</i>	<i>Pantoea agglomerans</i>	>10 mm	Inhibición fuerte
5	Filosfera	<i>Bacillus megaterium</i>	<i>Pantoea agglomerans</i>	>10 mm	Inhibición fuerte
6	Filosfera	<i>Lysinibacillus sphaericus</i>	<i>Pantoea agglomerans</i>	>10 mm	Inhibición fuerte
7	Filosfera	<i>Bacillus pumilus</i>	<i>Pantoea agglomerans</i>	2 – 10 mm	Inhibición moderada
8	Rizosfera	<i>Lysinibacillus sphaericus</i>	<i>Pantoea agglomerans</i>	>10 mm	Inhibición fuerte
9	Rizosfera	<i>Bacillus aryabhattai</i>	<i>Pantoea agglomerans</i>	2 – 10 mm	Inhibición moderada
10	Rizosfera	<i>Bacillus thuringiensis</i>	<i>Pantoea agglomerans</i>	>10 mm	Inhibición fuerte
11	Rizosfera	<i>Bacillus megaterium</i>	<i>Pantoea agglomerans</i>	>10 mm	Inhibición fuerte
12	Rizosfera	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	<i>Pantoea agglomerans</i>	>10 mm	Inhibición fuerte
13	Rizosfera	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	<i>Pantoea agglomerans</i>	>10 mm	Inhibición fuerte
14	Rizosfera	<i>Bacillus pumilus</i>	<i>Pantoea agglomerans</i>	2 – 10 mm	Inhibición moderada
15	Rizosfera	<i>Lysinibacillus sphaericus</i>	<i>Pantoea agglomerans</i>	>10 mm	Inhibición fuerte

N°	PROCEDENCIA DE LA MUESTRA	BACTERIA ANTAGONICA	BACTERIA DE LA MICROBIOTA	DIÁMETRO DE INHIBICIÓN	CONDICIÓN DE LA ZONA DE INHIBICIÓN
1	Filosfera	<i>Bacillusamyloliquefaciens</i>	<i>Serratia marcescens</i>	>10 mm	Inhibición fuerte
2	Filosfera	<i>Bacillusmegaterium</i>	<i>Serratia marcescens</i>	>10 mm	Inhibición fuerte
3	Filosfera	<i>Bacilluspumilus</i>	<i>Serratia marcescens</i>	2 – 10 mm	Inhibición moderada
4	Filosfera	<i>Bacillusmegaterium</i>	<i>Serratia marcescens</i>	>10 mm	Inhibición fuerte
5	Filosfera	<i>Bacillusmegaterium</i>	<i>Serratia marcescens</i>	2 – 10 mm	Inhibición moderada
6	Filosfera	<i>Lysinibacillus sphaericus</i>	<i>Serratia marcescens</i>	>10 mm	Inhibición fuerte
7	Filosfera	<i>Bacilluspumilus</i>	<i>Serratia marcescens</i>	2 – 10 mm	Inhibición moderada
8	Rizosfera	<i>Lysinibacillus sphaericus</i>	<i>Serratia marcescens</i>	>10 mm	Inhibición fuerte
9	Rizosfera	<i>Bacillus aryabhattai</i>	<i>Serratia marcescens</i>	2 – 10 mm	Inhibición moderada
10	Rizosfera	<i>Bacillus thuringiensis</i>	<i>Serratia marcescens</i>	>10 mm	Inhibición fuerte
11	Rizosfera	<i>Bacillusmegaterium</i>	<i>Serratia marcescens</i>	2 – 10 mm	Inhibición moderada
12	Rizosfera	<i>Bacillusamyloliquefaciens</i>	<i>Serratia marcescens</i>	>10 mm	Inhibición fuerte
13	Rizosfera	<i>Bacillusamyloliquefaciens</i>	<i>Serratia marcescens</i>	>10 mm	Inhibición fuerte
14	Rizosfera	<i>Bacilluspumilus</i>	<i>Serratia marcescens</i>	2 – 10 mm	Inhibición moderada
15	Rizosfera	<i>Lysinibacillus sphaericus</i>	<i>Serratia marcescens</i>	>10 mm	Inhibición fuerte

N°	PROCEDENCIA DE LA MUESTRA	BACTERIA ANTAGONICA	BACTERIA DE LA MICROBIOTA	DIÁMETRO DE INHIBICIÓN	CONDICIÓN DE LA ZONA DE INHIBICIÓN
1	Filosfera	<i>Bacillusamyloliquefaciens</i>	<i>Acinetobacter sp.</i>	>10 mm	Inhibición fuerte
2	Filosfera	<i>Bacillusmegaterium</i>	<i>Acinetobacter sp.</i>	2 – 10 mm	Inhibición moderada
3	Filosfera	<i>Bacilluspumilus</i>	<i>Acinetobacter sp.</i>	2 – 10 mm	Inhibición moderada
4	Filosfera	<i>Bacillusmegaterium</i>	<i>Acinetobacter sp.</i>	2 – 10 mm	Inhibición moderada
5	Filosfera	<i>Bacillusmegaterium</i>	<i>Acinetobacter sp.</i>	2 – 10 mm	Inhibición moderada
6	Filosfera	<i>Lysinibacillus sphaericus</i>	<i>Acinetobacter sp.</i>	>10 mm	Inhibición fuerte
7	Filosfera	<i>Bacilluspumilus</i>	<i>Acinetobacter sp.</i>	2 – 10 mm	Inhibición moderada
8	Rizosfera	<i>Lysinibacillus sphaericus</i>	<i>Acinetobacter sp.</i>	>10 mm	Inhibición fuerte
9	Rizosfera	<i>Bacillus aryabhatai</i>	<i>Acinetobacter sp.</i>	2 – 10 mm	Inhibición moderada
10	Rizosfera	<i>Bacillus thuringiensis</i>	<i>Acinetobacter sp.</i>	>10 mm	Inhibición fuerte
11	Rizosfera	<i>Bacillusmegaterium</i>	<i>Acinetobacter sp.</i>	2 – 10 mm	Inhibición moderada
12	Rizosfera	<i>Bacillusamyloliquefaciens</i>	<i>Acinetobacter sp.</i>	>10 mm	Inhibición fuerte
13	Rizosfera	<i>Bacillusamyloliquefaciens</i>	<i>Acinetobacter sp.</i>	>10 mm	Inhibición fuerte
14	Rizosfera	<i>Bacilluspumilus</i>	<i>Acinetobacter sp.</i>	2 – 10 mm	Inhibición moderada
15	Rizosfera	<i>Lysinibacillus sphaericus</i>	<i>Acinetobacter sp.</i>	>10 mm	Inhibición fuerte

Con respecto a los efectos citotóxicos del hongo *Nomuraea rileyi*, evaluados sobre los estados adultos de *Chaetanaphothrips signipennis*. De cada 100 individuos en las tarrinos se logro una moratalidad del 67% al cuarto día de aplicación y de 100 % al séptimo día de aplicación el los estados adultos.

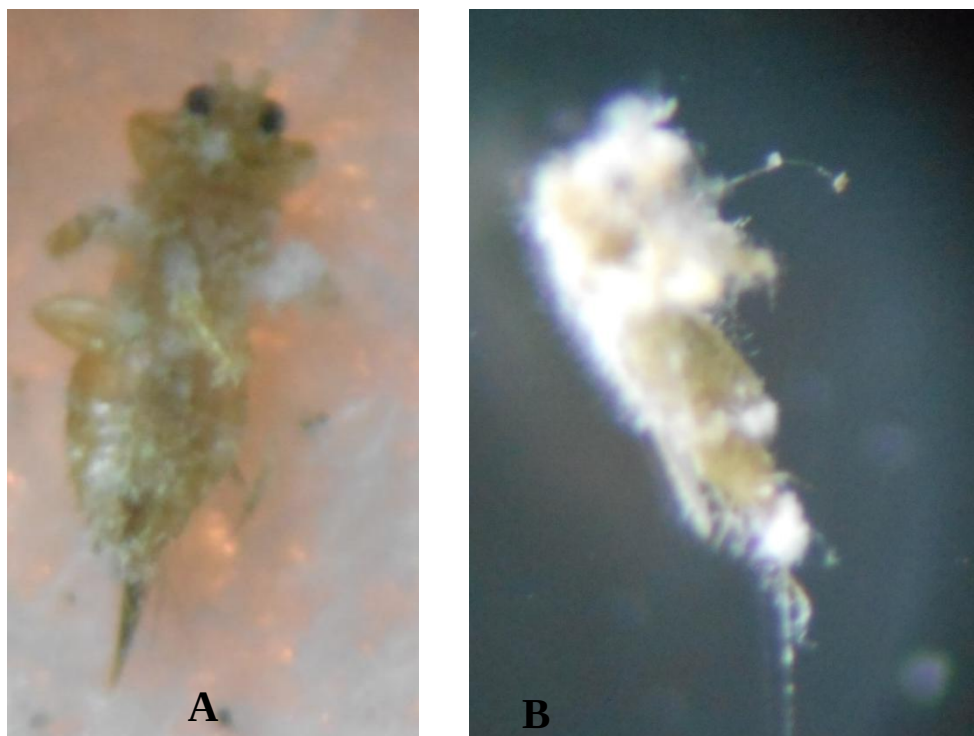


Figura 40. Efecto citiotoxic del hongo *Nomuraea rileyi*, sobre *C. signnipennis*. A) Cuarto día después aplicación b) séptimo día después de la aplicación.

DISCUSIÓN

Las secuencias que se han sido obtenidas de la amplificación para la identificación molecular de las especies *C. signipennis* y *F. párvula*, utilizando los tres locis genéticos diferentes: 18S ADN ribosomal, Tubulin -alfa I y citocromo oxidasa C subunidad I, no lograron tener una alta homología con las secuencias disponibles de la base de datos del centro nacional de información biotecnológica (NCBI, por sus siglas en inglés); debido a que hasta la fecha no se encuentra disponible las secuencias génicas de ambas especies, que solo han sido identificadas con métodos tradicionales, utilizando claves taxonómicas. Las secuencias disponibles con las que mas homología han logrado tener son con las que han sido puestas a disposición por parte de R.S. Buckman *et al*, 2013; quien realizó la filogenia de trips (Insecta: Thysanoptera), basados en cinco locis molecular diferentes.

Las bacterias aisladas y caracterizadas molecularmente de *C. signipennis* y *F. párvula*; están asociados de manera simbiótica, al proceso ontogénico de dichos insectos. Siendo *Serratia marcescens* y *Pantoea agglomerans* las especies bacterianas que se han logrado encontrarse en los análisis moleculares realizados. De Vries *et al.*, 2010, determinó que *S.marcescens* y *P. agglomerans* son simbiontes obligados de *Thrips tabaci* y *Frankliniella occidentalis* (Thysanoptera: Thripidae).

Los metagenomas realizados de *C. signipennis* y *F. párvula* muestran la gran diversidad bacteriana presente en los diferentes estados de desarrollo de los “trips del banano” (huevos, ninfas y adultos). La comparación de los diferentes metagenomas muestra que *S.marcescens* se encuentra presente en los diferentes estados de desarrollo de *F. párvula*. Mediante la estimación de la diversidad bacteriana de *Scirtothrips dorsalis* (Thysanoptera: Thripidae), mediante secuenciación de nueva generación; Mannion CM., *et al*, 2014, han logrado identificar el género *Serratia*, presente en los estados ninfales y adultos.

Utilizando el protocolo desarrollado por QIAGEN KIT Qproteome® Bacterial Protein Preparation Handbook catalogo 37900 se logró extraer proteínas. Migradas a 90 voltios por 3 horas, no en todos los microorganismos se obtuvo las bandas deseadas por lo que permitió seguir optimizando la D.O de algunos cultivos de microorganismos, y co-cultivos de *Chaetanaphothrips signipennis* y *Frankliniella párvula*. Se digirió dos bandas por muestra utilizando el protocolo de Shevchenko et al 2006: que nos permitió la digestión eficiente de proteínas fijadas en gel de poliacrilamida. Se realizó análisis por espectrometría de masas MS MALDI TOF- TOF obteniendo mapeos de masas de alto rendimiento que nos permitió la identificación de secuencias de aminoácidos correspondientes a los microorganismos a estudio con más de 90% de confianza.

La espectrometría de masas mediante la técnica de Ionización/Desorción de Laser Asistido por Matriz en doble tiempo de vuelta (MALDI - TOF/TOF MS), de las proteínas extraídas de *C. signipennis*, muestran un péptido de 18 amino ácidos que tiene un porcentaje de homología del 100 % con el ARN polimerasa dependiente de ARN del virus del bronceado del tomate (TSWV, del inglés tomato spotted wilt virus), este virus no ha sido reportado anteriormente en *C. signipennis* (Rotenberg D., et al, 2014).

La búsqueda de microorganismos antagonistas, en la filosfera y rizosfera del banano, mediante el uso de herramientas moleculares nos ha permitido caracterizar bacterias del género *bacillus* y un hongo del género *Nomuraea* que nos ha permitido desarrollar los ensayos de antagonismo con las cepas de la microbiota intestinal de los trips del banano. Ceballos I, et al., 2011, ha descrito bacterias del género *bacillus* en plantas de banano.

Las bacterias *Lysinibacillus sphaericus* y *Bacillus amyloliquefaciens* han mostrado una buena inhibición de las bacterias de la microbiota intestinal de los trips del banano. El hongo del género *Nomuraea* ha mostrado efectos citotóxicos sobre los trips del banano.

CONCLUSIONES

Se ha logrado caracterizar una gran diversidad bacteriana cultivada y no cultivada, presente en el tracto digestivo de los “trips del banano”, basados en métodos dependientes e independientes de cultivo microbiano.

La microbiota cultivable y no cultivable se ha podido caracterizar a nivel genómico, metagenómico y proteómico, siendo las especies *Serratia marcescens* y *Pantoea agglomerans*, simbiontes obligados de los “trips del banano”.

La filosfera y rizosfera de banano albergan una gran diversidad de microorganismo beneficios, que pueden ser utilizados para controlar diversas plagas y enfermedades presentes en el cultivo de banano. Siendo *Bacillus amyloliquefaciens* y *Lysinibacillus sphaericus*, dos especies bacterianas que han mostrado desequilibrar las bacterias simbiontes obligadas de los “trips del banano”: *Serratia marcescens* y *Pantoea agglomerans*.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Ahmad F, Babalola OO, Tak HI. Potential of MALDI-TOF mass spectrometry as a rapid detection technique in plant pathology: identification of plant-associated microorganisms. *Anal Bioanal Chem*. 2012 Sep;404(4):1247-55. doi: 10.1007/s00216-012-6091-7. Epub 2012 May 30. Review. PubMed PMID: 22644150.

Arthurs, S. P., Aristizábal, L. F., & Avery, P. B. (2013). Evaluation of Entomopathogenic Fungi Against Chilli Thrips, *Scirtothrips dorsalis*. *Journal of Insect Science*, 13, 31. <http://doi.org/10.1673/031.013.3101>.

Ceballos I, Mosquera S, Angulo M, Mira JJ, Argel LE, Uribe-Velez D, Romero-Tabarez M, Orduz-Peralta S, Villegas V. Cultivable bacteria populations associated with leaves of banana and plantain plants and their antagonistic activity against *Mycosphaerella fijiensis*. *Microb Ecol*. 2012 Oct;64(3):641-53. Epub 2012 May 5. PubMed PMID: 22562105.

Chanbusarakum L, Ullman D. Characterization of bacterial symbionts in *Frankliniella occidentalis* (Pergande), Western flower thrips. *J Invertebr Pathol*. 2008 Nov;99(3):318-25. doi: 10.1016/j.jip.2008.09.001. Epub 2008 Sep 9. PubMed PMID: 18809409.

De Vries EJ, Breeuwer JA, Jacobs G, Mollema C. The association of Western flower thrips, *Frankliniella occidentalis*, with a near *Erwinia* species gut bacteria: transient or permanent? *J Invertebr Pathol*. 2001 Feb; 77(2):120-8. PubMed PMID: 11273692.

De Vries EJ, Jacobs G, Breeuwer JA. Growth and transmission of gut bacteria in the Western flower thrips, *Frankliniella occidentalis*. *J Invertebr Pathol*. 2001 Feb;77(2):129-37. PubMed PMID: 11273693.

De Vries, E. J., Jacobs, G., Sabelis, M. W., Menken, S. B. J., & Breeuwer, J. A. J. (2004). Diet-dependent effects of gut bacteria on their insect host: the symbiosis of *Erwinia* sp. and western flower thrips. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 271(1553), 2171–2178. <http://doi.org/10.1098/rspb.2004.2817>.

Dvorak, V., Halada, P., Hlavackova, K., Dokianakis, E., Antoniou, M., & Volf, P. (2014). Identification of phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae) by matrix-assisted laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry. *Parasites & Vectors*, 7, 21. <http://doi.org/10.1186/1756-3305-7-21>.

REBECCA S. BUCKMAN, LAURENCE A. MOUND and MICHAEL F. WHITING. (2012). Phylogeny of thrips (Insecta: Thysanoptera) based on five molecular loci. *Systematic Entomology*, 38, 123–133; DOI: 10.1111/j.1365-3113.2012.00650.x.

Souza A, Cruz JC, Sousa NR, Procópio AR, Silva GF. Endophytic bacteria from banana cultivars and their antifungal activity. *Genet Mol Res*. 2014 Oct 27;13(4):8661-70. doi: 10.4238/2014.October.27.6. PubMed PMID: 25366756.

Wu S, Gao Y, Zhang Y, Wang E, Xu X, et al. (2014). An Entomopathogenic Strain of *Beauveria bassiana* against *Frankliniella occidentalis* with no Detrimental Effect on the Predatory Mite *Neoseiulus barkeri* ? : Evidence from Laboratory Bioassay and Scanning Electron Microscopic Observation. *PLoS ONE* 9(1): e84732. doi:10.1371/journal.pone.0084732.