



Universidad Autónoma de Querétaro
Facultad de Ciencias Naturales
Doctorado en Ciencias Biológicas

Efecto de los microorganismos en la ecología y evolución de las interacciones entre las plantas y sus insectos herbívoros

TESIS

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de Doctor en Ciencias Biológicas

Presenta:

Zyanya Mayoral Peña

Dirigido por:

Dra. Etzel Garrido Espinosa

Dra. Etzel Garrido Espinosa
Presidente
Dr. Roberto Carlos Álvarez Martínez
Sinodal Secretario
Dr. Rolando Tenoch Bárcenas Luna
Sinodal Vocal
Dra. Laila Pamela Partida Martínez
Sinodal Suplente
Dr. Juan E. Fornoni Agnelli
Sinodal suplente

Centro Universitario, Querétaro, Qro.

Fecha de aprobación por el Consejo Universitario (Julio,2023)

México



Dirección General de Bibliotecas y Servicios Digitales
de Información



Efecto de los microorganismos en la ecología y
evolución de las interacciones entre las plantas y sus
insectos herbívoros

por

Zyanya Mayoral Peña

se distribuye bajo una [Licencia Creative Commons
Atribución-NoComercial-SinDerivadas 4.0
Internacional](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/).

Clave RI: CNDCC-179043

Dedicatorias

A todos los que me acompañaron en este recorrido

Agradecimientos

Al posgrado en Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Querétaro (UAQ).

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca.

A los miembros del comité tutorial, Dra, Etzel Garrido, Dr. Roberto Álvarez, Dr. Rolando Bárcena, Dra. Laila Partida y Dr. Juan Fornoni.

A los miembros del laboratorio de Genética Molecular y Ecología Evolutiva.

Al grupo de Evolución Teórica y Aplicada.

A mi familia.

A mis amigos.

A Etzel por su paciencia y ejemplo, gracias.

Índice

Resumen	7
Abstract	10
I. Introducción	11
II. Capítulo 1. El efecto de los microorganismos en las interacciones planta-insecto	18
2.1 Desde la microbiota hasta las interacciones planta-insecto.....	19
2.2 Intercambio de microbiotas en las interacciones planta-insecto	21
2.3 La filósfera y el desempeño de los insectos.....	23
2.4 La microbiota intestinal y las defensas de las plantas	28
2.5 Redes multicapa e interacciones entre microbiotas.....	34
2.6 Experimentación en las interacciones microorganismo-insecto-planta.....	36
III. Capítulo 2. El estudio de las interacciones planta-insecto a través de sus bacteriomas ...	38
3.1 Introducción.....	39
3.2 Hipótesis y objetivos	42
3.2.1 Hipótesis	42
3.2.2 Objetivos.....	42
3.3 Material y métodos.....	43
3.3.1 Colecta y procesamiento de las muestras	43
3.3.2 Extracción de ADN y generación de amplicones de ARNr 16S.....	44
3.3.3 Análisis de datos	45
3.4 Resultados.....	47
3.4.1 La composición y diversidad de los bacteriomas de la planta y el insecto	47
3.4.2 Inferencias funcionales de los ASV encontrados en las muestras	57
3.4.3 Redes de co-abundancia	60
3.5 Discusión	62
3.5.1 La composición y diversidad de los bacteriomas de la planta y el insecto	62
3.5.2 Inferencias funcionales de los ASV encontrados en las muestras	64
3.5.3 Redes de co-abundancia	67
IV. Capítulo 3. El efecto de la filósfera sobre el desempeño de los insectos	70
4.1 Introducción.....	71
4.2 Hipótesis y objetivos	73

4.2.1 Hipótesis	73
4.2.2 Objetivos	73
4.3 Material y métodos	74
4.3.1 Sistema de estudio	74
4.3.2 Diseño experimental	74
4.3.3 Análisis de datos	76
4.4 Resultados	77
4.5 Discusión	80
V. Discusión general	86
VI. Perspectivas	92
VII. Referencias	95
Anexo 1. Capítulo de libro publicado a partir de la revisión del Capítulo 1	100
Anexo 2. Artículo científico publicado a partir de los resultados del Capítulo 2	101

Índice de figuras

Figura 1. Representación de la interacción microorganismos-insectos-planta.....	15
Figura 2. Curvas de rarefacción de las ASV	49
Figura 3. Distribución de la diversidad alfa en muestras de la planta y el insecto	50
Figura 4. Abundancias relativas de géneros microbianos compartidos entre el insecto y la planta.	51
Figura 5. Composición taxonómica de géneros bacterianos en la planta e insecto.....	52
Figura 6. Análisis de diversidad beta microbiana de las muestras de la planta y el insecto.....	54
Figura 7. Diferencia en las abundancia de los géneros microbianos de la planta y el insecto.....	55
Figura 8. Mapa de calor de las categorías funcionales inferidas para los bacteriomas de la planta y el insecto.....	58
Figura 9. Abundancias relativas de ortólogos KEGG (KOs)	59
Figura 10. Red multicapa que muestra las co-abundancias entre los fila bacterianos en la planta y el insecto.....	61
Figura 11. Efecto de los epífitos en el desempeño del insecto	78
Figura 12. Gráfica de interacción entre mes y tratamiento en la variable duración del desarrollo....	79

Índice de tablas

Tabla 1. Resumen de secuencias y ASVs analizadas por muestra	47
Tabla 2. Géneros compartidos entre el bacterioma de la planta con diferentes combinaciones de las muestras de insectos	56

Resumen

Las interacciones ecológicas entre las plantas y sus insectos herbívoros involucran, necesariamente, a los microorganismos asociados a ambos interactuantes. Durante la última década, el efecto de los microorganismos en las interacciones planta-insecto ha sido estudiado en numerosas investigaciones multidisciplinarias. Sin embargo, aún se desconocen los efectos del intercambio recíproco de los microorganismos en la ecología y la evolución de estas interacciones. Para entender mejor el papel que juegan las bacterias asociadas a ambos interactuantes se utilizó el sistema de estudio compuesto por la planta *Datura innoxia* y su insecto herbívoro especialista *Lema daturaphila* y se plantearon los siguientes objetivos. Primero, describir y comparar la diversidad y composición de los bacteriomas asociados a las semillas y hojas de *D. innoxia*, y a los huevos, intestino y heces del insecto *L. daturaphila*. Segundo, inferir el papel funcional y estructural de los grupos bacterianos más abundantes. Finalmente, probar empíricamente el papel del filoplano de *D. innoxia* en el desempeño de su insecto especialista. En general, se observó que aunque las plantas e insectos comparten varios géneros bacterianos existen diferencias en la abundancia con la que se presentan en los diferentes tejidos. En la planta, los géneros más abundantes fueron: *Serratia* (40%) en semillas, *Serratia* (67%) en endófitos foliares e *Hymenobacter* (12.85%) en epífitos. Por el contrario, los géneros más abundantes en el insecto fueron: *Pseudomonas* (24.64%) en huevos, *Serratia* (88.46%) en intestino y *Pseudomonas* (36.27%) en heces. Las inferencias funcionales mostraron que los bacteriomas participan en la biosíntesis de metabolitos secundarios (1.4%) en las plantas y, en la degradación de xenobióticos en los insectos (2.5%). Finalmente, se mostró experimentalmente que las bacterias epífitas afectan directamente el resultado de la interacción ya que las larvas que se alimentan de hojas sin epífitos consumen más tejido foliar, comparado con las larvas control, aunque presentan una menor masa como adultos. Estos resultados sugieren que la presencia de las bacterias epífitas podría ser considerada una primera línea de defensa ante el consumo y su influencia podría reflejarse en la dinámica coevolutiva.

Palabras clave: bacterioma, eficacia del consumo foliar, epífitos, interacción planta-insecto, masa adultos

Abstract

The ecological interactions between plants and their insect herbivores, necessarily, also involve the microorganisms associated with both participants. During the last decade, the effect of microorganisms on plant-insect interactions has been studied in numerous multidisciplinary investigations. However, the effects of the reciprocal exchange of microorganisms on the ecology and evolution of these interactions are still unknown. In order to better understand the role played by the bacteria associated with both interactants, the study system composed of the plant *Datura innoxia* and its specialist herbivorous insect *Lema daturaphila* was used, and the following objectives were set. First, to describe and compare the diversity and composition of bacteriomes associated with the seeds and leaves of *D. innoxia* and the eggs, gut and frass of the insect *L. daturaphila*. Second, to infer the functional and structural role of the most abundant bacterial groups. Finally, to empirically test the role of the phylloplane of *D. innoxia* on the performance of its specialist insect. Overall, while plants and insects shared several bacterial genera there were differences in their abundances among the different tissues. In the plant, the most abundant genera were: *Serratia* (40%) in seeds, *Serratia* (67%) in foliar endophytes and *Hymenobacter* (12.85%) in epiphytes. On the contrary, the most abundant genera in the insect were: *Pseudomonas* (24.64%) in eggs, *Serratia* (88.46%) in guts and *Pseudomonas* (36.27%) in frass. Functional inferences showed that bacteriomes participate in the biosynthesis of secondary metabolites (1.4%) in plants, and in the degradation of xenobiotics in insects (2.5%). Finally, it was experimentally shown that the epiphytic bacteria directly affect the outcome of the interaction, given that larvae feeding on leaves without epiphytes consumed more leaf tissue, compared to control larvae, but achieved lesser mass as adults. These results suggest that the presence of epiphytic bacteria might be the first line of defence in the presence of herbivores and its influence could be reflected in coevolutionary dynamics.

Keywords: adult mass, bacteriomes, efficiency of foliar intake, epiphytes, interaction plant-insect.

I. Introducción

La interacción planta-insecto involucra el intercambio constante y recíproco de los microorganismos asociados a ambos individuos interactuantes (Felton & Tumlinson, 2008; Sugio et al., 2015; Mason, 2020; Mayoral-Peña et al., 2020). En dicho contexto, los avances tecnológicos de los últimos años nos han permitido describir con mayor detalle a las comunidades microbianas asociadas a plantas e insectos, no sólo en términos de composición sino también en su papel funcional y estructural (Arnold et al., 2016; Milligan-McClellan et al., 2022). Por lo que cada vez son más las publicaciones en las que se consideran a los microorganismos como parte de la ecología y evolución de las interacciones planta-insecto (Biere & Tack, 2013; Wielkopolan & Obrępalska-Stęplowska, 2016; Mason et al., 2018; Grunseich et al., 2020), aunque son contadas las que evalúan el efecto del intercambio de microbiotas en ambos hospederos (Hannula, 2019; Višňovska et al., 2020; Mogouong et al., 2021). En especial, se conoce poco acerca del papel funcional que tienen los linajes microbianos no-patógenos presentes en la herbivoría (Felton & Tumlinson, 2008; Sugio et al., 2015; Mason, 2020).

Al conjunto de microorganismos asociados a plantas e insectos se le llama microbiota (Marchesi & Ravel, 2015). Ésta incluye a distintos grupos taxonómicos, tales como bacterias, arqueas, hongos, algas, virus y protozoarios (Lindow & Brandl, 2003; Engel & Moran, 2013; Marchesi & Ravel, 2015). Dichos microorganismos se encuentran en los tejidos internos de las plantas (endófitos) así como en la superficie (epífitos), la suma de ambos da lugar a la filósfera (Newton et al., 2010; Whipps et al., 2008; Carvalho & Castillo, 2018). En los insectos, los microorganismos que están en la cutícula se denominan exógenos, mientras que los endógenos son aquellos que se encuentran inmersos en los tejidos (Rosenberg & Zilber-Rosenberg, 2016). Cuando se considera el genoma de todos los microorganismos asociados, se conoce como microbioma (Marchesi & Ravel, 2015). Asimismo, el término bacterioma hace referencia a la caracterización de únicamente los grupos bacterianos (Hopson et al., 2020).

En sus hospederos, las comunidades microbianas tienen distintos papeles funcionales. En las plantas, la filósfera promueve el crecimiento vegetal; influye en la emisión de metabolitos secundarios; afecta el desarrollo y el vigor de las plantas; promueve la germinación; participa en la tolerancia al estrés abiótico así como en la protección contra patógenos y herbívoros (Pandiyan et al., 2021; Poveda, 2021; Sharath et al., 2021). En los insectos los endógenos participan en la asimilación de nutrientes; están involucrados en el metabolismo de los polímeros vegetales; aportan nutrientes; protegen contra el estrés ambiental; intervienen en los mecanismos de detoxificación; afectan el desarrollo de las larvas, la puesta de huevos, la longevidad y la conducta de los herbívoros (Engel & Moran, 2013; Jing et al., 2020; Schmidt & Engel, 2021). En cuanto a los exógenos hay algunos que participan en los mecanismos de detoxificación (Itoh et al., 2018). Pese a la influencia que tienen en sus hospederos, su efecto se extiende a sus interacciones pues hay un constante intercambio entre la microbiota de la planta y la del insecto. Por lo que surge la pregunta, ¿qué efecto tiene la microbiota del insecto en la planta y la de la planta en el insecto?

La intensidad y el patrón de daño durante la herbivoría es el resultado de la interacción de la planta con el insecto y la microbiota de sus secreciones orales (Felton & Tumlinson, 2008; Sugio et al., 2015). Indirectamente, los microorganismos del insecto modifican la composición de la filósfera (Humphrey et al., 2014; Humphrey & Whiteman, 2020; Smets & Koskella, 2020), pero también influyen en las respuestas de defensa (Hammer & Bowers, 2015). Las plantas en general se defienden mediante la resistencia y la tolerancia (Núñez-Farfán et al., 2007). La resistencia es la capacidad de las plantas para reducir o evitar el daño mediante la producción de toxinas, tricomas, proteínas antinutritivas, lignificación de tejidos y metabolitos secundarios (Howe & Jander, 2008). En este sentido son varios los estudios que han demostrado que la microbiota del insecto es capaz de afectar la producción de metabolitos secundarios en la planta consumida (Chung et al., 2013; Hammer & Bowers, 2015; Acevedo et al., 2017; Wang et al., 2017). En general, la microbiota asociada a las secreciones orales de los insectos reduce los niveles de

las defensas inducidas en las plantas, favoreciendo la ingesta de alimento (Felton & Tumlinson, 2008; Sugio et al., 2015). Otra respuesta defensiva es la tolerancia, que es la capacidad de las plantas para aminorar el efecto adverso de la herbivoría en su adecuación (Strauss & Agrawal, 1999; Stowe et al., 2000). Lo cual puede observarse (daño ejercido por el herbívoro) en el incremento de la tasa fotosintética, aumento en la tasa de crecimiento relativo, más ramificaciones, altos niveles de carbono almacenado en las raíces, así como la relocalización de recursos de las raíces a los brotes (Strauss & Agrawal, 1999). Pese a que se conoce que los microorganismos del insecto afectan aspectos relacionados con la tolerancia (Halitschke et al., 2011; Steinbrenner et al., 2011; Korpita et al., 2014; Giron et al., 2017), son pocos los estudios que profundizan en ello (Kaiser et al., 2010; Giron et al., 2013). Por lo que es un campo fértil para estudiar (Mayoral-Peña et al., 2020).

En cuanto a los insectos se sabe que la filósfera influye en la composición y estructura de su microbiota intestinal (Guidolin & Cônsoli, 2017; Mogouong et al., 2021), pues cuando el insecto se alimenta su intestino adquiere microorganismos del tejido vegetal (Gonella et al., 2015; Pons et al., 2019; Leite-Mondin et al., 2021). Los cambios en la composición de la microbiota intestinal pueden afectar la capacidad de los insectos para alimentarse e incluso repercutir en la duración del desarrollo (Freitak et al., 2007), la masa de las pupas (Freitak et al., 2007), el peso y el crecimiento de las larvas (Mason et al., 2014; Shikano et al., 2015) y en la descendencia (Olson et al., 2017; Qian et al., 2018). Aun así no es claro el papel funcional que tiene específicamente la filósfera en los insectos ni tampoco si su efecto es directo o indirecto (Biere & Tack, 2013). El primero implica que los microorganismos desempeñan una actividad funcional que afecta al herbívoro (Biere & Tack, 2013). El indirecto es que la presencia microbiana influye en la estructura de los residentes y en consecuencia al insecto (Biere & Tack, 2013).

Los microorganismos de la superficie de las plantas, filósfera, son inevitablemente, los primeros que están en contacto con los insectos desde que éstos eclosionan. Del mismo modo, por su asociación con las plantas, representan la primera barrera de protección contra los herbívoros (Hashidoko, 2005; Goswami

et al., 2021; Poveda, 2021). No obstante, son pocos los estudios que evalúan el efecto que tienen los epífitos en el desempeño de los insectos (Mason et al., 2014; Shikano et al., 2015; Olson et al., 2017) y ninguno de ellos considera el efecto de las comunidades totales, sino que evalúa el efecto individual de cada una de las cepas (Mason et al., 2014; Shikano et al., 2015; Olson et al., 2017) a pesar de que se ha visto que distintas combinaciones de microorganismos varían en sus efectos sobre los diferentes participantes (Peters et al., 2017). Debido a que no todos los microorganismos son cultivables, se estima que éstos están entre el 0.1 y el 5% (Ritz, 2007), considerar directamente a las comunidades del filoplano podría permitir analizar el efecto de la combinación de varios grupos taxonómicos. En términos ecológicos dicha aproximación podría darnos una idea más amplia del efecto de los epífitos en la interacción planta-insecto.

En síntesis, se puede decir que los microorganismos influyen en la supervivencia y adaptación de las plantas (Partida-Martínez & Heil, 2011; Pineda et al., 2013), y de sus insectos herbívoros (Chung et al., 2013; Asplen et al., 2014; Sharpton, 2018). Sin embargo, la información sobre el impacto de la microbiota de las plantas en el desempeño de los insectos así como la influencia de la microbiota de los insectos en las defensas de las plantas, deja varias preguntas abiertas (ver Figura 1) (Mason, 2020; Mayoral-Peña et al., 2020). Una de ellas está relacionada con la adaptación local, dado que los microorganismos son una fuente de variación que podría influir en ésta (Biere & Bennett, 2013; Biere & Tack, 2013). Las defensas de las plantas afectan distinto a los insectos dependiendo del tipo de interacción. Por ejemplo, en *Arabidopsis thaliana* se observó que la presencia de *Pseudomonas fluorescens* producía un efecto negativo en el insecto generalista *Spodoptera exigua* pero no en el especialista *Pieris rapae* (Van Oosten et al., 2008). En cuanto a la planta *D. inoxia* y su insecto especialista *L. daturaphila* no se conoce el efecto que tienen los microorganismos en la evolución de dicha interacción.

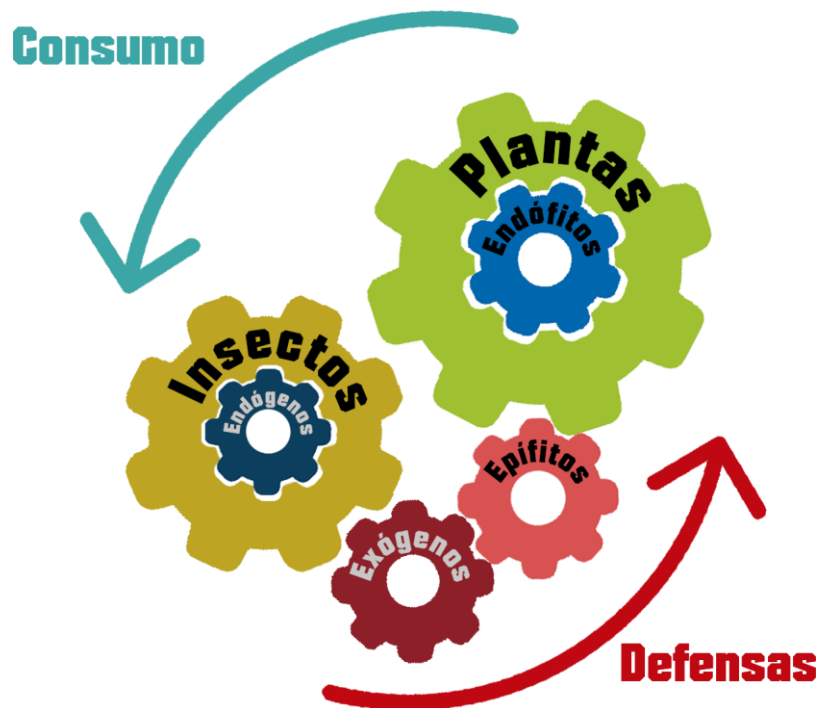


Figura 1. Representación de la interacción planta-insecto considerando a los microorganismos asociados a los tejidos internos y externos de ambos hospederos.

Evaluar la interacción planta-insecto requiere de estudios sistemáticos que combinen las aproximaciones de campo y laboratorio (Brooks et al., 2017). De igual manera, la selección de un modelo de herbivoría que sea fácil de manejar para conocer el efecto de los microorganismos. En este caso se propone el uso de la planta anual *Datura inoxia* y su insecto herbívoro especialista *Lema daturaphila*, ya que son económicos y fáciles de mantener. Asimismo hay un marco teórico importante en cuanto a la ecología y genética de *Datura stramonium* y *Lema daturaphila*, que brinda una base útil de información para el sistema propuesto (Fornoni & Núñez-Farfán, 2000; Valverde et al., 2001; Garrido, 2004; Garrido et al., 2012; Bustos-Segura et al., 2019). Dado que la interacción planta-insecto conlleva un intercambio constante y recíproco de microorganismos que están bajo un contexto de la carrera armamentista, surge la pregunta de cuál es el efecto que tiene

el intercambio mutuo de microorganismos en la adecuación de los interactuantes. Es decir, en el caso de *D. innoxia* qué tanto de sus respuestas defensivas son afectadas por la microbiota intestinal de *L. daturaphila*. Así como el efecto que tiene la filósfera en el desempeño de *L. daturaphila*. Con base en ello se planteó la hipótesis general de que la interacción entre la planta *Datura innoxia* y su insecto herbívoro especialista *Lema daturaphila* está mediada por los microorganismos asociados a ambos interactuantes. En esta tesis se presenta evidencia experimental que sienta la base para el estudio de las interacciones tripartitas microorganismo-insecto-planta desde una perspectiva ecológica y evolutiva. Estos resultados se presentan a detalle en los siguientes capítulos.

El primer capítulo es una revisión sobre el papel de los microorganismos en la ecología y evolución de la herbivoría. En este sentido, primero se discute el concepto de holobionte en el contexto ecológico y evolutivo. Después, se muestra la evidencia conocida acerca del papel de la microbiota de la filósfera en el desempeño del herbívoro, así como el efecto de la microbiota del insecto en los mecanismos de defensa de las plantas. Del mismo modo, se discute la relevancia de implementar la teoría de redes para analizar la interacción entre las microbiotas de plantas e insectos con la finalidad de detectar aquellos microorganismos que pudieran ser clave en la herbivoría. Finalmente se proponen algunos experimentos que podrían aportarnos una mejor comprensión en la interacción microorganismos-insecto-planta.

En el segundo capítulo se pone a prueba la hipótesis de que, debido a la interacción entre *D. innoxia* y *L. daturaphila*, existe una similitud en la composición de sus bacteriomas. La caracterización y comparación de los bacteriomas de semillas, endófitos y epífitos de la planta, así como del bacterioma de huevos, intestino y heces del insecto representan los primeros resultados de este capítulo. Además, a partir de los bacteriomas se determinó su papel funcional y se evaluaron los patrones de co-abundancia mediante redes multicapa. Al respecto, como se podrá ver en los resultados, la composición de ambos bacteriomas fue similar aunque las diferencias se vieron en sus abundancias. Esto sugiere que además de

considerar la presencia de los microorganismos es importante tomar en cuenta la proporción en la que están. Aunado a ello, los análisis funcionales mostraron que los bacteriomas de la planta y del insecto tienen papeles que potencialmente podrían influir en su interacción. Estos resultados son la primera descripción de los bacteriomas de dicho sistema de estudio, y es un primer paso para evaluar si los efectos recíprocos entre los bacteriomas foliares e intestinales influyen en la interacción planta-insecto.

Los epífitos son una fuente importante de diversidad microbiana para los insectos, de acuerdo con los resultados mostrados en el segundo capítulo, por lo que el capítulo tres se enfocó en ellos. Dicho capítulo es de los pocos estudios que en su diseño experimental considera evaluar el efecto de las comunidades de epífitos en el desempeño del insecto en vez de cepas individuales. Por lo que se muestran los resultados de evaluar empíricamente el efecto de los microorganismos de la superficie de *D. inoxia* en el desempeño del insecto *L. daturaphila*. Como se verá en los resultados, se evaluó el impacto de las comunidades de epífitos en la supervivencia de las larvas, la eficiencia del consumo foliar, la masa de las larvas, consumo foliar total, duración del desarrollo y masa de los adultos. En este sentido, se planteó que los habitantes del filoplano actuarían como una barrera de protección para las plantas. No obstante, contrario a lo esperado, se observó que tienen un efecto positivo en la eficacia del consumo foliar y en la masa de los adultos.

II. Capítulo 1

Efecto de los microorganismos en las interacciones planta-insecto

A partir de la información de este capítulo se publicó el siguiente capítulo de libro:
Mayoral-Peña, Z.; Álvarez-Martínez, R.; Fornoni, J.; Garrido, E. (2020). *The Extended Microbiota: How Microbes Shape Plant-Insect Interactions*. In: Núñez-Farfán, J., Valverde, P. (eds) *Evolutionary Ecology of plant-herbivore interaction*. Springer, Cham. https://doi.org/10.1007/978-3-030-46012-9_7 (ver en el anexo 1)

2.1 Desde la microbiota hasta las interacciones planta-insecto

En los últimos 20 años hemos comprendido mejor el impacto que tienen los microorganismos en la ecología y la evolución de las interacciones planta-insecto. En consecuencia, se han acuñado y adaptado nuevos términos para incluir a los microorganismos, aunque algunos han generado confusión. El término holobionte fue usado por Lynn Margulis (1990) para describir la estrecha relación que había entre un hospedero y su simbiote microbiano. Dicho término inicialmente sirvió para explicar el origen de las células eucariotas aunque después se amplió, pues incluyó a otras simbiosis obligadas (O'Malley, 2017). A principios de este siglo, y bajo el paraguas de la teoría de la evolución del hologenoma, el término holobionte se redefinió como un hospedero (planta o animal) junto con todos sus microorganismos asociados sobre los que puede operar la selección natural (Zilber-Rosenberg & Rosenberg, 2008; Theis, et al., 2016; Rosenberg & Zilber-Rosenberg, 2018). Junto a esta nueva visión de los holobiontes, se anexaron otros conceptos, tal como el de microbiota, que se refiere al conjunto de microorganismos presentes en un huésped definido (Marchesi & Ravel, 2015). A su vez, el microbioma se definió como la suma del huésped, sus microorganismos, sus genomas y las condiciones ambientales circundantes (Marchesi & Ravel, 2015). El hologenoma es delimitado como la suma de la información genética del huésped y su microbiota. Pese a que hay pruebas que respaldan la hipótesis del hologenoma en la evolución, todavía se debate el que el holobionte funcione como una unidad evolutiva (Moran & Sloan, 2015; Douglas & Werren, 2016; Doolittle & Booth, 2017; Doolittle & Inkpen, 2018). Los holobiontes son de hecho unidades en evolución, pero no unidades evolutivas sobre las que la selección natural actúa porque queda en duda la fidelidad en la transmisión de su microbiota. Por lo tanto, un holobionte podría ser visto más como una comunidad ecológica con interacciones que van desde parasitarias hasta mutualistas; con transmisión horizontal, vertical y mixta que implica múltiples niveles de fidelidad de los microorganismos asociados con el hospedero.

La transferencia de la microbiota a través de las generaciones es conveniente que sea considerada en la ecología y evolución de los holobiontes. En

consecuencia, el holobionte tiene microbiota residente (de transmisión vertical), microbiota semi-residente (de transmisión vertical y horizontal) y microbiota transitoria (de transmisión horizontal) (Roughgarden et al., 2018). Si bien los tres tipos de microbiota pueden afectar la adecuación del hospedero (Zakharov, 2015; Hurst, 2017), la microbiota residente sería la más importante en términos evolutivos (Callens et al., 2018; Guégan et al., 2018). En cambio, la microbiota transitoria representa una fuente importante de variación que podría ser relevante en la ecología de los hospederos (Callens et al., 2018; Guégan et al., 2018). En este sentido, es importante mencionar que a pesar de las variaciones espaciales y temporales hay consorcios microbianos que están en la mayoría de los individuos de una población (Lowe et al., 2012; Roeselers et al., 2011; Dougal et al., 2013; Astudillo-García et al., 2017; Kwong et al., 2017). Este grupo de microorganismos se denomina microbiota central (Shapira, 2016), y aunque todavía no existe un consenso claro sobre cómo delimitarla o medirla (Hurst, 2017; Shade & Handelsman, 2012) podría ser útil considerar su función más que su composición.

La relevancia de la microbiota central podría verse al determinar los grupos funcionales, en lugar de los grupos taxonómicos, porque estos últimos no brindan información sobre su contribución al fenotipo del hospedero (Doolittle & Booth, 2017; Foster et al., 2017; Lemanceau et al., 2017). Además, considerar la microbiota central en términos funcionales implica que lo relevante son las funciones, por lo que no importa si hay microorganismos transitorios que llegan o residentes, lo que permanece es la función. Así, la presencia de ciertos linajes microbianos iniciales sería suficiente para permitir el ensamblaje funcional del holobionte (Roughgarden, 2018). Dicha contribución funcional podría mantenerse incluso cuando los microorganismos no tienen una historia evolutiva común con su hospedero (Catania et al., 2017). En última instancia, el fenotipo que expresa un hospedero sería el resultado de las actividades funcionales del hospedero junto con la contribución funcional de sus microorganismos asociados. Por lo tanto, en el contexto de la interacción planta-insecto, es importante comprender los efectos de la microbiota en su hospedero, así como el impacto que tiene en la ecología del hospedero. Si la

presencia/ausencia de linajes específicos en la microbiota afecta la adecuación de la planta, del herbívoro o de ambos, se debe considerar a los microorganismos como jugadores que influyen en la interacción planta-herbívoro.

2.2 Intercambio de microbiotas en las interacciones planta-insecto

La incorporación microbiana en plantas e insectos es dinámica y puede darse vía vertical, horizontal y mixta (Roughgarden et al., 2018). La primera implica el paso de los microorganismos a la siguiente generación por las células germinales (semillas y ovocitos), órganos especializados (bacteriocitos) y/o por la proximidad de los padres con la descendencia (Hurst, 2017). Dentro de este grupo están los simbioses obligados y los facultativos (Moran et al., 2008). Los primeros se caracterizan porque experimentan una reducción extrema de su genoma, su actividad funcional afecta la fisiología de los hospederos y se alojan en órganos especializados (Salem et al., 2015; Moran et al., 2008); por lo que no son capaces de sobrevivir fuera del hospedero (Moran et al., 2008). En cambio los simbioses facultativos pueden actuar como mutualistas, patógenos y/o manipuladores reproductivos (Moran et al., 2008; Russell et al., 2017); y debido a que conservan la mayoría de sus genes son capaces de sobrevivir fuera del hospedero (Moran et al., 2008; Russell et al., 2017). A su vez, los microorganismos de transferencia horizontal son adquiridos por la interacción con el ambiente, así como por la interacción intraespecífica e interespecífica (Moran et al., 2008; Russell et al., 2017).

Los microorganismos de transferencia vertical son los primeros en colonizar a los hospederos, por lo que promueven las condiciones iniciales que favorecen/restringen la llegada de otros microorganismos (Russell et al., 2017; Roughgarden et al., 2018). Algunos de ellos desempeñan funciones que son básicas para la supervivencia de sus hospederos (Moran et al., 2008). Tal es el caso de *Buchnera aphidicola* que aporta a los insectos aminoácidos esenciales que no les proporciona su alimento (el floema) (Moran et al., 2008). En el insecto *Planococcus citri*, se vio que la síntesis de sus aminoácidos estaba regulada por el hospedero y sus simbioses candidatos *Tremblaya prínceps* y *Moranella endobia*

(McCutcheon & Von Dohlen, 2011). Esto muestra que hay una relación intrínseca en donde la participación de más de un interactuante es necesaria para que los hospederos se mantengan. Además del aporte nutricional hay microorganismos de transferencia vertical que están involucrados en los mecanismos de detoxificación (Itoh et al., 2018).

La transferencia horizontal microbiana es constante y resulta del contacto con el ambiente y las interacciones ecológicas de los hospederos (Roughgarden et al., 2018). Por ello, no es de extrañar que plantas e insectos compartan microorganismos, aunque no asegura la permanencia de éstos en el hospedero interactuante (Qian et al., 2018). En el contexto de herbivoría no todos los microorganismos adquiridos vía horizontal serán residentes en el hospedero. Su impacto puede observarse de forma recíproca en la composición de las microbiotas de ambos interactuantes. Por ejemplo, la diversidad y abundancia bacteriana foliar cambia por la presencia de los herbívoros (Humphrey et al., 2014); lo cual podría ser una consecuencia de la interacción de los microorganismos de los herbívoros con los residentes de las hojas. Esto implica que algunos microorganismos de transferencia horizontal que son transitorios podrían desestabilizar temporalmente la microbiota del organismo interactuante. Tal es el caso de la adquisición de patógenos que son capaces de alterar las abundancias de los microorganismos residentes (Fredensborg et al., 2020). De la misma manera, la microbiota intestinal de los insectos cambia con la ingesta de alimento (Chu et al., 2013). Recientemente se ha observado que también los microorganismos adquiridos vía horizontal contribuyen en la capacidad de detoxificación de los herbívoros (Itoh et al., 2018). Esta forma de transmisión representa una fuente potencial de variación genética que puede ser útil en la respuesta de los hospederos ante distintos desafíos bióticos y abióticos (Biere & Tack, 2013; Gupta & Nair, 2020); de tal manera que estos microorganismos son relevantes en el contexto evolutivo cuando logran pasar a las siguientes generaciones con fidelidad y brindan una ventaja en la adaptación (Biere & Tack, 2013; Beran et al., 2019). En consecuencia, los microorganismos adquiridos

vía horizontal pueden influir en la adaptación local de plantas y herbívoros (Tsuchida et al., 2004).

Finalmente, la transferencia mixta se da cuando hay cepas que los hospederos incorporaron vía vertical pero que además están presentes en el ambiente (por ejemplo, en el alimento), y por tanto se refuerza su adquisición en los hospederos (Roughgarden et al., 2018). Además, algunos simbiosntes obligados proporcionan a los hospederos no sólo ventajas nutricionales sino también protección ante condiciones de estrés ambiental (Moran et al., 2008); por lo que estos microorganismos muestran un grado de integración que se ve expresado en el modo de transmisión (Salem et al., 2015). Sin embargo, la relación simbiote obligado-hospedero es el producto de una historia evolutiva. Recordemos que las dinámicas de interacción son un continuo entre los microorganismos y su hospedero, por lo que dependen del tiempo, así que asociaciones que fueron de transmisión horizontal en otro tiempo pueden ser verticales en el presente (Roughgarden et al., 2018).

2.3 La filósfera y el desempeño de los insectos

En las plantas hay asociaciones microbianas desde las raíces hasta sus partes aéreas (tallos, flores, hojas y frutos). Las de las partes aéreas forman la filósfera, que incluye a los que están inmersos en los tejidos (endosfera), así como a los de la superficie (filoplano) (Whipps et al., 2008; Newton et al., 2010; Carvalho & Castillo, 2018). En la endosfera viven los endófitos mientras que en el filoplano están los epífitos (Lindow & Brandl, 2003; Newton et al., 2010; Carvalho & Castillo, 2018). El filoplano foliar concentra la mayor cantidad de microorganismos después del suelo, los cuales se estima que son más de 6.4×10^8 km² (Newton et al., 2010). Éstos pertenecen a distintos grupos taxonómicos, tales como bacterias, hongos, algas, virus, arqueas y, con menos frecuencia, nematodos y protozoarios (Lindow & Brandl, 2003); sin embargo, las bacterias son el grupo más abundante (Dastogeer et al., 2020).

Las hojas son un órgano que se compone de diversas capas. La primera es la epidermis, que se divide en superior e inferior, y está cubierta por una cutícula cerosa (Sivakumar et al., 2020). Cabe señalar que en la epidermis hay células especializadas como los estomas, hidatodos y tricomas (Sivakumar et al., 2020). Además, en la epidermis es donde se localizan los epífitos foliares (Newton et al., 2010). Debajo de la epidermis se encuentra el mesófilo, que está formado por dos tipos de células parenquimatosas: las de empalizada y las esponjosas. En el mesófilo se lleva a cabo principalmente la fotosíntesis y se localizan los tejidos vasculares (Sivakumar et al., 2020). Además, dicho tejido está habitado por los endófitos (Newton et al., 2010).

El establecimiento de los epífitos en la superficie de las hojas implica un reto para los microorganismos debido a que dicho ambiente es inestable por los cambios estacionales, las variaciones de temperatura y humedad e incluso la radiación solar (Dastogeer et al., 2020). Al mismo tiempo la llegada de los epífitos se ve afectada por la topología foliar, la fisicoquímica, la inmunidad de la planta y por ser un ambiente oligotrófico (Schlechter et al., 2019; Dastogeer et al., 2020). Aunado a ello está la competencia entre los microorganismos de la superficie, que modula la llegada de otros microbios (Schlechter et al., 2019), por lo que no todos los que llegan a la superficie de las hojas logran establecerse. En consecuencia, el filoplano tiene epífitos residuales, que son los que superan estos desafíos y se multiplican en ausencia del daño foliar (Suslow, 2002). Por otro lado, los epífitos transitorios están presentes, pero no pueden enfrentar adecuadamente tales desafíos, por lo que no se logran multiplicar o lo hacen muy poco (Suslow, 2002).

Una vez que llegan los epífitos al tejido foliar se distribuyen en distintos sitios de la cutícula, donde se secretan resinas, ceras y compuestos orgánicos de forma heterogénea (Aragón et al., 2017). Por ello, la irregularidad en la secreción de compuestos orgánicos volátiles, así como de nutrientes, afecta la distribución de los epífitos (Whipps et al., 2008; Aragón et al., 2017). En general los epífitos se encuentran en las uniones de la pared epidérmica de las hojas, en los surcos de las venas, en los estomas, en la base de los tricomas, en las espinas e incluso en los

pelos (Whipps et al., 2008). Son lugares en los que las bacterias, una vez establecidas, tienden a agregarse e incluso a formar biopelículas (Aragón et al., 2017). Además, la presencia de los epífitos afecta las características de las hojas y con ello la incorporación de otros microorganismos. Tal es el caso de bacterias, como *Pseudomonas* spp., que liberan tensoactivos que influyen en la permeabilidad de las hojas (Whipps et al., 2008). Por otro lado, existen grupos bacterianos que estimulan la producción de hormonas en las plantas induciendo así la liberación de carbohidratos en determinadas partes de las hojas (Leveau & Lindow, 2001; Miller et al., 2001). Esto demuestra que las interacciones microbianas afectan a su hospedero, así como a la estructura espacial del filoplano.

Las comunidades de epífitos son dinámicas y su estructura es afectada por factores abióticos y bióticos. En cuanto a los primeros factores, son relevantes la lluvia, el viento, el suelo y el pH (Lindow & Brandl, 2003; Dastogeer et al., 2020). Pese a que las plantas tienen un menor control sobre los epífitos que los endófitos, hay características del hospedero que influyen en el establecimiento de éstos (Mina et al., 2020). En lo referente a los factores bióticos, destacan características de las plantas tales como su edad, estado de salud y genotipo (Edwards et al., 2015; Dastogeer et al., 2020; Mina et al., 2020). Las interacciones entre los distintos grupos taxonómicos que forman parte de los epífitos regulan la riqueza y diversidad del filoplano (Schlechter et al., 2019).

Algunos *filas* de epífitos bacterianos que abundan en las plantas son: Proteobacteria, Firmicutes, Bacteroides y Actinobacteria (Newton et al., 2010; Sivakumar et al., 2020). En cuanto a géneros dominantes de bacterias, destacan: *Pseudomonas*, *Methylobacterium*, *Bacillus*, *Sphingomonas*, *Enterobacter*, *Hymenobacter*, *Pantoea*, *Xanthomonas*, *Erwinia*, *Acetobacter* y *Arthrobacter*. Del grupo de los hongos destacan: levaduras, *Aspergillus*, *Fusarium*, *Penicillium*, *Alternaria* y *Cladosporium* (Newton et al., 2010; Sivakumar et al., 2020).

La presencia de los epífitos afecta la fisiología de sus plantas hospederas. Se sabe que estos organismos intervienen en la producción de metabolitos secundarios, la solubilización de fosfato, la fijación de nitrógeno, la producción de

hormonas (ácido indol acético) y la protección contra patógenos; lo cual favorece el crecimiento y desarrollo de las plantas y las protege del estrés abiótico (Hashidoko, 2005; Gnanamanickam & Immanuel, 2006; Poveda, 2021). Aunado a ello, los microorganismos tienen la capacidad de emitir compuestos volátiles que afectan las defensas de las plantas y que pueden atraer o repeler a los herbívoros (Poveda, 2021).

La comunicación planta-insecto puede ser mediada por los epífitos, los cuales atraen o repelen tanto a herbívoros como a parasitoides (Francis et al., 2020). Los microorganismos contribuyen en este contexto mediante la emisión de compuestos volátiles (CVOM) que permiten la comunicación intra- e inter-específica (Poveda, 2021). En general, los CVOM se caracterizan por tener un punto de ebullición entre 50 y 260 °C así como una baja masa molecular (Poveda, 2021). Dentro de los CVOM que afectan la interacción con los insectos se encuentran: alcoholes, cetonas, fenoles, flavonoides, alcaloides, taninos, cumarinas, fenoles, cetonas, terpenoides, aldehídos, mercaptanos y sulfuros de dimetilo (Davis et al., 2013; Poveda, 2021). La emisión de los CVOM por parte de los epífitos afecta la presencia de los insectos herbívoros y sus sitios de oviposición (Davis et al., 2013).

Por otro lado, la interacción planta-herbívoro también promueve la llegada de microorganismos a las hojas (Whipps et al., 2008). De esta forma, algunos insectos actúan como vectores de fitopatógenos mientras que otros transfieren microbios no patógenos (Perilla-Henao & Casteel, 2016). En cuanto a los no patógenos, el insecto *Scaphoideus titanus* transfiere por medio de sus glándulas salivales la bacteria *Candidatus Cardinium* al tejido foliar, lo cual afecta la composición de la filósfera (Gonella et al., 2015). Por otro lado, la presencia del herbívoro *Scaptomyza nigrita*, en la planta *Cardamine codifolia*, aumentó la abundancia del endófito *Pseudomonas syringae* (Humphrey et al., 2014). En cambio, las cepas *Pedobacter spp.* y *Pseudomonas fluorescens* se asociaron negativamente con la presencia *S. nigrita* (Humphrey et al., 2014). Es relevante destacar que en ocasiones no es necesaria la acción de los herbívoros, pues basta el contacto de las heces o el rocío de miel de los insectos con las hojas para afectar las densidades de la filósfera microbiana

(Stadler & Müller, 2000). Por estos motivos, la composición y estructura de la filósfera es afectada por la presencia de los insectos (Gonella et al., 2015; Fredensborg et al., 2020; Humphrey & Whiteman, 2020).

Los herbívoros consumen inevitablemente parte de la filósfera de la planta al alimentarse (Lindow & Brandl, 2003). Lo que más se ha estudiado en dicho contexto es el impacto de los entomopatógenos en los insectos; por lo que se conoce poco acerca del efecto que tienen los no-entomopatógenos, aunque los herbívoros están constantemente expuestos a estos últimos (Shikano et al., 2017). Uno de los efectos que tiene la filósfera en los insectos es la regulación de la composición de la microbiota intestinal; que se ha visto en los insectos *Lymantria dispar*, *Trichoplusia ni* y *Diabrotica virgifera virgifera* (Broderick et al., 2004; Bansal et al., 2011; Chu et al., 2013; Mason & Raffa, 2014). Se ha demostrado que los insectos al alimentarse incorporan algunas cepas de la filósfera (Broderick et al., 2004; Gonella et al., 2015; Pons et al., 2019). En el insecto *Trichoplusia ni* se ha reportado que la presencia de *Shinella*, *Terribacillus* y *Propionibacterium* se vio favorecida al consumir *Arabidopsis thaliana*; lo cual tiene un impacto funcional pues estas bacterias producen enzimas que permiten al hospedero tolerar el glucosinolato (Leite-Mondin et al., 2021). En cambio, cuando *T. ni* se alimentó de *Solanum lycopersicum* los géneros bacterianos más abundantes fueron *Agrobacterium* y *Rhizobium*; los cuales participan en la degradación de alcaloides (Leite-Mondin et al., 2021). Por otro lado, es relevante señalar que ciertas cepas son capaces de reconfigurar la estructura del microbioma intestinal. Esto se observó en el insecto *Sitobion miscanthi*, que al adquirir la bacteria *Hamiltonella defensa* incrementó la abundancia de la bacteria obligada *Buchnera aphidicola*, que participa en la síntesis de aminoácidos esenciales (Qian et al., 2018). Por ello, algunos autores sostienen que esta última bacteria podría actuar como un predictor del microbioma intestinal en los insectos (Mogouong et al., 2021).

La comunicación química planta-insecto también es mediada por la filósfera. En este sentido, los endófitos influyen en las preferencias de los herbívoros (Humphrey et al., 2014). Por ejemplo, los compuestos volátiles que emite el

microorganismo Candidatus *Phytoplasma mali* atraen al herbívoro *Cacopsylla picta* (Mayer et al., 2008). También hay levaduras de la superficie de las hojas que influyen en la puesta de huevos de los insectos (Francis et al., 2020). El efecto de los microorganismos en la preferencia por el alimento a veces es el resultado de la combinación de distintos géneros bacterianos (Peters et al., 2017). Por ello, no es lo mismo exponer a un herbívoro a una única cepa que exponerlo a la combinación de distintos microorganismos (Peters et al., 2017). Entender estos efectos es complejo, por lo que falta realizar estudios en los que se evalúe por separado el efecto de los endófitos y de los epífitos en los herbívoros.

Reconocer el impacto que tiene la microbiota foliar en la fisiología del herbívoro es un aspecto relevante para comprender la interacción planta-insecto. Tal es el caso del desempeño del herbívoro *Lymtria dispar*, que se vio favorecido por la presencia de las bacterias *Ralstonia* y *Acinetobacter* procedentes de las hojas de *Populus tremuloides* cuando había glucósidos fenólicos (Mason et al., 2014). En contraste, las bacterias de la filósfera como *Pseudomonas fluorescens* y *P. syringae* tuvieron un efecto negativo en el desempeño de *Trichoplusia ni*, aunque no afectaron su inmunidad (Shikano et al., 2015). Se ha demostrado que la microbiota foliar tiene un efecto en el desempeño de los herbívoros, pues influye en aspectos como la duración del desarrollo (Freitak et al., 2007), la masa de las pupas (Freitak et al., 2007), el peso y el crecimiento de las larvas (Mason et al., 2014; Shikano et al., 2015) y la descendencia (Olson et al., 2017; Qian et al., 2018).

2.4 La microbiota intestinal y las defensas de las plantas

Aunado al daño foliar durante la herbivoría, las plantas se exponen a exudados tales como el regurgitado o las secreciones orales de los insectos (Sugio et al., 2015; Felton & Tumlinson, 2008; Mason, 2020). El regurgitado proviene de la parte anterior del intestino y tiene elicitores tales como los ácidos grasos conjugados (FAC), inceptinas, calliferinas, auxinas, pectinasas, inhibidores de proteínasa, polifenol oxidasas y la glucosa oxidasa (Hori, 1975; Dyer et al., 1995; Ma et al., 2010; Timilsena & Mikó, 2017). Aunque también se sabe que algunos de ellos, como las

citoquininas, son de origen microbiano (Kaiser et al., 2010; Giron et al., 2017); por lo que la presencia de tales microorganismos influye en la respuesta de defensa de las plantas (Chung et al., 2013; Su et al., 2015; Wang et al., 2016; Acevedo et al., 2017).

El intestino de los insectos está habitado por protistas, hongos, arqueas y bacterias, aunque estas últimas son las más abundantes (Engel & Moran, 2013); además, éste de manera general se divide en: intestino anterior, medio y posterior (Krishnan et al., 2014). Tanto el intestino anterior como el posterior se originan a partir del ectodermo embrionario y se revisten por un exoesqueleto formado por quitina y glicoproteínas cuticulares (Engel & Moran, 2013). Dicho exoesqueleto separa el lumen intestinal de las células epidérmicas y con cada muda se renueva (Engel & Moran, 2013). En cambio, el intestino medio se forma a partir de las células endodérmicas (Engel & Moran, 2013). Por otro lado, las células epiteliales, en algunas especies, llegan a secretar una membrana peritrófica que es lo único que cambia con las mudas (Engel & Moran, 2013). En términos funcionales, el intestino anterior separa temporalmente el alimento, por lo que tiene divertículos. El intestino medio es donde se lleva a cabo la digestión y absorción; y el posterior tiene una serie de pliegues que funcionan como cámaras de fermentación (Schmidt & Engel, 2021).

El establecimiento de los microorganismos en el intestino es complicado debido a que dicho ambiente cambia y, con cada muda, se reemplazan parcialmente las bacterias que están en el intestino anterior y posterior. En el intestino medio lo mismo pasa con la matriz peritrófica (Schmidt & Engel, 2021). Incluso durante el desarrollo hay un cambio abrupto de su composición durante las transformaciones de larva, pupa y adulto en los holometábolos (Engel y Moran, 2013); aunque en algunos insectos hay estructuras intestinales que permiten que permanezcan varios microorganismos aún después de las mudas (Hammer & Moran, 2019). Cabe señalar que cada sección del intestino tiene distintas características fisiológicas, tales como pH y oxígeno, las cuales favorecen la presencia de diferentes consorcios microbianos (Engel & Moran, 2013; Jones et al., 2019; Schmidt & Engel, 2021). Otro

desafío que enfrentan estos consorcios, por ser un ambiente tan dinámico, es la fidelidad en la transferencia de los microorganismos a través de las generaciones (Engel & Moran, 2013).

Además de las características anatómicas del intestino de los insectos, la llegada de nuevos microorganismos es restringida por los residentes debido a que hay competencia por nutrientes y espacio, lo que provoca la secreción de compuestos antimicrobianos (Schmidt & Engel, 2021). Este fenómeno se observó en el insecto *Gilliamella apicola*, donde la presencia de sus bacterias residentes fue suficiente para evitar el establecimiento del patógeno *Crithidia bombi* (Koch & Schmid-Hempel, 2011). La competencia entre los microorganismos intestinales reduce la llegada de nuevos colonizadores al intestino de los insectos (Schmidt & Engel, 2021).

La composición del microbioma intestinal es afectada por: la fuente de alimento, características del hospedero, la región intestinal y las características biogeográficas (Jones et al., 2019). En las orugas de *Lymantria dispar*, *Helicoverpa armigera* y *Pieris rapae* se observó que su microbioma intestinal estaba formado por bacterias tanto del alimento como del ambiente (Broderick et al., 2004; Robinson et al., 2010; Priya et al., 2012); aunque algunas de las bacterias obtenidas por el alimento forman parte del bolo alimenticio y son transitorias (Mason, 2020; Roughgarden et al., 2018). Además, las defensas químicas de las plantas que son ingeridas también repercuten en la composición y estructura de la microbiota intestinal (Mason et al., 2014).

El microbioma intestinal de los insectos no es inocuo, pues tiene un papel funcional en su hospedero (Engel & Moran, 2013). En los herbívoros se ha visto que participa en la protección contra patógenos y parásitos, el aporte de nutrientes, la degradación de compuestos, la detoxificación y la resistencia al estrés abiótico (Jing et al., 2020; Mason, 2020). En términos moleculares se ha visto que el microbioma intestinal influye en algunas vías relacionadas con el metabolismo de carbohidratos, lípidos, vitaminas y aminoácidos (Jing et al., 2020; Mason, 2020; Schmidt & Engel, 2021). Además, produce enzimas que participan en la degradación de polímeros y

compuestos tóxicos (McCutcheon & Von Dohlen, 2011; Chen et al., 2016). Por otro lado, el efecto de la microbiota intestinal se extiende más allá de metabolismo, pues afecta el desarrollo y las capacidades adaptativas de sus hospederos (Fukatsu et al., 2000; Hosokawa et al., 2007; Kikuchi et al., 2007). La microbiota intestinal de *Drosophilla melanogaster* afecta su crecimiento y desarrollo (Shin et al., 2011; Storelli et al., 2011). En el insecto *Brithys crini* es relevante dicha microbiota para las distintas etapas del desarrollo (González-Serrano et al., 2020). El impacto del microbioma intestinal también se observa en la capacidad reproductiva de los insectos, lo cual ocurre en el caso de la avispa *Nasonia* (Brucker & Bordenstein, 2013).

La interacción del insecto con el tejido foliar influye en la composición de la microbiota de la planta (Humphrey et al., 2014; Humphrey & Whiteman, 2020; Smets & Koskella, 2020). La presencia del insecto en la planta *Cardamine cordifolia* afectó la diversidad y abundancia de la microbiota foliar (Humphrey et al., 2014). Este efecto se debe en parte a que la planta adquiere microorganismos del regurgitado del herbívoro (Humphrey et al., 2014; Humphrey & Whiteman, 2020; Smets & Koskella, 2020). Tal es el caso de la mosca del trigo, la cual transfiere sus microorganismos a la planta que ingiere (Bansal et al., 2011). Además del impacto en la composición microbiana, las defensas de la planta responden a la microbiota de los insectos (Hammer & Bowers, 2015; Moran et al., 2019).

En general, el consumo foliar por parte de los herbívoros modifica el metabolismo primario y secundario de la planta. Varios estudios muestran que después del daño, son afectados procesos relacionados con el metabolismo primario como el crecimiento, la fotosíntesis, la asimilación de carbono, la respiración y la reasignación de recursos (Zangerl et al., 2002; Schwachtje & Baldwin, 2008). También se ve afectado el metabolismo secundario, responsable de la producción de defensas químicas (Kessler & Baldwin, 2004). Estos cambios fisiológicos y metabólicos se relacionan con la expresión de los mecanismos de defensa de la planta, donde destacan la tolerancia y la resistencia. La expresión de la tolerancia se relaciona con cambios en el metabolismo primario que permiten que

los genotipos tolerantes reduzcan los efectos negativos de la herbivoría en términos de la adecuación (Fornoni, 2011; Stowe et al., 2000; Strauss & Agrawal, 1999). Por otro lado, la resistencia induce cambios en la producción y abundancia de diversos metabolitos secundarios que previenen o limitan la pérdida de tejido foliar (Fornoni, 2011). El desencadenamiento de cascadas de señalización que producen cambios en ambos metabolismos puede ser iniciado por vías bioquímicas endógenas, que comienzan cuando las células de la planta están dañadas (Mithofer & Boland, 2008), o por elicitores de origen microbiano, que están presentes en el regurgitado de los insectos herbívoros (Felton, 2014).

En cuanto al efecto que tienen los elicitores del regurgitado de los insectos en la tolerancia, está el estudio en plantas de tomate (*Solanum lycopersicum*), donde se mostró que las plantas expuestas al regurgitado de *Manduca sexta* se recuperaron más rápidamente tras un tratamiento de defoliación (Korpita et al., 2014). Esto produjo un aumento en su tasa de crecimiento y la reactivación de los meristemas secundarios (Korpita et al., 2014), probablemente debido a que los metabolitos involucrados en el transporte de carbono y nitrógeno estuvieron en contacto con las células vegetales a través del regurgitado (Steinbrenner et al., 2011). Otros estudios han demostrado que exponer a las plantas al regurgitado de los insectos influye en las características de la planta, pero aún se desconoce la identidad y el origen de los elicitores responsables. Por ejemplo, en la planta de tabaco (*Nicotiana attenuata*) se encontró que el daño causado por la polilla *M. sexta* redujo la tasa fotosintética; sin embargo, al ser consumida por el hemíptero *Tupiocoris notatus*, se demostró un incremento en la tasa fotosintética (Halitschke et al., 2011). Tras revisar la literatura científica, encontramos únicamente un estudio que demuestra que los endosimbiontes intestinales son responsables de la producción de los elicitores mencionados. Este estudio corresponde al caso del lepidóptero *Phyllonorycter blancardella*, en el que sus endosimbiontes (*Wolbachia* spp.) son responsables de la producción de citoquininas que se depositaron en las hojas a través del regurgitado, lo que llevó a la formación de “islas verdes” fotosintéticamente activas en las hojas dañadas (Kaiser, Huguet, Casas, et al.,

2010). Sin embargo, aún está por confirmarse si existe un patrón general donde la microbiota intestinal participa activamente en la producción de compuestos presentes en el regurgitado que desencadene algún rasgo relacionado con la tolerancia.

Se han identificado varios simbioses microbianos que influyen en la respuesta de resistencia de las plantas. Tal es el caso de la bacteria *Hamiltonella defensa*, que es un endosimbionte facultativo de la mosca blanca *Bemisia tabaci* y participa en la supresión del ácido jasmónico (JA) en plantas de tomate (Su et al., 2015). Por otro lado, en la planta de tomate se vio que las larvas del escarabajo de la patata de Colorado (*Leptinotarsa decemlineata*) tenían bacterias en sus secreciones orales que disminuían la producción de JA (Chung et al., 2013). En el mismo sistema de estudio, la aplicación de bacterias aisladas de las secreciones orales de las larvas a las plantas con daño confirmó que los géneros bacterianos *Stenotrophomonas*, *Pseudomonas* y *Enterobacter* eran los responsables de la supresión de las defensas en la planta (Chung et al., 2013).

Los efectos de los simbioses bacterianos sobre la resistencia de las plantas parecen depender del huésped. Por ejemplo, se encontró que los aislados bacterianos de las secreciones orales de *Leptinotarsa juncta* pertenecientes a los géneros *Pantoea*, *Acinetobacter*, *Enterobacter* y *Serratia* suprimieron la actividad de polifenol oxidasa en la planta de tomate no preferida (*Solanum lycopersicum*), mientras que solo *Pantoea sp.* suprimió la misma actividad en la planta de tomate preferida (*Solanum carolinense*) (Wang et al., 2016). Lo cual evidencia el canje entre los caracteres de resistencia mediados por los simbioses bacterianos. La bacteria *Pantoea ananatis*, aislada de la secreción oral de *Spodoptera frugiperda*, reduce la actividad de las proteínas polifenol oxidasa y los inhibidores de tripsina, pero incrementa la actividad de la peroxidasa en la planta de tomate (Acevedo et al., 2017). Incluso hay evidencia de que las defensas químicas de las plantas pueden afectar la composición y estructura de la comunidad microbiana presente en los insectos. En la planta *Populus tremuloides*, los glucósidos fenólicos y los taninos condensados afectaron la abundancia relativa de *Ralstonia* y *Acinetobacter* en el

intestino medio de la polilla *Lymantria dispar* (Mason et al., 2014). En conjunto, estos ejemplos muestran las posibles respuestas entre las comunidades microbianas de insectos y la resistencia de las plantas. Sin embargo, es necesario diseñar estudios futuros que prueben el efecto recíproco entre la microbiota intestinal y las defensas de la planta.

2.5 Redes multicapa e interacciones entre microbiotas

Durante los últimos 20 años, se ha reconocido el valor y la importancia de las redes en una miríada de aplicaciones en biología. Los conceptos y herramientas desarrollados a partir de la teoría de grafos han brindado nuevos conocimientos sobre la ecología evolutiva, así como un marco conceptual valioso para abordar nuevos desafíos. Los conceptos fundamentales, desde los sistemas ecológicos, como las comunidades, hasta las redes de interacciones biológicas entre sus componentes, brindan una manera de resumir grandes cantidades de información dentro de objetos individuales. Quizás, uno de los ejemplos más exitosos de la aplicación de la teoría de redes en biología es la ciencia de las plantas, donde se han identificado reguladores clave, módulos funcionales y fenotipos novedosos a través de redes reguladoras de genes (Álvarez-Buylla et al. 2007). En el campo de la evolución microbiana, la teoría de redes se ha utilizado para identificar nuevos objetivos para los tratamientos con probióticos (Lemon et al. 2012), encontrar los factores bióticos y abióticos más influyentes que cambian la estructura de la comunidad microbiana (Fisher y Mehta 2014), y distinguir las propiedades topológicas de las redes microbianas entre estados de salud y enfermedad (Sánchez et al. 2017; Sommer et al., 2017). Las redes microbianas constituyen así una herramienta heurística que podría ayudarnos a modelar y comprender la complejidad de las interacciones dentro de la microbiota y entre las microbiotas de los huéspedes que interactúan.

En general, las redes ecológicas se pueden dividir en estáticas o dinámicas. Las redes estáticas se centran en el estudio de sus propiedades topológicas: medidas de centralidad (la importancia relativa de los nodos, representando cada

nodo un microorganismo en particular), la distribución de enlaces a otros nodos (distribución de grados), la identificación de módulos o grupos, y la búsqueda de sobrerrepresentados o subgrafos recurrentes (motivos).

Este tipo de redes son útiles porque toman en cuenta cualquier dependencia binaria entre los elementos, es decir, la presencia ausencia de interacciones entre especies. Las redes ponderadas son una generalización de las redes estáticas, agregando a los bordes una medida de la relevancia o certeza de sus vínculos. Este valor puede ser representado por la frecuencia o la fuerza de las diferentes interacciones. Por otro lado, las redes dinámicas o en evolución representan no solo la especie (es decir, los microorganismos) y la topología/fuerza de las interacciones, sino también la naturaleza dinámica de todo el sistema (es decir, el holobionte). Sin embargo, este tipo de redes son más difíciles de inferir a partir de datos empíricos porque necesitan una información detallada y específica que casi nunca está disponible. Debido a que las redes estáticas son mucho más fáciles de obtener a partir de datos, la gran mayoría de las redes ecológicas pertenecen a este tipo.

En los estudios de microbiomas, se han adaptado y combinado enfoques particulares para inferir redes de co-ocurrencia de OTU, redes de interacción y un nuevo enfoque de redes múltiples que involucra redes de microorganismos con su hospedero. En un artículo seminal, Gould y colaboradores (2018) mapearon las interacciones entre especies individuales de bacterias contra varios rasgos de aptitud física de sus anfitriones, la mosca de la fruta. Demostraron que las mismas interacciones bacterianas que dan forma a la abundancia microbiana en la microbiota también determinan la fecundidad de las moscas. En un estudio reciente, Huitzil et al. (2018) propusieron un modelo evolutivo computacional en el que una red que representa al hospedero puede adaptarse para realizar una función predefinida relacionada con su hospedero. En este modelo, la red del hospedero interactúa con su red microbiana y estas complejas interacciones son capaces de explicar la presencia de disbiosis, especialización y diversidad microbiana.

Uno de los objetivos más importantes en las redes microbianas es identificar los llamados taxones clave en las comunidades microbianas y determinar los

factores que influyen en su función en un entorno determinado. Los taxones dominantes pueden ser los más abundantes o los más importantes, estructuralmente hablando, en términos de la topología de la red. En un ejemplo extraordinario, Flores et al. (2013) observaron que las redes complejas entre hospedero y parásito o entre bacterias y fagos son al mismo tiempo, pero a diferentes escalas, modulares y anidadas. Esta observación sugiere que diferentes regímenes evolutivos operan a diferentes escalas. El siguiente paso natural sería integrar varias capas de información a través de múltiples redes únicas. Este enfoque se denomina redes multicapa o multiredes y podría definirse como una amalgama de redes que interactúan y evolucionan entre sí (Bianconi 2018).

La red multicapa aplicada a holobiontes completos y a las interacciones entre holobiontes podría ser una herramienta extremadamente valiosa para comprender las interacciones entre microbios, insectos y plantas. Cada una de estas redes (red de microbiota vegetal y red de microbiota de insectos) formará entonces una meta-red, que sin duda será un enfoque más realista para el estudio de las interacciones ecológicas entre holobiontes. Por lo tanto, las redes multicapa tienen el potencial de tener en cuenta interacciones multitróficas.

2.6 Experimentación en las interacciones microorganismo-insecto-planta

Hasta la fecha, la mayoría de los estudios sobre las interacciones microorganismo-insecto-planta se han centrado en la descripción de las microbiotas de las especies multicelulares como posibles fuentes de regulación ambiental. Una de las principales suposiciones detrás de estos estudios es que los microorganismos afectan directamente la supervivencia, el desempeño y la adecuación de sus hospederos, así como las interacciones entre los hospederos y otros miembros de la comunidad. La evidencia correlativa respalda esta premisa, pero aún no ha identificado el papel funcional de la mayoría de los linajes microbianos. Si los microorganismos tienen el potencial de regular la dinámica ecológica y evolutiva entre plantas e insectos, entonces nuestros esfuerzos

tecnológicos para reducir o controlar los niveles de herbivoría no deberían descuidar los efectos de los microorganismos. Las plagas generalmente se controlan con el uso de insecticidas y/o cultivos genéticamente modificados, mientras que la manipulación de microorganismos dentro de plantas o insectos aún está poco desarrollada. Destacamos dos aproximaciones experimentales que pueden arrojar luz sobre el papel funcional de los microorganismos en el contexto de una interacción planta-insecto. En primer lugar, hacer experimentos de infección cruzada (es decir, trasplantes recíprocos) de microorganismos de diferentes poblaciones hospederas o condiciones ambientales puede proporcionar información relevante sobre su papel en la coadaptación entre plantas e insectos. Este tipo de experimentos también son fundamentales para diferenciar la importancia relativa de la selección natural y la deriva genética en la conformación y función de las comunidades microbianas. En segundo lugar, estarían los experimentos donde se manipula la composición de la microbiota, ya sea por la presencia/ausencia o la abundancia relativa de ciertos microorganismos, así se podría identificar el papel funcional en la interacción planta-insecto. Estas aproximaciones experimentales, entre otras, podrían demostrar si la comprensión y la manipulación de plantas e insectos requieren el reconocimiento de que la evolución de la interacción depende no solo de la genética de plantas e insectos dentro de un contexto ambiental específico, sino también del microbioma.

III. Capítulo 2

El estudio de las interacciones planta-insecto a través de sus bacteriomas

A partir de la información de este capítulo se publicó el siguiente artículo:

Mayoral-Peña, Zyanya, Víctor Lázaro-Vidal, Juan Fornoni, Roberto Álvarez-Martínez, and Etzel Garrido (2023). Studying Plant–Insect Interactions through the Analyses of the Diversity, Composition, and Functional Inference of Their Bacteriomes *Microorganisms* 11, no. 1: 40.

<https://doi.org/10.3390/microorganisms11010040> (ver en el anexo 2)

3.1 Introducción

Las plantas y sus insectos herbívoros interactúan en un medio microbiano que permite el intercambio constante y recíproco de todos los microorganismos asociados con ambas especies (Felton & Tumlinson, 2008; Sugio et al., 2015; Mason, 2020; Mayoral-Peña, et al., 2020). Debido a que la presencia de todos estos microorganismos no es inocua, sus efectos se extienden a la ecología y evolución de sus huéspedes, así como a sus interacciones ecológicas (Felton & Tumlinson, 2008). De hecho, en los últimos años se han publicado excelentes revisiones sobre las implicaciones ecológicas y evolutivas de los microorganismos en las interacciones planta-insecto (Biere & Tack, 2013; Wielkopolan & Obrępalska-Stęplowska, 2016; Mason et al., 2018; Grunseich et al., 2020). Sin embargo, la mayoría de los estudios hasta la fecha se ha centrado en describir la microbiota dentro de huéspedes multicelulares individuales, ya sean plantas o insectos. Todavía no se ha identificado el papel funcional de la mayoría de los linajes microbianos. Aquí, nuestro objetivo es ampliar nuestra comprensión de las interacciones planta-insecto estudiando simultáneamente sus bacteriomas para evaluar posibles patrones de coabundancia entre las cepas bacterianas que pertenecen al microbioma central de ambos organismos y que podrían ser importantes en la interacción.

En general, la microbiota se refiere a todos los microorganismos asociados con un huésped determinado y está compuesta por diferentes grupos taxonómicos, como bacterias, hongos, algas, virus, arqueas y, con menor frecuencia, nematodos y protozoos (Lindow & Brandl, 2003; Engel & Moran, 2013). Sin embargo, tanto en las plantas como en los insectos herbívoros, el grupo más abundante es el de las bacterias (Engel & Moran, 2013; Dastogeer et al., 2020), por lo que se prefiere el término bacterioma cuando se caracteriza solo a los grupos bacterianos (Hopson et al., 2020). Los microorganismos asociados con las partes aéreas de una planta constituyen la filósfera, que se puede clasificar en endosfera (microbios que residen dentro del tejido) y filoplano (microbios que residen en la superficie) (Newton et al., 2010; Carvalho & Castillo, 2018). A su vez, los microorganismos que residen dentro

de los tejidos de un insecto se denominan endógenos, mientras que los que se encuentran en la superficie de sus cuerpos son microbios exógenos (Rosenberg & Zilber-Rosenberg, 2016). Estudios recientes han descrito la microbiota asociada con plantas e insectos, pero al evaluar sus efectos potenciales, los mismos estudios solo se han centrado en una de las especies que interactúan (Hannula et al., 2019; Višňovska et al., 2020; Mogouong et al., 2021). Es decir, el papel de los microorganismos se ha estudiado tradicionalmente en términos de sus efectos sobre la supervivencia y adaptación de cada huésped, pero no en términos de comprensión de la interacción ecológica entre los huéspedes. Si los efectos recíprocos entre los bacteriomas foliares e intestinales tienen el potencial de dar forma a las interacciones planta-insecto (Tsuchida et al., 2004; Salem et al., 2020; Santos-Garcia et al., 2020; Zhang et al., 2020), se debe considerar un nuevo jugador como parte de la arena coevolutiva. Por lo tanto, estudiar posibles asociaciones e interacciones entre los bacteriomas de plantas e insectos podría ayudarnos a comprender la ecología y la evolución de la interacción.

La filósfera es, en algún momento, inevitablemente consumida por insectos fitófagos. La evidencia reciente sugiere que las bacterias de la filósfera pueden colonizar el intestino de los insectos (Broderick et al., 2004; Priya et al., 2012; Mason & Raffa, 2014; Jones et al., 2019), convertirse en parte de la microbiota intestinal transitoria (Dillon & Dillon, 2004; Mason & Raffa, 2014) y afectar la supervivencia y el desempeño de los insectos (Mason et al., 2014; Shikano et al., 2015; Yoon et al., 2019; Zhang et al., 2020b) al facilitar la desintoxicación y la adquisición de nutrientes (Engel & Moran, 2013; Itoh et al., 2018; Santos-Garcia et al., 2020). La mayor parte de la microbiota intestinal transitoria proviene del tejido foliar consumido y generalmente se excreta por las heces (Gupta & Nair, 2020). Por lo tanto, la composición de la microbiota intestinal puede verse afectada por la fuente de alimento, el genotipo del huésped, la composición de la microbiota del huevo y la región biogeográfica en la que habita (Robinson et al., 2010; Priya et al., 2012; Blankenchip et al., 2018; Lü et al., 2019). De hecho, se ha sugerido que la dieta juega un papel relevante en la composición de la microbiota intestinal de varios

insectos (Hannula et al., 2019; Garcia et al., 2020; Višňovska et al., 2020; Leite-Mondin et al., 2021). A su vez, se ha demostrado que la microbiota intestinal influye en el patrón y la intensidad del daño foliar (Frago et al., 2012; Sugio et al., 2015), así como la diversidad y composición de la filósfera (Humphrey et al., 2014; Humphrey & Whiteman, 2020) a través de la incorporación de algunos microbios asociados a insectos por parte de la planta (Caspi-Fluger et al., 2012; Pons et al., 2019). Además, el bacterioma intestinal puede alterar la expresión de supuestos mecanismos de defensa de las plantas (Kaiser et al., 2010; Wang et al., 2016; Chung et al., 2017). Se ha demostrado que la microbiota asociada a las secreciones orales de los insectos reduce los niveles de defensas inducidas de las plantas, favoreciendo la ingesta de alimento (Felton & Tumlinson, 2008; Sugio et al., 2015). Por lo tanto, los microorganismos pueden alterar la expresión de rasgos de plantas e insectos involucrados en sus respuestas evolutivas recíprocas. Después del consumo, las heces de insectos pueden entrar en contacto con la superficie de las hojas y se ha demostrado que ciertas cepas bacterianas pueden transferirse de manera efectiva a la superficie de las hojas o plantas vecinas (Lilley et al., 1997). Queda por probar si este tipo de transferencia de la filósfera es posible a través del contacto con las heces (pero véase (Chrostek et al., 2017)).

El objetivo del estudio fue triple. Primero, describir y comparar la diversidad y composición del bacterioma asociado con las semillas y las hojas de la planta huésped *Datura innoxia* y el bacterioma asociado con los huevos, el intestino y las heces de su insecto especialista, *Lema daturaphila*. Dada la naturaleza de la interacción, planteamos la hipótesis de un alto grado de superposición en la composición de ambos conjuntos de bacteriomas porque el tejido foliar, junto con todos los microorganismos asociados, es necesariamente consumido por las larvas. Sin embargo, se esperan diferencias en la abundancia de esas cepas bacterianas compartidas. En segundo lugar, determinar las inferencias funcionales de las familias bacterianas más abundantes. Finalmente, evaluar los patrones de coabundancia y analizar la dinámica espacial de ambos conjuntos de bacteriomas siguiendo un enfoque de red multicapa. Hasta donde sabemos, este es el primer

intento de caracterizar la diversidad, los patrones de coabundancia y la dinámica espacial de los bacteriomas asociados con ambos huéspedes para arrojar luz sobre su interacción ecológica.

3.2 Hipótesis y objetivos

3.2.1 Hipótesis

Durante la fitofagia el insecto *L. daturaphila* es expuesto a la filósfera de *D. inoxia*, siendo una de sus fuentes principales de adquisición de microorganismos desde que eclosiona. De la misma manera la planta al ser consumida se expone a los microorganismos del intestino del insecto mediante el regurgitado. Esto implica que en ambos sentidos hay un constante intercambio microbiano. Por lo que se planteó que los bacteriomas de la planta y el insecto serían similares en composición aunque habría diferencias en sus abundancias. A su vez, debido a que la herbivoría se desarrolla en medio de la carrera armamentista entre planta-insecto, se esperó que algunas funciones de los bacteriomas estuvieran involucradas en las defensas y contra defensas de plantas e insectos.

3.2.2 Objetivos

- Identificar con análisis genómicos a las comunidades bacterianas asociadas a semillas y hojas de *D. inoxia*, así como a aquellas asociadas a huevos, intestino y heces del insecto *L. daturaphila* en una población de El Marqués, Querétaro.
- Describir y comparar la diversidad y composición de los bacteriomas de *D. inoxia* (semillas y hojas) y de *L. daturaphila* (huevos, intestino, heces).
- Determinar el papel funcional que podrían tener los bacteriomas de la planta y el insecto mediante análisis funcionales.
- Evaluar los patrones de coabundancia y analizar la dinámica espacial de los bacteriomas de la planta y el insecto de acuerdo con un enfoque de red multicapa.

3.3 Material y métodos

3.3.1 Colecta y procesamiento de las muestras

Todas las muestras biológicas utilizadas en este estudio se colectaron en una población natural en el municipio de El Marqués, Querétaro, México (20.66° N, 100.32° O). En los meses de agosto y septiembre de 2019 se obtuvieron las siguientes muestras: diez hojas sin daño y cinco frutos sin madurar de cada una de las cuatro plantas sanas seleccionadas, así como todos los huevos y larvas de los estados de desarrollo encontrados en las mismas plantas y plantas vecinas. Tales muestras se mantuvieron en hielo y se llevaron al laboratorio para su procesamiento.

En una campana de flujo laminar, se recuperaron los epífitos de las hojas mediante lavados seriales que incluyeron: buffer para remoción de epífitos (6.75 g de KH_2PO_4 , 8.75 g de K_2HPO_4 y 1 mL de Triton X-100 por litro, 1 minuto) seguido por una solución de NaCl al 0.9% (1 minuto). Ambas soluciones se mezclaron y se centrifugaron a 10, 000 rpm durante 3 minutos. Se removió el exceso de sobrenadante y se almacenó el pellet (epífitos) a -80°C hasta que se hizo la extracción de ADN. Para la obtención de endófitos, después de los lavados previamente mencionados, el tejido foliar se expuso a otra serie de lavados: etanol al 70% (2 minutos), hipoclorito de sodio al 10% (1 minuto) y cuatro lavados finales con agua estéril (2 minutos cada uno) (modificado de (Desgarenes et al., 2014)). El tejido foliar que se procesó para la obtención de los endófitos fue de 580 mg de hojas por planta. Para validar nuestro procedimiento de eliminación de epífitos, las hojas sometidas al tratamiento se usaron para inocular la superficie de una placa de Petri con medio TSA (agar Triptona-Soja). Las placas se incubaron a 28°C y se revisaron durante un mes para verificar la ausencia de crecimiento microbiano. Por otro lado, las semillas también se expusieron a los lavados previamente mencionados para la remoción de sus epífitos. Aunque en este caso no se procesaron los epífitos recuperados de las semillas. Después de los lavados se removió manualmente el tegumento de las semillas y se usaron aproximadamente

270 mg de semillas sin cubierta, que se mantuvieron a -80 °C hasta que se hizo la extracción de ADN. Cabe señalar que se procesaron cuatro réplicas biológicas para cada tipo de muestra.

Para asegurar que las muestras de insectos no estuvieran parasitadas, se inició una colonia con los huevos y larvas colectados en campo que se mantuvieron en condiciones de laboratorio (fotoperiodo 12L:12O, 25 °C, alimentados con plantas de la misma población, sin presencia de parasitoides o patógenos). Una vez que hubo suficientes huevos en la colonia (finales de octubre), se colectaron cuatro muestras biológicas, cada una de las cuales correspondió a tres o cuatro grupos de huevos (aproximadamente cincuenta huevos en total). Para eliminar a los exógenos, los huevos se dejaron en tubos de 1.5 ml y se lavaron con Microdacyn (OCULUS, Sodio < 55 ppm y Cloro < 80 ppm) durante 15 minutos y con agua estéril por 30 minutos. Previo a la disección de las larvas, los microbios exógenos fueron eliminados siguiendo el procedimiento mencionado con anterioridad para la remoción de epífitos. Se diseccionó a los intestinos completos de larvas de tercer y cuarto estadio. Todas las disecciones se hicieron en una campana de flujo laminar. Cuatro muestras biológicas se procesaron, cada una compuesta por alrededor de diez a quince intestinos. Finalmente, durante octubre, se juntaron diariamente todas las heces producidas por larvas del cuarto estadio. Diariamente se colectaron las heces de la parte posterior del cuerpo de las larvas con palillos estériles hasta que se obtuvieron aproximadamente 250-300 mg por réplica biológica. El número de réplicas fue de cuatro.

3.3.2 Extracción de ADN y generación de amplicones de ARNr 16S

Para la extracción del microbioma del pellet de epífitos foliares se usó el *kit blood & tissue de DNeasy* (QIAGEN, Germantown, MD, EE. UU.) siguiendo las instrucciones del fabricante. Las muestras de endófitos fueron maceradas en nitrógeno líquido y después se procesaron con el *kit DNeasy PowerSoil* (QIAGEN, Germantown, MD) siguiendo las instrucciones del fabricante. Los huevos sin exógenos y los intestinos se maceraron en nitrógeno líquido. La extracción del microbioma de los huevos se

realizó de acuerdo con el protocolo descrito por Karpen (Karpen, 2009). El microbioma de los intestinos se extrajo con el *kit Blood & Tissue DNeasy* (QIAGEN, Germantown, MD) siguiendo las instrucciones del fabricante. Finalmente, se hicieron ligeras modificaciones del procedimiento IHMS descrito en el protocolo de Fiedorová y colaboradores para la extracción del microbioma de las muestras de heces (Fiedorová et al., 2019). En todas las muestras se secuenció la región hipervariable v3-v4 del gen 16S rRNA, donde se consideró 2 × 250 pb en la plataforma Illumina Miseq. La secuenciación se llevó a cabo en el Instituto Nacional de Medicina Genómica (INMEGEN) en México.

3.3.3 Análisis de datos

Los análisis estadísticos, bioinformáticos y los gráficos se hicieron con R y sus librerías (R Core team). Las secuencias se procesaron siguiendo el pipeline de DADA2 (Callahan et al., 2017). Debido a la calidad de las secuencias se decidió utilizar únicamente las del sentido *forward*. El umbral de calidad Phred elegido fue ≥ 20 con longitud de 230 pb. La identificación taxonómica se hizo con la base de datos Silva 16S rRNA (versión 138 (Quast et al., 2013; Yilmaz et al., 2014)). La estimación de la diversidad de los microbiomas se hizo con el perfil Rényi del paquete *vegan* v. 2.5 –7 (Oksanen et al., 2020) y los resultados se graficaron con *ggplot2* v. 3.3.2. De acuerdo con el perfil de Rényi, cuando el valor de alfa tiende a 1, 2 e infinito se comporta como el índice de diversidad de Shannon-Weaver, el logaritmo del índice de diversidad lo hace como el recíproco de Simpson y el índice de diversidad de Berger-Parker, respectivamente. Por ello, cuando en el perfil de Rényi una muestra tiene una pendiente mayor, se considera más diversa. En cambio, los perfiles horizontales sugieren que las especies se distribuyen con menor equidad. A partir de los perfiles de Rényi se comparó el índice de diversidad de Shannon y los valores de riqueza de las diferentes muestras mediante un análisis de ANOVA. La diversidad filogenética de las muestras se estimó utilizando el paquete *picante* v. 1.8.2 (Kembel et al., 2010). Para visualizar las posibles diferencias entre las comunidades bacterianas, se hizo un RDA que consideró las

distancias de Bray-Curtis (Bray & Curtis, 1957). Para ello se hizo una transformación logarítmica de los datos, y luego un análisis PERMANOVA. Las abundancias bacterianas de las muestras se compararon con la prueba paramétrica de Wald utilizando la función DEseq2 del paquete phyloseq v. 1.32.0 (McMurdie & Holmes, 2013). El análisis de inferencia funcional consideró únicamente los ASVs (Variante de secuencia del Amplicón) con abundancias superiores al 10% y para ello se usó el paquete tax4fun2 v. 1.1.5 (Wemheuer et al., 2018). Las diferencias en las categorías funcionales entre las muestras se probaron con un análisis de ANOVA.

Finalmente las redes de co-abundancia se infirieron y construyeron siguiendo un enfoque de red multicapa utilizando los paquetes igraph (Csardi et al., 2006) y MuxViz (De Domeico et al., 2015). En una red multicapa, las co-abundancias se representan mediante bordes que conectan nodos, que representan las especies individuales de la comunidad. El grosor de los bordes representa la fuerza de la relación de co-abundancia entre las especies, donde los bordes más gruesos indican una relación más fuerte. Este tipo de red puede ser útil para visualizar las relaciones entre especies en una comunidad microbiana y para identificar posibles interacciones o correlaciones entre ellas. En general, el estudio de las co-abundancias en una red multicapa puede proporcionar información valiosa sobre las complejas interacciones dentro de una comunidad microbiana. Ambas redes se dedujeron de las tablas de abundancias utilizando SparCC y SPIEC-EASI del paquete R de SpiecEasi (Kurtz et al., 2015). SparCC (Sparse Correlations for Compositional data) estima las correlaciones lineales de Pearson entre los componentes transformados logarítmicamente de la tabla de abundancia, representados como nodos en la red. El algoritmo no supone que los datos deban tener una distribución normal y es muy robusto con respecto a la suposición de que la interconectividad es escasa (Friedman y Alm, 2012). Por otro lado, SPIEC-EASI (SParse Inverse Covariance Estimation for Ecological Association Inference) estima la red de interacción por selección de vecino más cercano o por selección de covarianza inversa dispersa, asumiendo que la interconectividad entre nodos es baja. Este método evita la detección de correlaciones indirectas (Kurtz et al., 2015).

Las redes se colorearon a nivel de phylum antes de agregarlas a las redes multicapa usando el paquete MuxViz.

3.4 Resultados

3.4.1 La composición y diversidad de los bacteriomas de la planta y el insecto

Se procesaron 21 muestras de las cuales se analizaron 84,444 secuencias de lectura filtradas y de alta calidad. A partir de ellas se obtuvieron 3,021 ASV, con una mediana de 3,452 lecturas y 146 ASV por muestra (Tabla 1). Las categorías taxonómicas que se identificaron a partir de las secuencias de ASV fueron: 100 % para filo, 99.37% para clase, 94.25% para orden, 88.91% para familia y 69.98% para género. Después de eliminar los cloroplastos y las mitocondrias se redujo el número de lecturas promedio en las muestras de endófitos foliares de 11859.5 a 1.75; en semillas fue de 12467.5 a 817 (Tabla 1, Figura 1). Por lo tanto, estas muestras no fueron incluidas en los análisis donde se comparó la diversidad y abundancia de las comunidades bacterianas.

Tabla 1. Resumen de secuencias y ASVs analizadas por muestra

Samples	input	filtere d	denoisedF	nonchi m	#read s	#AS V	\bar{x} ASV
seeds1	37483	12836	12801	11622	5	5	
seeds2	36103	12748	12680	11235	3262	32	
seeds3	40324	15056	14981	13749	0	0	
seeds4	45385	14652	14617	13264	1	1	9.5
f_epiphytes1	40592	12671	12215	10849	4098	266	
f_epiphytes2	37271	12128	11466	10688	3345	217	
f_epiphytes3	33386	11242	10857	9908	3985	247	
f_epiphytes4	31849	8718	8041	7473	3452	294	256
f_endophytes1	32208	13081	13071	12247	2	2	
f_endophytes2	35438	12349	12332	11558	2	2	
f_endophytes3	40358	13869	13857	12954	0	0	

f_endophytes4	31146	11292	11284	10679	3	3	1.75
egg1	35702	12749	12408	11100	6035	264	
egg2	29761	9033	8929	7976	5450	215	
egg3	27033	10246	10141	9211	3828	232	237
gut1	41745	14095	14011	13491	1870	100	
gut2	45994	16286	16204	15795	873	123	
gut3	46433	15735	15669	14647	8589	124	
gut4	37873	13081	13038	11669	10431	146	123.25
frass1	34608	11589	11501	9540	8644	192	
frass2	27645	9529	9441	7894	7107	181	
frass3	27644	9625	9545	8051	6543	193	
frass4	31103	9698	9632	8613	6919	182	187

De acuerdo con la diversidad de Rényi, las muestras más diversas fueron las de epífitos foliares (Figura 3A), mientras que las comunidades bacterianas asociadas a intestino y heces presentaron sobre todo ASVs dominantes (Figura 3A). El rango observado de ASVs totales en la diversidad alfa fue de 100 a 294, para el índice de Shannon de 3.02 a 5.09 y para el índice Faith PD de 1.89 a 10.24 (Figura 3B-D). La riqueza ($p < 0.0001$) y la diversidad ($p = 0.0017$) de las muestras de intestino fue significativamente menor al compararlas con las de los otros tejidos (Figura 3B). Además, la comunidad bacteriana asociada al filoplano tuvo los mayores valores en el índice Faith PD y en el número de taxones así como los menores valores en abundancias ($p < 0,0001$) (Figura 3D). En contraste, las muestras de intestino y heces presentaron una diversidad más baja (Figura 3D), siendo *Serratia* el género dominante en intestino y *Pseudomonas* en las heces (Figura 4).

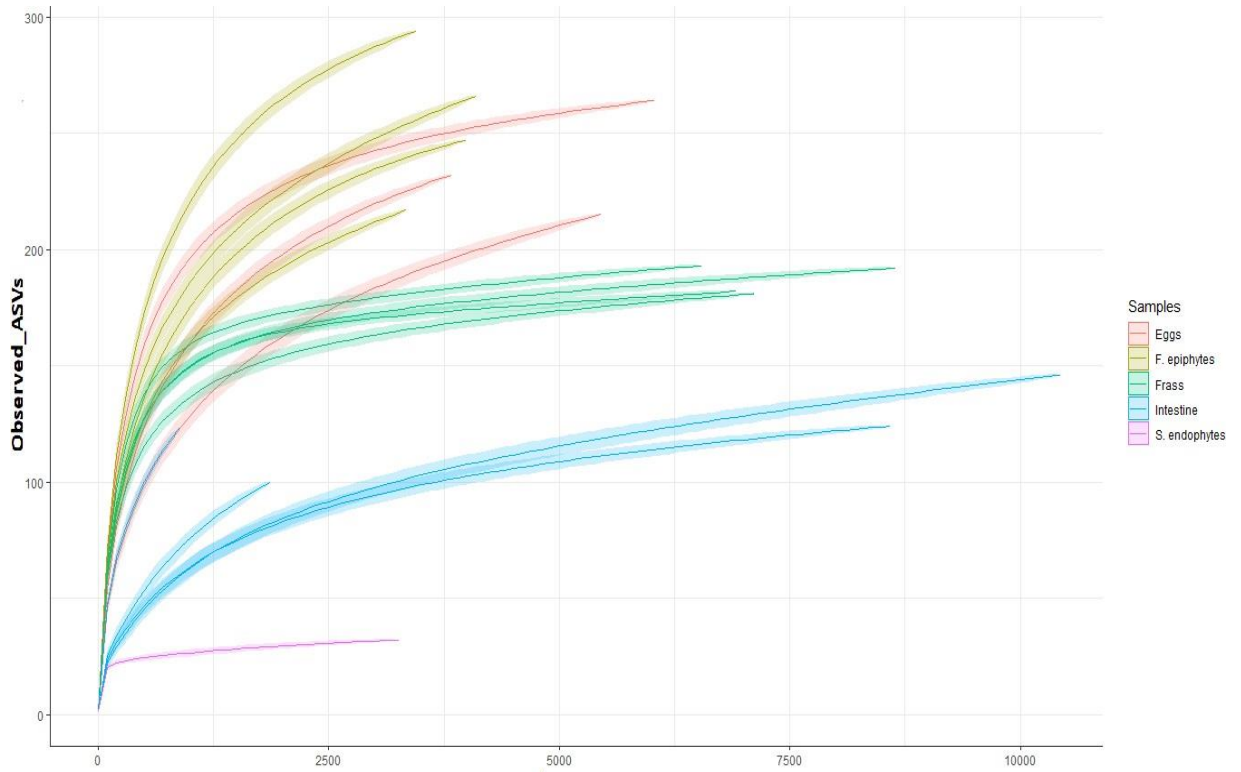


Figura 2. Curvas de rarefacción de las ASV detectadas en las 11 muestras de insectos y las 5 muestras de plantas. Debido a las pocas ASV identificadas en las muestras de endófitos de semillas y foliares se descartaron del análisis y sólo se conservó una muestra de semillas.

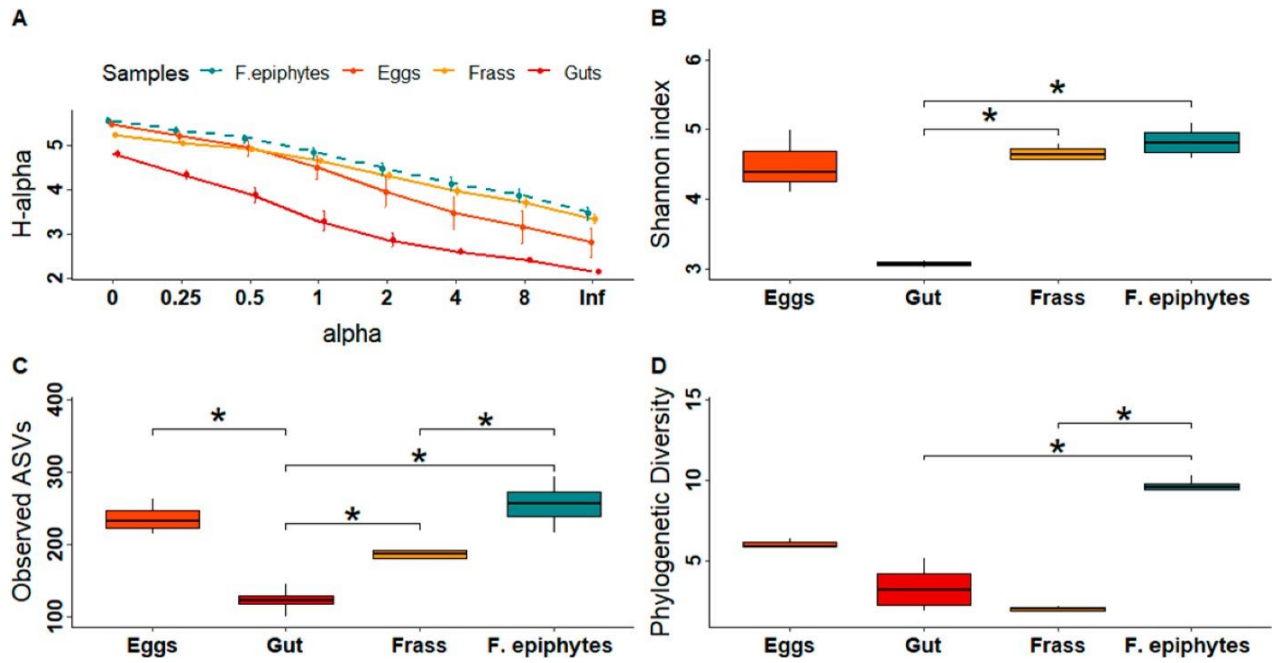


Figura 3. Distribución de la diversidad alfa en muestras de la planta *D. inoxia* y de su insecto especialista *L. daturaphila*. (A) Comparación de los perfiles de Rényi de las comunidades bacterianas considerando el número total de ASV. Los valores alfa de 0, 1, 2 e infinito corresponden a la riqueza de especies, índice de diversidad de Shannon, logaritmo del índice recíproco de diversidad de Simpson y el índice de diversidad de Berger-Parker, respectivamente. (B) Riqueza. (C) Índice de Shannon. (D) Diversidad filogenética. Las muestras de semillas y endófitos no se incluyeron en este análisis, debido a la baja cantidad de ASV identificados. Los asteriscos indican diferencias significativas de acuerdo con la prueba de ANOVA ($p < 0.05$).

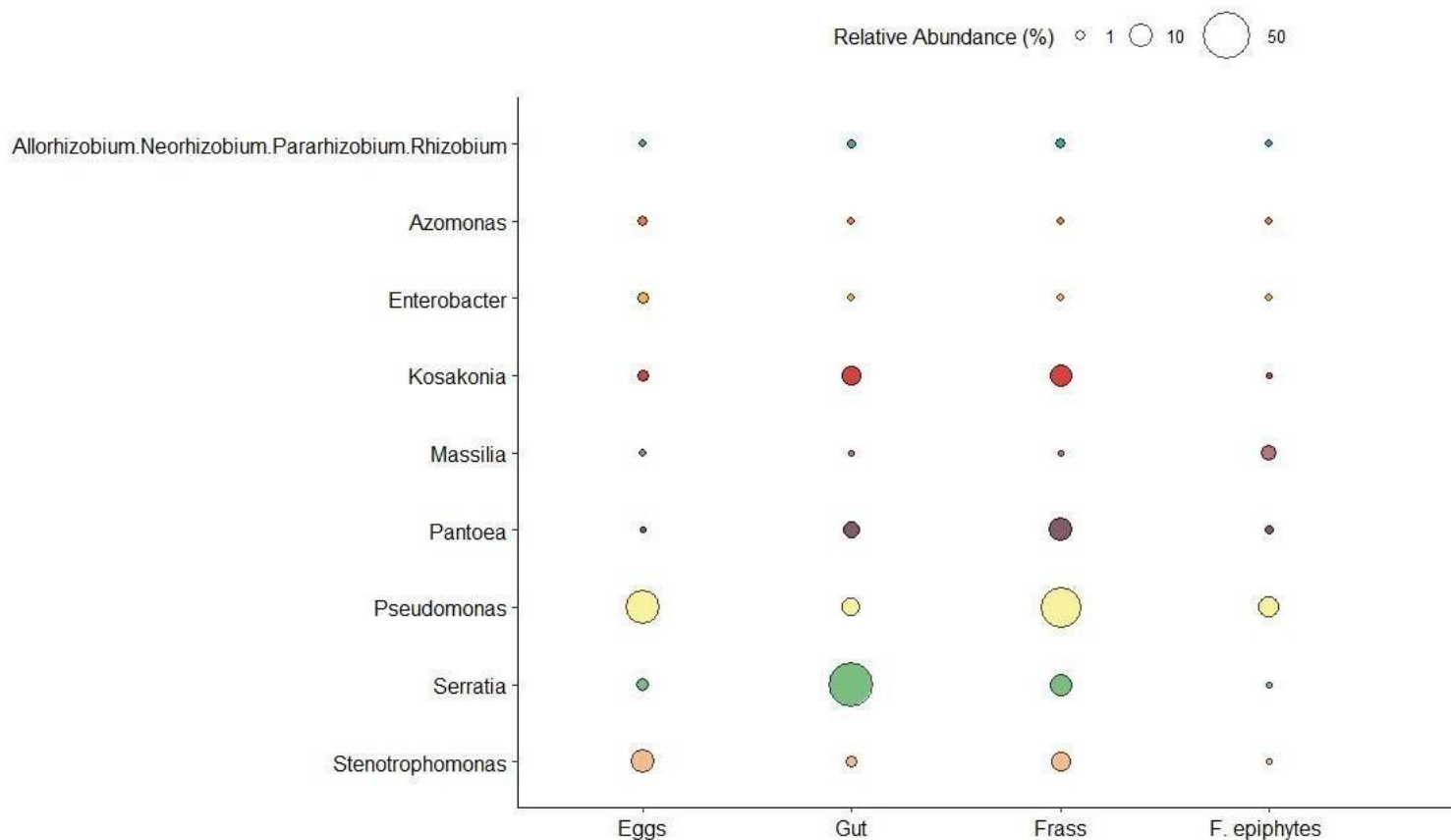


Figura 4. Abundancias relativas de algunos géneros compartidos entre el insecto (huevos, intestinos, heces) y la planta (epífitos foliares) en donde las diferencias fueron significativas de acuerdo con la prueba paramétrica de Wald. ASVs compartidos con abundancias mayores a 0.1%.

Los filos más abundantes identificados en las muestras de plantas fueron Proteobacteria (71.1%), Actinobacteria (17.3%), Firmicutes (0.44%) y Bacteroidetes (6.57%). A nivel de género se identificaron ocho en los endófitos de semillas, ochenta y cinco en epífitos foliares y seis en endófitos foliares. En particular, los géneros más abundantes en las muestras de endófitos de semillas fueron *Serratia* (40%), *Pantoea* (27.9%) y *Pseudomonas*/*Streptomonas* (20%). Los géneros más abundantes de los epífitos foliares fueron *Hymenobacter* (12.85%), *Pseudomonas* (6.49%) y *Sphingomonas* (7.65%), mientras que los de los endófitos foliares fueron *Serratia* (67%), *Escherichia/Shigella* (50%), *Janthinobacterium* (50%), *Stenotrophomonas* (50%) y *Microvirga* (50%) (Figura 5). En las muestras de

insectos los filos más abundantes fueron Proteobacteria (92.79%), Actinobacteria (3.11%), Firmicutes (2.43%) y Bacteroidetes (1.34%).

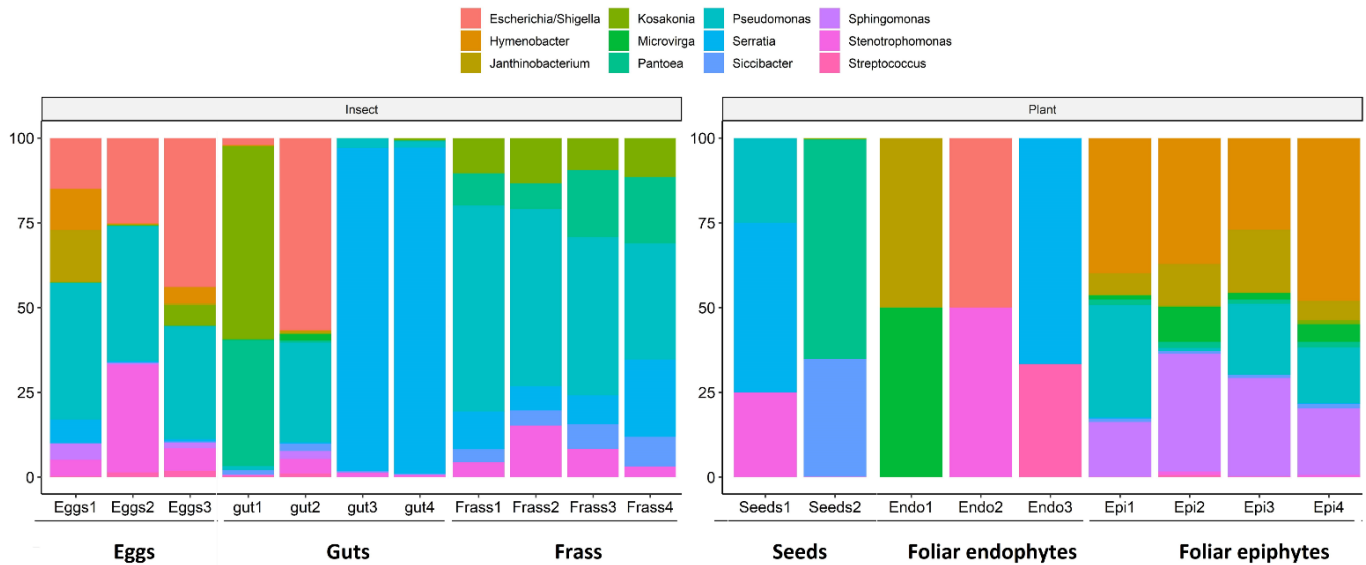


Figura 5. Composición taxonómica de los 12 géneros bacterianos más abundantes en la planta *D. inoxia* y su insecto especialista *L. daturaphila*. En el insecto representó el 70.2%, mientras que en la planta fue del 56.3% de las lecturas totales.

De los 77 géneros identificados, los doce más abundantes representaron el 70.2% del total de lecturas (Figura 6). Por lo que en el insecto se identificaron 71, 56 y 24 géneros en huevos, intestinos y heces, respectivamente. Los géneros más abundantes en los huevos fueron *Pseudomonas* (24.64%), *Escherichia/Shigella* (18.59%) y *Stenotrophomonas* (4.08%); y en el intestino fueron *Serratia* (88.46%), *Escherichia/Shigella* (15.69%) y *Kosakonia* (0.36%). Finalmente en las heces *Pseudomonas* (36.27%), *Pantoea* (10.22%) y *Serratia* (7.18%) fueron los géneros más abundantes (Figura 5).

En el PCA (Análisis de Componentes Principales) los bacteriomas se agruparon de acuerdo al tipo de muestra, aunque los endófitos de semillas y hojas se superpusieron (Figura 6). En el análisis de PERMANOVA se mostró que hubo

diferencias significativas ($F = 9.36$, $p < 0.001$). Resultó interesante que las muestras de intestino estuvieron más cerca de los endófitos de las semillas y las hojas que de cualquier otra muestra del insecto, mientras que las muestras de heces mostraron una mayor distancia con el resto (Figura 6). Otras comparaciones entre bacteriomas mostraron ASVs y géneros compartidos entre las diferentes muestras (Figura 7) Al comparar los bacteriomas de las muestras se observaron varios géneros compartidos, tales como *Azomonas*, *Bacillus*, *Brucella*, *Serratia*, *Pantoea*, *Pseudomonas*, *Roseomonas*, *Lawsonella*, *Microvirga* y *Enterobacter*, que se detectaron en las muestras de epífitos foliares, huevos e intestinos, aunque en diferente abundancia (Tabla 2). Los géneros *Azomonas*, *Enterobacter*, *Kosakonia*, *Massilia*, *Pantoea*, *Pseudomonas*, *Serratia*, *Siccibacter* y *Stenotrophomonas* fueron compartidos entre las muestras de epífitos, intestinos y heces. En contraste, los géneros *Methylobacterium-Methylorubrum*, *Bacillus*, *Hymenobacter*, *Escherichia-Shigella*, *Sphingomonas*, *Skermanella*, *Janthinobacterium* y *Lechevalieria* se compartieron entre epífitos e intestinos (Tabla 2).

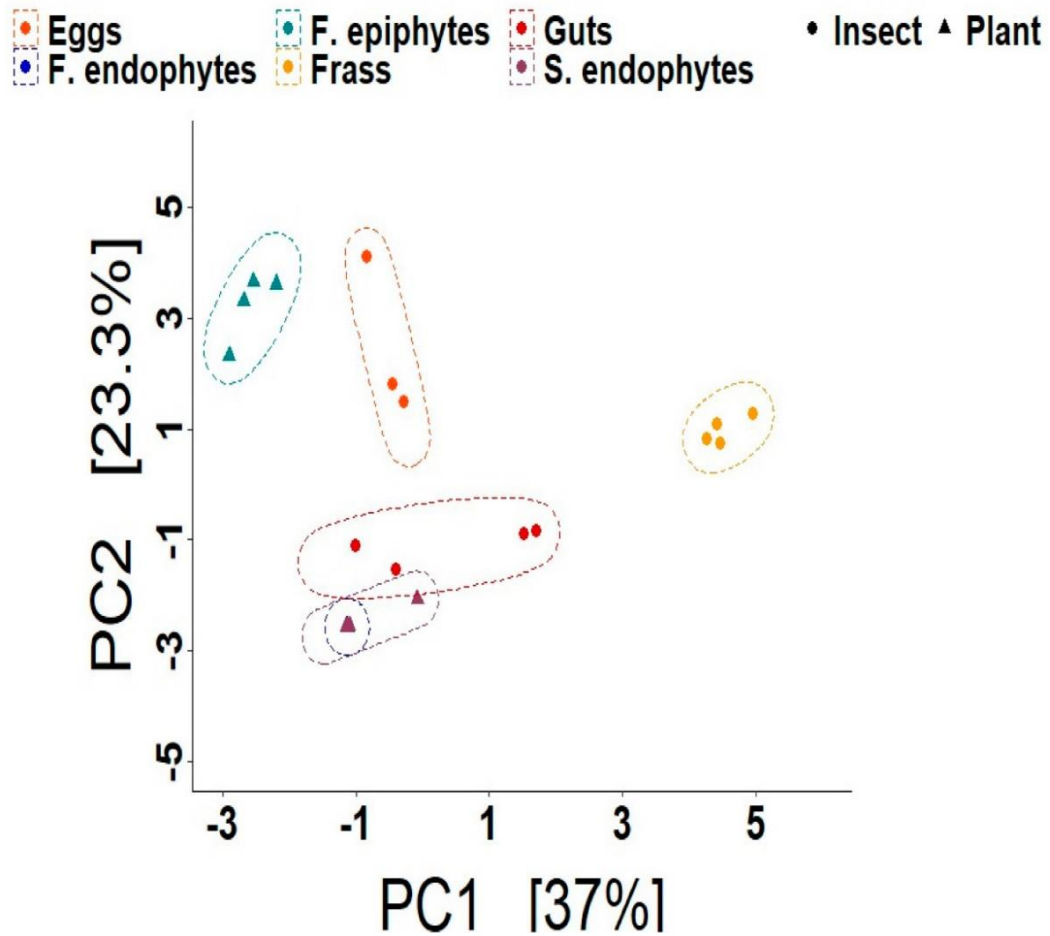


Figura 6. Análisis de diversidad beta de las muestras de *L. daturaphila* (huevos, intestino y heces) y *D. inoxia* (epífitos foliares, endófitos foliares y endófitos de semillas). El gráfico del análisis de componentes principales (PCA) está basado en la distancia de Bray-Curtis de los ASV. Cada color representa el bacterioma en cada tipo de muestra. Los símbolos representan el origen de las muestras: planta o insecto. Las elipses se estimaron mediante el algoritmo de Khachiyan. Las muestras de endófitos y semillas no se incluyeron en este análisis, dado el número relativamente pequeño de ASVs identificados.

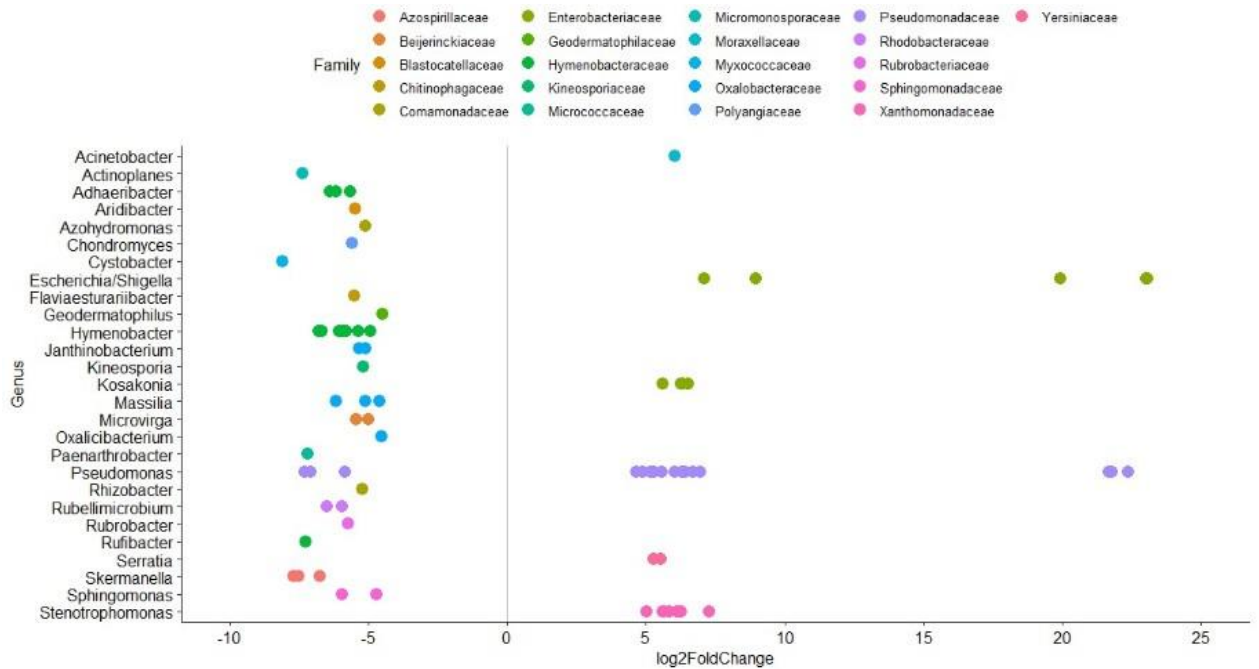


Figura 7. Géneros con diferencias significativas en las abundancia entre muestras de insectos (huevos, vísceras, excrementos) y plantas (epífitas foliares). El eje x representa los valores en $\log_2\text{FoldChange}$, los valores negativos indican que las abundancias de dichos géneros son mayores en la planta. Los positivos muestran que son más abundantes en el insecto. Esta comparación se hizo con la función DESeq2, la prueba utilizada fue Wald con significancia <0.01 .

Tabla 2. Géneros compartidos entre el bacterioma de la planta con diferentes combinaciones de las muestras de insectos. Se compararon únicamente los ASVs que tuvieron abundancias mayores a 0.1%.

Sample Combinations	# ASVs	# Genera	Géneros
All plant samples & Eggs	257	38	<i>Allorhizobium-Neorhizobium-Pararhizobium-Rhizobium, Aureimonas, Azomonas, Bacillus, Blastococcus, Brucella, Clostridium, Delftia, Enterobacter, Escherichia/Shigella, Gaiella, Hymenobacter, Janthinobacterium, Kineococcus, Kosakonia, Lawsonella, Lechevalieria, Leifsonia, Marmoricola, Massilia, Methylobacterium-Methylorubrum, Microbacterium, Microvirga, Modestobacter, Nocardioides, Oxalicibacterium, Pantoea, Paraclostridium, Paracoccus, Pseudomonas, Pseudocardia, Roseomonas, Serratia, Siccibacter, Sphingobacterium, Sphingomonas, Stenotrophomonas, Streptococcus</i>
All plant samples & Guts	197	37	<i>Allorhizobium-Neorhizobium-Pararhizobium-Rhizobium, Azomonas, Bacillus, Brucella, Enterobacter, Escherichia/Shigella, Geodermatophilus, Hymenobacter, Janthinobacterium, Kineococcus, Kocuria, Kosakonia, Lawsonella, Lechevalieria, Leptolyngbya, Marmoricola, Massilia, Methylobacterium-Methylorubrum, Microbacterium, Microvirga, Modestobacter, Nocardioides, Noviherbaspirillum, Paenarthrobacter, Pantoea, Paraclostridium, Paracoccus, Parviterribacter, Pseudomonas, Rickettsiella, Roseomonas, Rubellimicrobium, Serratia, Siccibacter, Skermanella, Sphingomonas, Stenotrophomonas</i>
All plant samples & Frass Foliar epiphytes	188	10	<i>Allorhizobium-Neorhizobium-Pararhizobium-Rhizobium, Azomonas, Enterobacter, Kosakonia, Massilia, Pantoea, Pseudomonas, Serratia, Siccibacter, Stenotrophomonas</i>
& all insect samples	85	15	<i>Allorhizobium-Neorhizobium-Pararhizobium-Rhizobium, Azomonas, Enterobacter, Kosakonia, Massilia, Pantoea, Pseudomonas, Serratia, Siccibacte, Stenotrophomonas</i>

3.4.2 Inferencias funcionales de los ASV encontrados en las muestras

En las muestras de plantas y en las de insectos se identificaron 330 grupos funcionales ortólogos KEGG (KO) en el nivel 1. De las 41 categorías en el nivel 2 de KEGG, sólo 21 estuvieron relacionadas con la interacción planta-insecto, y el resto se clasificaron como "Otros". Estas 21 categorías agrupadas en el nivel 2 formaron cuatro categorías en el nivel 3 que fueron: metabolismo, proceso celular, procesamiento de la información genética y procesamiento de la información ambiental. Sin embargo, la mayoría de las funciones predichas formaron parte de la categoría metabolismo, lo que sugirió que una de las principales funciones del bacterioma se relaciona con el metabolismo de sus huéspedes. En este sentido, las categorías más abundantes (media \pm sd) en el nivel 2 fueron: mapas globales y generales (huevos: $35,21 \pm 0,03$; intestinos: $35,38 \pm 0,81$; heces: $34,8 \pm 0,12$; semillas: $36,87 \pm 3,36$; endófitos foliares: $34,24 \pm 2,03$; epífitos foliares: $36,35 \pm 0,27$); metabolismo de carbohidratos (huevos: $9,6 \pm 0,46$; intestinos: $10,47 \pm 0,45$; heces: $9,1 \pm 0,27$; semillas: $10,14 \pm 1,33$; endófitos foliares: $9,72 \pm 1,37$; epífitos foliares: $9,09 \pm 0,13$) y metabolismo de aminoácidos (huevos: $9,2 \pm 0,38$; intestinos: $8,38 \pm 0,9$; heces: $9 \pm 0,19$; semillas: $8,83 \pm 1,08$; endófitos foliares: $8,49 \pm 0,44$; epífitos foliares: $9,14 \pm 0,07$) (Figura 8). Por el contrario, las categorías menos abundantes fueron: transcripción (huevos: $0,063 \pm 0,002$; intestino: $0,067 \pm 0,008$; heces: $0,06 \pm 0,001$; semillas: $0,07 \pm 0,008$; endófitos foliares: $0,06 \pm 0,014$; epífitos foliares: $0,069 \pm 0,0006$) y transporte y catabolismo (huevos: $0,24 \pm 0,020$; intestinos: $0,19 \pm 0,03$; heces: $0,20 \pm 0,016$; semillas: $0,17 \pm 0,05$; endófitos foliares: $0,22 \pm 0,004$; epífitos foliares: $0,3 \pm 0,01$) (Figura 5). Las funciones sobre el proceso celular, el procesamiento de la información genética y el procesamiento de información ambiental se relacionaron principalmente con la supervivencia y el desarrollo de las bacterias. En contraste, la categoría metabolismo también incluyó funciones que podrían ser relevantes en la interacción planta-insecto, tales como la síntesis de metabolitos secundarios y la actividad de las enzimas relacionadas con el metabolismo de carbohidratos y la degradación de xenobióticos.

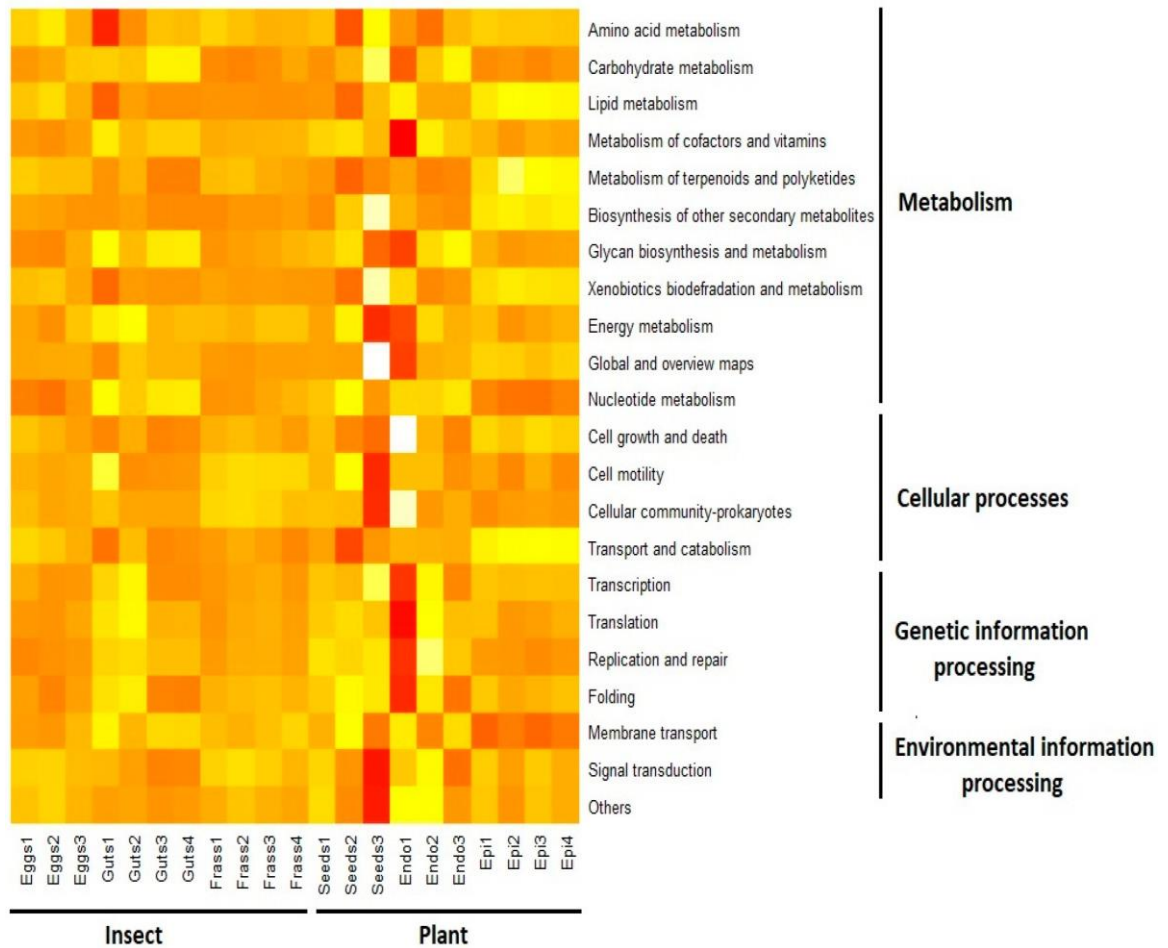


Figura 8. Mapa de calor de las categorías funcionales inferidas para cada grupo de muestras de la planta *D. innoxia* y su insecto especialista *L. daturaphila*. Cada columna corresponde a una muestra, y los renglones representan a las categorías funcionales. Los colores más claros representan valores más altos mientras que los más oscuros son valores más bajos.

En cuanto a la producción de metabolitos secundarios, se vio que la categoría de nivel 2 de metabolismo de terpenoides y policétidos fue más abundante en los epífitos foliares que en las demás muestras, excepto en los huevos (Kruskal-Wallis, $p = 0,00004$). Concretamente en el nivel 1, las categorías más abundantes en los epífitos fueron biosíntesis de sesquiterpenoides y triterpenoides (ANOVA, $P > 0,01$;

Figura 9A), biosíntesis de terpenoides y esteroides (ANOVA, $P > 0,01$; Figura 9B), biosíntesis de monoterpénoides (ANOVA, $P > 0,001$; Figura 9C) y biosíntesis de alcaloides indólicos (ANOVA, $P > 0,01$; Figura 9D). Por el contrario, en las muestras de huevos, intestinos y heces, la categoría de nivel 1 metabolismo de fármacos (otras enzimas) tuvo mayor abundancia que la de metabolismo de fármacos (citocromo p450) (prueba t, $P > 0,05$; Figura 9F).

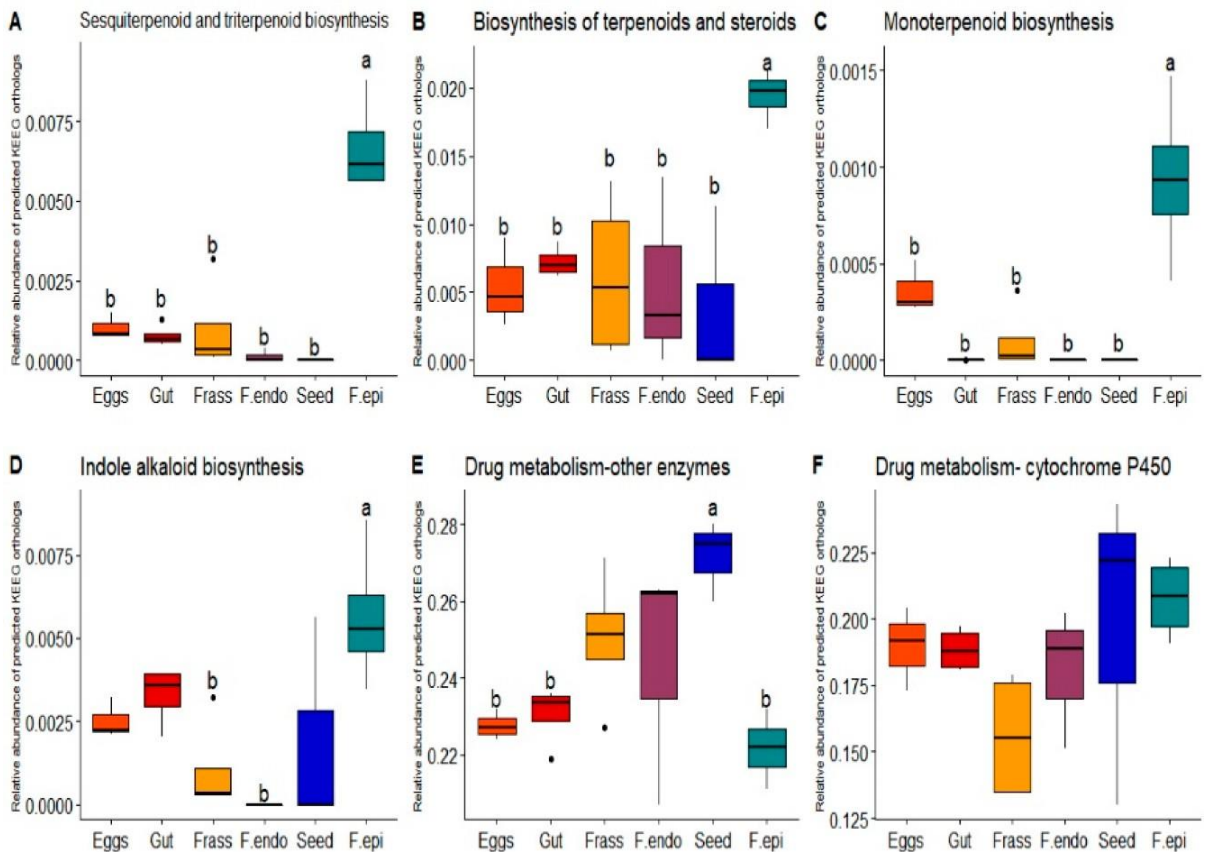


Figura 9. Abundancias relativas de ortólogos KEGG (KOs) en el nivel 1 implicados en (A) biosíntesis de sesquiterpenoides y terpenoides, (B) Biosíntesis de terpenoides y esteroides, (C) biosíntesis de monoterpénoides, (D) biosíntesis de alcaloides indólicos, (E) metabolismo de fármacos con otras enzimas y (F) metabolismo de fármacos citocromo p450 inferidas a partir de las muestras de la planta *D. innoxia* y su insecto especialista *L. daturaphila*. Las diferentes letras muestran las diferencias significativas de acuerdo con prueba de t ($p < 0.05$).

3.4.3 Redes de co-abundancia

Siguiendo un enfoque de red multicapa, se infirieron las redes de co-abundancia tanto para la planta como para el insecto (Figura 10). Las conexiones de red corresponden a los patrones de co-abundancia. Es decir, si se conectan dos nodos, tienen perfiles de abundancia similares en las diferentes muestras, y el grosor de las líneas de conexión indica la similitud de estas abundancias. La construcción de una red multicapa permite visualizar simultáneamente cómo cambian las correlaciones en la abundancia entre las cepas bacterianas asociadas con ambos huéspedes que interactúan. En cualquier interacción insecto-planta donde la microbiota de los insectos es evidentemente afectada por la microbiota de las hojas que consumen, en tanto las redes multicapa nos ayudan a detectar patrones y cambios en los perfiles de co-abundancia de las bacterias asociadas a ambos hospederos. En las muestras procesadas, Proteobacteria fue el filo más abundante y más conectado en ambas redes (Figura 10, nodos rojos). Los segundos filos más abundantes fueron Actinobacteria y Firmicutes. Ambos filos pertenecen al grupo central, lo que demuestra que la presencia de ambos filos está correlacionada. En otras palabras, la abundancia de un filo afecta la abundancia del otro y viceversa. Sorprendentemente, encontramos que en la red de co-abundancia de insectos, el patrón de conexión entre Proteobacteria y Actinobacteriota era común, pero en la red de co-abundancia de plantas este patrón no fue evidente. Estas diferencias en la conectividad dentro de las redes podrían explicarse porque se encontraron comunidades asociadas con la materia fecal del insecto *L. daturaphila* (Figura 10, principalmente Proteobacteria, nodos rojos). Además se encontró que las comunidades bacterianas fijadoras de nitrógeno (Figura 10, cianobacterias, nodos azules) eran exclusivas de los tejidos vegetales, lo que sugiere una interacción mutualista. Sin embargo, algunas conexiones con el filo Cyanobacteria estaban ausentes o no había una conexión directa (es decir, un patrón de co-abundancia) en la red de plantas, como fue el caso entre Chloroflexi, Cyanobacteria y Proteobacteria (tres nodos en ambas redes) lo que sugiere que la abundancia de

esos otros fila podría afectar la dinámica dentro de las comunidades bacterianas asociadas con la planta *D. inoxia*.

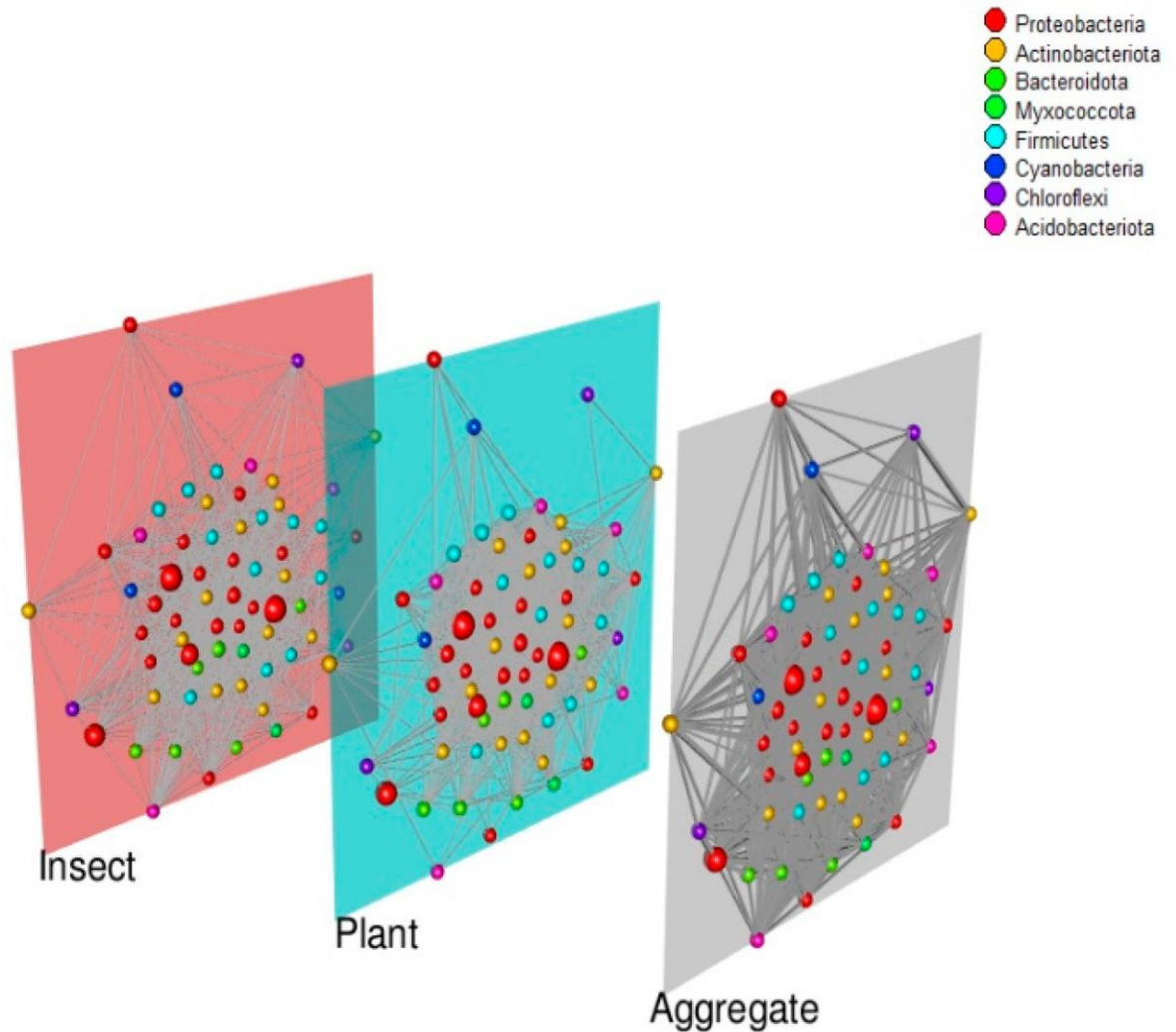


Figura 10. Red multicapa que muestra las co-abundancias entre los fila bacterianos en la planta *D. inoxia* y su insecto especialista *L. daturaphila*. Los colores de los nodos corresponden al nivel de phylum, y sus tamaños son proporcionales a su abundancia en las diferentes muestras. Las capas representan las redes de co-abundancia inferidas por el algoritmo SPIEC-EASI. La tercera capa es la red agregada resultante, donde los enlaces son la suma de las conexiones individuales ponderadas y el tamaño de los nodos es la suma de las abundancias.

3.5 Discusión

3.5.1 La composición y diversidad de los bacteriomas de la planta y el insecto

En *D. inoxia*, el índice de riqueza y el índice de diversidad filogenética fueron mayores en las muestras de epífitos, probablemente debido a que es un ambiente dinámico que está constantemente expuesto a la llegada de los microorganismos del suelo, el aire y el agua (Andreote et al., 2014). Entre los géneros identificados los más abundantes fueron *Hymenobacter* y *Sphingomonas*, que son comunes en los parches urbanos (Smets et al., 2016). Otros géneros encontrados como *Pseudomonas*, *Methylobacterium*, *Massilia*, *Aureimonas*, *Listeria*, *Staphylococcus* y *Pantoea* coinciden con otros reportes de la filósfera de plantas de la familia Solanaceae, a la que pertenece *D. inoxia* (Enya et al., 2007; Taghavi et al., 2009; Chen et al., 2021). En este sentido, los epífitos presentaron los valores más altos en diversidad filogenética, aunque los menores en términos de abundancias de los ASVs. Lo cual podría deberse a que la superficie de las hojas es un ambiente oligotrófico (Vorholt, 2012), ésto es una restricción importante para la proliferación microbiana afectando así la composición y abundancia de los epífitos.

En las muestras analizadas en el insecto, se observó que el bacterioma de los huevos de *L. daturaphila* fue más diverso que el del intestino, probablemente porque el ambiente intestinal es más selectivo (Douglas, 2015; Chen et al., 2016). En otros insectos como *Copris incertus* y *Brithys crini*, donde también se compararon las muestras de huevos e intestino, no se observaron diferencias significativas en la diversidad bacteriana asociada a ambas muestras (González-Serrano et al., 2020; Suárez-Moo et al., 2020). Otra característica del bacterioma intestinal fue que tuvo una menor diversidad, así como una mayor variación entre las muestras. Esto puede deberse a que algunas muestras se obtuvieron directamente de larvas de campo mientras que las otras fueron de larvas que se desarrollaron en condiciones de laboratorio. En otros estudios se ha reportado que el ambiente y el microbioma del suelo influyen en la composición del bacterioma intestinal (Itoh et al., 2018; Hannula et al., 2019; Gomes et al., 2020). Por ello, es

posible que la variación en el tejido foliar utilizado para mantener nuestra colonia de insectos fuera la fuente principal de la variación observada entre las muestras intestinales (Tsuchida et al., 2004; Hammer et al., 2017; Pons et al., 2019; Mason, 2020). Lo cual sugiere que las características del alimento o la composición microbiana asociada a éste influyeran en la composición del microbioma intestinal. En este sentido, hay que destacar que las diferencias en la composición del bacterioma intestinal tienen importantes implicaciones ecológicas porque afectan la supervivencia y el rendimiento de los insectos (Broderick et al., 2004; Hannula et al., 2019; Martínez et al., 2019; Pons et al., 2019; F. Y. Yang et al., 2020; Zhang et al., 2020). Finalmente, resultó interesante que la diversidad filogenética fue menor en las muestras de heces, siendo *Pseudomonas* el género dominante. Otro estudio sugirió que la microbiota de las heces debe reflejar la intestinal (Zhu et al., 2020). Sin embargo, en este estudio no se encontró dicho patrón, más bien se detectaron diferencias significativas no sólo en la composición sino también en la abundancia de ambos bacteriomas, como han demostrado otros estudios (Hammer et al., 2017). La presencia del género *Bacillus* en el bacterioma de las heces es relevante porque se ha visto que promueve la producción de compuestos volátiles como los disulfuros de alquilo que atraen a los insectos (Santos-García et al., 2020). Por lo que sería interesante conocer el potencial que tienen los microorganismos asociados a las heces para producir compuestos que tienen el potencial de afectar la comunicación inter e intraespecífica. Pues las larvas de *L. daturaphila* cargan los montículos de heces durante sus estadios larvales, por lo que es un tema interesante a indagar en estudios futuros.

Al comparar la composición y abundancia de los bacteriomas de plantas e insectos, se observó que las muestras con mayor similitud en composición fueron las de los bacteriomas de huevos y epífitos foliares. Esto sugiere que, como resultado de la interacción, algunos microorganismos asociados con las plantas tienen el potencial de llegar a las células germinales del insecto, asegurando su permanencia e incorporación (Santos-García et al., 2020). Entre los géneros más abundantes presentes tanto en plantas como en insectos estuvieron *Serratia* y

Pseudomonas. En plantas la presencia de estos géneros afecta su desarrollo (Mason, 2020; Ruiu, 2020), mientras que en los insectos pueden ser simbiontes obligados de entomopatógenos (Hurst et al., 2007; Nehme et al., 2007; Renoz et al., 2018; Kozlova et al., 2021). Además, hay reportes que muestran que *Serratia* promueve un ambiente anaeróbico en el intestino, lo que podría influir en la incorporación de otras cepas en dicho ambiente (Arias-Cordero et al., 2012). Los géneros *Enterobacter*, *Stenotrophomonas*, *Pseudomonas* y *Sphingomonas* se detectaron en los tejidos de plantas e insectos, aunque fueron más abundantes en las plantas, ya que pueden inducir la expresión de sus defensas (Pons et al., 2019), y además protegerlas contra patógenos (Enya et al., 2007; Taghavi et al., 2009; Vorholt et al., 2012; Chen et al., 2021). Esto sugiere que la presencia de todos estos géneros en los tejidos de los insectos podría ser el resultado de su interacción con la planta hospedera, aunque hacen falta más estudios para probar si tales microorganismos afectan el desempeño de los insectos.

3.5.2 Inferencias funcionales de los ASV encontrados en las muestras

Las inferencias funcionales sugieren que los bacteriomas de la planta *D. inoxia* y su insecto especialista *L. daturaphila* contribuyeron principalmente en aspectos relacionados con el metabolismo de sus huéspedes, lo cual se ha reportado en otras plantas (Stone et al., 2018; Lajoie et al., 2020) e insectos (González-Serrano et al., 2020; Jing et al., 2020). En particular, la actividad metabólica del bacterioma de las muestras de insectos contribuye en el metabolismo de carbohidratos, lo cual es relevante durante el consumo foliar pues implica la degradación de polisacáridos (Giron et al., 2017; Schmidt & Engel, 2021). Además se detectaron funciones relacionadas con el metabolismo del almidón y la sacarosa (Kochhar & Gujral, 2020), que son los principales productos de almacenamiento en las hojas, y por tanto influyen en la alimentación del insecto. Además, se detectó a enzimas como la β -glucosidasa, que se relaciona con la degradación de celulosa (Zang et al., 2018) y se sabe que está presente en los bacteriomas de otros insectos (Giron et al., 2017; Zang et al., 2018; Jing et al., 2020; Kochhar & Gujral, 2020; Schmidt & Engel, 2021).

Dichas enzimas también se detectaron en el bacterioma de los epífitos, los cuales en el contexto de las plantas son capaces de proteger a los herbívoros (Vassão et al., 2018). Aunado al metabolismo de carbohidratos, se detectaron funciones relacionadas con el metabolismo de diferentes aminoácidos como alanina, tirosina, glutatión, glutamina y glutamato (Hosokawa et al., 2006; Smith & Boyko, 2007; Wu et al., 2007; Jing et al., 2020; Lajoie et al., 2020). El bacterioma también participa en el metabolismo de cofactores, vitaminas y lípidos, lo cual sugiere un aporte nutricional para sus huéspedes. Dado que el tejido foliar no siempre proporciona a los herbívoros los nutrientes necesarios, se ha propuesto que la microbiota intestinal podría contribuir en la eficiencia del consumo de los alimentos (Smith et al., 2020; Jing et al., 2020;), produciendo beneficios para los insectos.

El bacterioma asociado a los tejidos de la planta participa en la producción de metabolitos secundarios, así como de proteasas que reducen la cantidad de daño causado por los herbívoros (Bringel & Couée, 2015; Mason et al., 2018). La biosíntesis de metabolitos secundarios como monoterpenos, sesquiterpenos y triterpenos fue mayor en la muestra de epífitos. En otros estudios, se ha reportado el potencial de los epífitos en la producción de metabolitos secundarios (Bringel & Couée, 2015; Ruiz-Pérez et al., 2016). Además de los terpenos, se detectó la biosíntesis de alcaloides, tales como el indol y el tropano en los microorganismos de la planta. Aunque el tropano no fue significativamente mayor en la planta que en el insecto, se sabe que es uno de los principales metabolitos secundarios de *D. innoxia*. En *D. stramonium*, hay reportes que muestran que el tropano participa en los mecanismos de resistencia contra los herbívoros (El Bazaoui et al., 2012; Miranda-Pérez et al., 2016; De-la-Cruz et al., 2020). Además de los metabolitos secundarios, se infirió la presencia de enzimas como los inhibidores de la cisteína peptidasa, que protegen a las plantas de las larvas de los insectos (Habib & Fazili, 2007). Dichas enzimas se encontraron principalmente en los epífitos de las plantas. Esto sugiere que el bacterioma de los epífitos contribuye en los mecanismos de resistencia de las plantas. En este sentido, la magnitud del impacto de algunos metabolitos de los epífitos sobre la supervivencia o desempeño de *L. daturaphila* podría evaluarse

empíricamente en el futuro, dado que, como parte de la carrera armamentista y los patrones de adaptación local, el bacterioma asociado al insecto podría mejorar sus mecanismos de desintoxicación (Biere & Tack, 2013). Aunado a ello, sería interesante evaluar la relevancia que tiene en términos cuantitativos el aporte del bacterioma en la producción de metabolitos secundarios; debido a que las cantidades producidas por el bacterioma foliar son probablemente bajas y es posible que no contribuyan al desempeño del huésped. Otra posibilidad es que la producción de dichos metabolitos secundarios promueva la expresión de genes de las plantas que estén relacionados con la producción de metabolitos secundarios.

Otras funciones que también se detectaron y que podrían ser importantes en la interacción fueron las relacionadas con la degradación de xenobióticos (Adams et al., 2013; Kikuchi et al., 2012; González-Serrano et al., 2020; Jing et al., 2020). En esta categoría, algunas enzimas presentes tanto en los epífitos como en los insectos fueron el citocromo p450, la peroxidasa (DyP) y la glutatión-S-transferasa (GST). La presencia de estas enzimas se ha reportado previamente en plantas (Schuler, 1996; Gullner et al., 2018) e insectos (Vanhaelen & Haubruge, 2005; Jing et al., 2020). Se ha visto que las enzimas de citocromo p450 participan en la síntesis de aleloquímicos en las plantas (Schuler, 1996). La actividad microbiana de esta enzima podría aumentar las defensas de las plantas porque los aleloquímicos intervienen en la asimilación de nutrientes (Behmer, 2009; Honda et al., 2013). Dicha enzima además interviene en los mecanismos de detoxificación del insecto (Feyereisen, 1999; Tsuchida et al., 2004). Otras enzimas como la peroxidasa (DyP), la glutatión-S-transferasa (GST) y las fenol oxidasas participan en la degradación del tolueno o el xileno (Jing et al., 2020). En este sentido cabe señalar que una de las funciones atribuidas a la microbiota intestinal es la degradación de xenobióticos (Mason & Raffa, 2014; Jing et al., 2020; Mason, 2020; Schmidt & Engel, 2021), por lo que la eficiencia de los mecanismos de detoxificación se comprendería mejor como resultado de la interacción de estas enzimas tanto en la planta como en el insecto (Scott & Wen, 2001; Shi et al., 2012; Giron et al., 2017; Jaffar et al., 2022).

3.5.3 Redes de co-abundancia

En las redes multicapa que se hicieron para este estudio, una capa corresponde a la red de co-abundancia entre las cepas bacterianas presentes en todos los tejidos del insecto, y la segunda capa muestra el mismo tipo de red pero en la planta. En la última década, las redes multicapa han sido una herramienta poderosa para estudiar una gran variedad de sistemas ecológicos como las interacciones planta-polinizador o planta-microorganismo (Pilosof et al., 2017), pero, hasta donde sabemos, ningún estudio hasta la fecha ha construido redes multicapa para analizar las interacciones planta-insecto. En el caso de la interacción entre la planta *D. innoxia* y su insecto especialista *L. daturaphila*, la mayoría de los fila y géneros estuvieron presentes tanto en la planta como en los insectos, pero sus abundancias y conectividad dentro de las redes fueron diferentes. En otras palabras, la abundancia de ciertos fila se correlacionó en el insecto pero no con la planta. Se desconoce si este patrón de co-abundancia diferencial tiene consecuencias en términos de interacciones ecológicas entre las cepas bacterianas.

Específicamente, en la red de plantas, los grupos bacterianos formados por los fila Chloroflexi, Cyanobacteria y Proteobacteria se asociaron con funciones como la fijación de nitrógeno. Pese a ello, tales comunidades bacterianas estuvieron ausentes en los tejidos de los insectos, lo que indica que estas cepas bacterianas podrían ser específicas de la planta (Figura 8). Además, tales fila se correlacionaron dentro de la red de co-abundancia de plantas, lo que sugiere su importancia para establecer interacciones mutualistas con la planta. Se sabe que la fijación de nitrógeno por géneros como *Azotobacter*, *Clostridium* o *Rhizobium* está relacionada con el crecimiento de las plantas (Soumare et al., 2020). Algunos géneros presentes en el tejido vegetal como *Pseudomonas* (Shang et al., 2021), *Pantoea* (Lv et al., 2022) y *Siccibacter* (Mamarasulov et al., 2022) se relacionan con la biosíntesis de auxinas y la fijación de nitrógeno (Holochová et al., 2020). Cabe señalar que rizobacterias como *Bacillus amyloliquefaciens* y *Pseudomonas putida* promueven la activación de la vía del ácido jasmónico y el ácido salicílico, lo que aumenta los niveles de resistencia a insectos como las orugas (Capellari et al., 2020). Por su

parte, géneros como *Serratia*, *Shigella* y *Escherichia* fueron más abundantes en *L. daturaphila* (Figura 8), aunque también tuvieron una presencia importante en los epífitos de la planta. Es decir, estos géneros se encontraron en ambas capas, pero fueron especialmente abundantes en el intestino. El hecho de que estas comunidades se encontraran en ambos hospederos podría relacionarse con el hecho de que, al alimentarse de la planta, las heces llegan a tener contacto con la planta. Las larvas de *L. daturaphila* acumulan sus heces en la parte posterior de su cuerpo mientras están en la planta, lo que podría ser un mecanismo de defensa contra posibles parasitoides (Bustos-Segura, 2011). Las Proteobacteria tuvieron una presencia importante en todas las muestras, pero su papel en la interacción planta-insecto es complejo (Preston et al., 2005). Mientras que algunos géneros son patógenos de plantas, otras bacterias como *Pseudomonas* spp se relacionan con la reducción de la supervivencia de la mosca blanca, así como con la inhibición del crecimiento de áfidos (Haney et al., 2018) con beneficios potenciales para la planta. Además, bacterias como *Serratia symbiotica*, otra gammaproteobacterium, están estrechamente asociada con los pulgones, lo que les brinda protección contra varios parásitos (Renoz et al., 2019). Por lo tanto, es posible que el filo Proteobacteria tenga diferentes papeles en la interacción con ambos huéspedes, desde interacciones mutualistas pasando por comensalismos hasta las antagónicas.

La microbiota de los sistemas altamente integrados, como las relaciones planta-herbívoro, generalmente forman múltiples tipos de interacciones. Como se mencionó anteriormente, las redes son una herramienta adecuada para estudiar los sistemas biológicos complejos. Estas intrincadas relaciones podrían representarse fielmente en redes multicapas. En nuestro caso, las capas representan perfiles de abundancia de bacterias en la planta y el insecto. Este tipo de red es útil para capturar patrones de co-abundancias entre capas, y la capa agregada resumió los patrones de abundancia de plantas e insectos. Estos patrones de coexistencia sugieren una mezcla de microorganismos de diferentes nichos y revelaron que Proteobacteria, Actinobacteria y Firmicutes son ubicuos, lo que sugiere el

importante papel funcional que tienen en la interacción entre la planta *D. inoxia* y su insecto especialista *L. daturaphila*.

IV. Capítulo 3

El efecto de la filósfera sobre el desempeño de los insectos

Con los resultados de este capítulo se está preparando un manuscrito científico que será enviado, para su posible publicación, a la revista especializada *Microbial Ecology*.

4.1 Introducción

El intercambio recíproco de microorganismos asociados a las plantas y a los insectos que las consumen es inevitable en la herbivoría (Felton & Tumlinson, 2008; Sugio et al., 2015; Mason et al., 2020; Mayoral-Peña et al., 2020). En este sentido la ingesta del tejido foliar expone a los insectos a los microorganismos de la superficie de las partes aéreas de la planta (filoplano) así como a los del interior de los tejidos (endosfera) (Newton et al., 2010; Carvalho & Castillo, 2018). En dicho contexto el filoplano se refiere al sitio habitado por las comunidades microbianas epífitas, mientras que en la endosfera están las comunidades endófitas (Carvalho & Castillo, 2018; Lindow & Brandl, 2003; Newton et al., 2010). En conjunto los microorganismos del filoplano y de la endosfera forman la filósfera. Las comunidades de epífitos y endófitos pertenecen a diferentes grupos taxonómicos, siendo las bacterias las más abundantes (Dastogeer et al., 2020). Por lo que surge la pregunta acerca de cómo la presencia de la filósfera influye en el herbívoro. En cuanto a su efecto se sabe que repercuten en la preferencia por el alimento pero son pocos los estudios que indagan en el papel que tienen los epífitos en el desempeño de los insectos (Peters et al., 2017; Noman et al., 2019; Mason, 2020).

Las comunidades de epífitos son las primeras en tener contacto con los insectos además de estar expuestas a las condiciones abióticas del lugar donde crece la planta (Dastogeer et al., 2020; Lindow & Brandl, 2003). Por el momento, de los pocos estudios que hay sobre el papel del filoplano en los insectos, se ha evaluado la función de cepas como *Ralstonia*, *Acinetobacter* y *Pseudomonas*, en el desempeño de los insectos (Mason et al., 2014; Shikano et al., 2015; Olson et al., 2017). En cuanto al efecto de la combinación de diferentes cepas de epífitos en los insectos no hay estudios. La relevancia de considerar el efecto de la interacción es porque en la naturaleza los insectos ingieren con el alimento a grupos microbianos que son de diferentes grupos taxonómicos (bacterias, algas, virus, hongos). Por lo que el efecto de la interacción de las comunidades microbianas con el insecto es muy distinto al que se tiene cuando se evalúa una cepa en particular (Peters et al., 2017). En consecuencia la integración de la actividad de las comunidades

microbianas en el insecto podría permitirnos una mejor comprensión de la interacción planta-insecto (Dastogeer et al., 2020). Por tanto, este es uno de los primeros estudios que considera evaluar el papel de las comunidades microbianas del filoplano en el desempeño de los insectos.

El desempeño de los insectos es influenciado por su capacidad de alimentación. Debido a que por el bolo alimenticio transitan microorganismos surge la pregunta de qué tanto de la capacidad de ingesta del insecto es afectada por la filósfera (Mason, 2020; Noman et al., 2019). Al respecto se sabe que la presencia de la filósfera modifica la composición y estructura del microbioma intestinal de los herbívoros (Guidolin & Cônsoli, 2017; Mogouong et al., 2021). Tal efecto puede ser el resultado de la interacción entre microorganismos que influyen en la composición de la microbiota intestinal residente relacionada con la digestión o detoxificación. Otra posibilidad es que los microorganismos del filoplano desempeñen una función directa relacionada con el aprovechamiento del tejido foliar (Mogouong et al., 2021). Determinar sí el desempeño de los insectos es afectado directa o indirectamente por los epífitos aún es un tema que hace falta por estudiar.

En los herbívoros *Aphis fabae* (Pons et al., 2019), *Sitobion miscanthi* (Li et al., 2018), *Macrosteles quadripunctulatus* (Gonella et al., 2015), *Empoasca vitis* (Gonella et al., 2015), *Trichoplusia ni* (Leite-Mondin et al., 2021) y *Lymantria dispar* (Broderick et al., 2004) se ha reportado que adquieren microorganismos durante la fitofagia. Este intercambio de microorganismos promueve la interacción de la microbiota intestinal con la filósfera, influyendo así en la capacidad de alimentación de los insectos. Cabe señalar que las variaciones en la composición de la microbiota intestinal pueden mantenerse a través de las generaciones (Freitak et al., 2009; Leite-Mondin et al., 2021). Algunas características de los insectos que son afectadas por la filósfera son el tiempo de desarrollo (Freitak et al., 2007), la masa pupal (Freitak et al., 2007), el peso y el crecimiento de las larvas (Mason et al., 2014; Shikano et al., 2015), y la descendencia (Olson et al., 2017; Qian et al., 2018).

En cuanto al efecto de las comunidades de epífitos en las plantas se sabe que están involucradas en el crecimiento y desarrollo de éstas (Francis et al., 2020;

Goswami et al., 2021). Asimismo, los epífitos pueden actuar como una barrera de protección para las plantas al afectar negativamente a patógenos y herbívoros (Hashidoko, 2005; Mason, 2020; Goswami et al., 2021; Poveda, 2021). Un aspecto en el que contribuyen los epífitos es en la producción de metabolitos secundarios, lo que influye en las defensas de las plantas y en la preferencia de los herbívoros (Peters et al., 2017; Poveda, 2021). En este sentido, son contados los estudios en los que se evalúa empíricamente el efecto de los epífitos en el desempeño de los insectos (Mason et al., 2014; Olson et al., 2017; Shikano et al., 2015). Por tanto este estudio evaluó la hipótesis de que las comunidades de epífitos foliares afectan negativamente el desempeño de los herbívoros. Para ello, se usó el sistema de estudio *Datura innoxia*-*Lema daturaphila*.

4.2 Hipótesis y objetivos

4.2.1 Hipótesis

Hay estudios que proponen que las comunidades del filoplano actúan como la primera barrera de protección para las plantas ya que producen metabolitos secundarios que evitan la presencia de los herbívoros. Al respecto las inferencias funcionales mostraron que el bacterioma de *D. innoxia* participa en la biosíntesis de metabolitos secundarios como terpenos y alcaloides. Tales compuestos podrían tener un efecto adverso en los insectos. En este sentido, la carrera armamentista entre plantas e insectos implicaría que la interacción microorganismo-planta reduce el impacto de los herbívoros en la planta. En consecuencia se planteó que las comunidades de epífitos del alimento de *L. daturaphila* reducen la supervivencia y afectan negativamente su desempeño (la masa de las larvas, eficacia del consumo foliar, duración del desarrollo y la masa de los adultos).

4.2.2 Objetivo

- Evaluar el efecto de las comunidades de epífitos de *D. innoxia* en el desempeño (supervivencia de las larvas, eficacia del consumo foliar, masa

de las larvas, consumo foliar total, duración del desarrollo y masa de los adultos) de su insecto especialista *L. datuphila*.

4.3 Material y métodos

4.3.1 Sistema de estudio

La planta *Datura innoxia* Mill (Solanaceae) es una herbácea anual que crece en las zonas ruderales de la ciudad de Querétaro y que a menudo es consumida por su herbívoro especialista *Lema daturaphila* (Kariñho-Betancourt et al., 2015; Martínez y Díaz de Salas et al., 2017). Los adultos de *L. daturaphila* ovipositan en la superficie de las hojas, ya que al eclosionar las larvas se alimentan del tejido foliar hasta completar sus cuatro estadios larvales en *D. innoxia* (observaciones personales). Posteriormente, las larvas se entierran y forman una pupa que da lugar al adulto (observaciones personales). El filoplano de la planta *D. innoxia* tiene altos índices de riqueza y diversidad filogenética en comparación con otros tejidos de la planta (Mayoral-peña et al., 2022). Por este motivo, los insectos al alimentarse están expuestos a una constante fuente de microorganismos que aporta la superficie de las plantas. En este sentido, las inferencias funcionales del bacterioma de los epífitos de *D. innoxia* participa en la biosíntesis y degradación de metabolitos secundarios (Mayoral-peña et al., 2022).

4.3.2 Diseño experimental

Se utilizaron 157 plántulas de *D. innoxia* que se germinaron en noviembre y diciembre de 2021. Estas plántulas se trasplantaron en macetas individuales de siete pulgadas con tierra para macetas que se colocaron en el invernadero de la Unidad Experimental Simbiosis de la Universidad Autónoma de Querétaro en Querétaro, México. Las plantas se fertilizaron con Peters (1g/L) en el momento del trasplante; y se volvieron a fertilizar a los quince días y a los treinta días. Las plantas se mantuvieron en el invernadero desde la germinación hasta la aparición de al menos la cuarta hoja. Después, las plantas se retiraron del invernadero para promover la adquisición de epífitos.

Durante el periodo mencionado en el párrafo anterior, se colectaron huevos, larvas y adultos de *L. daturaphila* de la localidad de El Márquez (20°37'28.1" N, 100°22'07.2" O) para iniciar una colonia. La colonia se alimentó con plantas de *D. inoxia* que germinaron a comienzos de 2021 y se protegieron en jaulas con malla antiáfidos. Posteriormente, los adultos se trasladaron a vitroleros de plástico, donde se cambiaron las hojas cada tercer día por otras frescas de la planta mencionada colectadas cerca de la ciudad de Querétaro. El suelo se mantuvo húmedo para preservar el tejido foliar y la colonia se dejó a temperatura ambiente en el laboratorio con fotoperíodos de 12:12 horas (Espinosa & Forni, 2006). Los huevos colectados se transfirieron a hojas individuales que se dejaron en cajas de Petri. Se dio seguimiento a dichos huevos y se seleccionaron aquellos recién eclosionados para el experimento (Espinosa & Forni, 2006; Garrido et al., 2012).

El experimento comenzó en noviembre de 2021 y duró cuatro meses. Para ello se usaron plantas de *D. inoxia* con al menos seis hojas. De cada planta se cortó un par de hojas consecutivas con una hoja de bisturí estéril. Después, se aplicaron los siguientes tratamientos a cada par de hojas. Una de las hojas no se expuso al procedimiento de remoción de epífitos (tratamiento control), mientras que la otra sí fue expuesta (tratamiento sin epífitos). La hoja control se dejó en una placa de Petri después del corte, mientras que la hoja sin epífitos se trató en una campana de flujo laminar bajo el siguiente procedimiento. La hoja sin epífitos se expuso a los siguientes lavados seriados: buffer de epífitos (KH₂PO₄, K₂HPO₄, Triton) (1 min), cuatro lavados con agua estéril (2 minutos cada uno), y finalmente se utilizó una gasa estéril (modificada de Desgarnes et al., 2014). Las hojas se agitaron en las soluciones para facilitar la remoción de epífitos en cada lavado. Posteriormente, la hoja se colocó en una placa de Petri estéril.

Al pecíolo de cada hoja se le colocó un algodón humedecido con agua estéril para conservar su frescura. Enseguida, a cada hoja se le dejó una larva recién eclosionada a la que se le dio seguimiento durante siete días. El reemplazo del tejido foliar se hizo en aquellas hojas en las que se detectó que habían perdido su frescura. A partir del día siete, cada placa de Petri se pasó a un recipiente de plástico

transparente de 500 cm³ cubierto con tul blanco en la parte superior (Garrido Espinosa, 2004). A cada recipiente se le añadieron aproximadamente 150 ml de tierra para macetas, lo que permitió que las larvas pasaran al estadio de pupa (Garrido Espinosa, 2004). Se aseguró que el suelo permaneciera húmedo mediante el uso de un aspersor con agua estéril. Finalmente, se dio seguimiento a las muestras hasta que emergieron todos los adultos.

Durante el experimento se midieron las siguientes variables dependientes: supervivencia de las larvas (días hasta la muerte de las larvas), eficiencia del consumo foliar (g/cm²), masa de las larvas (g), consumo foliar (cm²), duración del desarrollo (días desde la eclosión hasta la emergencia) y masa de los adultos (Garrido et al., 2012). Las variables independientes evaluadas fueron: la presencia de epífitos (con epífitos (control) y sin epífitos) y el mes en que se hizo el experimento (noviembre, diciembre, enero, febrero). Para el análisis del consumo foliar, se tomó una fotografía de las hojas antes de ser consumidas por el herbívoro y otra después del daño foliar. El área foliar consumida por cada larva se obtuvo al restar el área de la hoja no dañada y el área de la hoja tras ser consumida por el herbívoro. Las imágenes de las hojas se analizaron en el programa *Fiji* de *ImageJ* (Rueden et al., 2017). Después se sumaron todas las áreas consumidas por las larvas hasta el día siete. La masa de las larvas (g) se midió al día siete porque después de ese tiempo algunas larvas se enterraron. La eficiencia del consumo foliar se consideró como la relación de la masa larvaria al día siete (g) entre el área foliar consumida al día siete (cm²). La duración del desarrollo se definió como el número de días que tardaron las larvas recién nacidas en convertirse en adultos. La masa de los adultos (g) se cuantificó al momento de la emergencia del adulto (Espinosa & Fornoni, 2006).

4.3.3 Análisis de datos

El análisis de supervivencia de las larvas se hizo con el modelo mixto de riesgos proporcionales con el paquete de supervivencia *coxph* (Therneau & Grambsch, 2000) en el software R (ver. 4.0.2; R Core Development Team 2020). El análisis de

supervivencia se hizo mediante un modelo de Cox estratificado para la variable mes. En el modelo de riesgo proporcional se compararon los días hasta la emergencia de los adultos entre las larvas del grupo control y las del grupo sin epífitos. El número de días hasta la emergencia del adulto fue la variable respuesta, mientras que el tratamiento, el mes y la interacción entre tratamiento y mes se consideraron como las variables independientes. El número de larvas utilizadas para este análisis fue de 282.

Todas las variables se analizaron con ANOVA de dos vías en las que se incluyeron el tratamiento, el mes y su interacción como fuentes de variación. Estos análisis se hicieron con el software R. En los análisis de correlación de Pearson se incluyeron todas las variables evaluadas, excluyendo la variable supervivencia. Para el análisis de significancia se usó la corrección de bon-ferroni ajustada, utilizando la biblioteca *psych* (Revelle, 2017). Los supuestos de homocedasticidad y distribución normal se revisaron visualmente utilizando gráficos de normalidad Q-Q. El número de larvas utilizadas en cada análisis fue de 141.

4.4 Resultados

La supervivencia de las larvas y la formación de los adultos no se vio afectada por las comunidades de epífitos ($X_2 = 4.13$, $P = 0.39$). La masa de las larvas no cambió por la presencia o ausencia de los epífitos ($F_{1,106} = 0.536$ $P = 0.466$; Figura 11A). En cambio las larvas que no estuvieron expuestas a los epífitos incrementaron la ingesta de tejido foliar ($F_{3,106} = 6.166$ $P = 0.0146$; Figura 11B). A su vez la eficiencia del consumo foliar fue mayor en las que tenían comunidades de epífitos en su alimento ($F_{1,106} = 7.136$ $P = 0.00875$; Figura 11C). En cuanto a la masa de los adultos, se observó que fue mayor en el grupo control ($F_{1,106} = 3.966$ $P = 0.049$; Figura 11D).

Aunado al tratamiento se evaluó el efecto del mes en la masa de las larvas, lo que se observó fue que tuvo un impacto significativo ($F_{3,106} = 54.275$ $P < 0.01$). En este sentido la masa de las larvas fue mayor en diciembre donde la temperatura fue más baja. En contraste, la interacción entre mes y tratamiento no afectó

significativamente la masa de las larvas ($F_{3,106} = 1.221$ $P = 0.306$). Asimismo el mes tuvo un efecto significativo en el consumo foliar ($F_{3,106} = 43.158$ $P < 0.01$), siendo en febrero cuando incrementó. En febrero, la temperatura máxima alcanzada fue superior a la de los otros meses (22.42°C). Sin embargo, la interacción del mes con el tratamiento no fue significativa ($F_{3,106} = 1.660$ $P = 0.18$). En cuanto a la eficacia del consumo foliar el mes del experimento tuvo un efecto significativo ($F_{3,106} = 4,868$ $P = 0.00327$), pero no la interacción entre el mes y el tratamiento ($F_{3,106} = 1,178$ $P = 0.32168$). En tanto que, la eficiencia del consumo foliar fue mayor en diciembre que en febrero. En el caso de la masa de los adultos se vio que el mes también afectó dicha variable ($F_{3,106} = 19.646$ $P < 0.01$); por lo que en diciembre los adultos tuvieron una mayor masa. Además, la interacción entre el mes y el tratamiento no fue significativa ($F_{3,106} = 0.406$ $P = 0.749$), lo que sugiere la ausencia de un efecto sinérgico entre las dos variables.

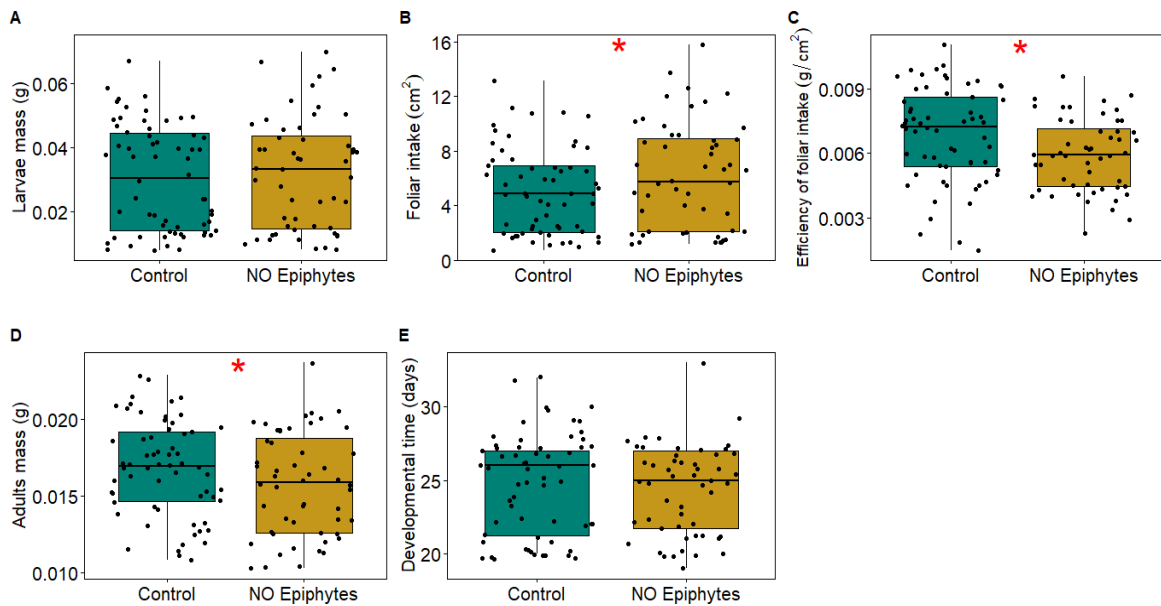


Figura 11. Comparación del efecto de la presencia de las comunidades de epífitos (control) y su ausencia (No epífitos) en: A) consumo foliar, B) masa de las larvas, C) eficiencia del consumo foliar, D) masa de los adultos, y E) duración del desarrollo. * indica $p < 0.01$.

Las comunidades de epífitos no afectaron la duración del desarrollo ($F_{1,106} = 3.191$ $P = 0.0769$; Figura 11E), pero el mes sí lo impactó ($F_{3,106} = 162.270$ $P < 0.01$); por lo que en noviembre las larvas tardan más tiempo en desarrollarse. A su vez, la interacción del mes con el tratamiento afectó significativamente la duración del desarrollo ($F_{3,106} = 2.711$ $P < 0.0487$; Figura 12). En consecuencia, la presencia de los epífitos en interacción con las temperaturas bajas (14 °C) incrementó la duración del desarrollo. En cambio, a mayor temperatura la duración del desarrollo se redujo en ambos grupos (control y sin epífitos).

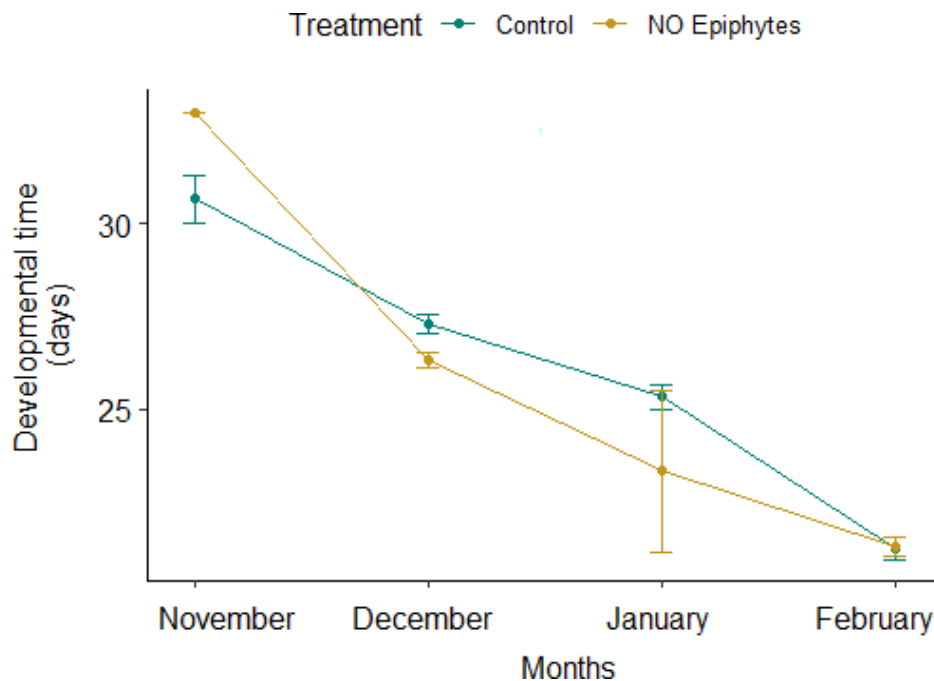


Figura 12. Gráfica de interacción entre mes y tratamiento en la variable duración del desarrollo

Se hizo un análisis de correlación para determinar el grado de asociación entre las variables. El análisis de correlación entre las variables evaluadas mostró una correlación positiva entre el consumo foliar y la masa de las larvas ($r = 0.8$, $P <$

0.001). Sin embargo, la correlación de la masa de las larvas con la eficacia del consumo foliar fue negativa ($r = -0.62$, $P < 0.001$). Por ello, a mayor consumo foliar, mayor masa de las larvas, mientras que, a mayor consumo foliar, menor eficiencia del consumo foliar. Por el contrario, la duración del desarrollo se correlacionó negativamente con la ingesta foliar ($r = -0.68$, $P < 0.001$) y la masa de las larvas ($r = -0.71$, $P < 0.001$). Como resultado, las larvas que consumieron menor cantidad de alimento y tuvieron una masa menor tardaron más tiempo en llegar al estadio adulto. Además, se observó una correlación positiva entre el tiempo de desarrollo y la masa de los adultos ($r = 0.49$, $P < 0.001$). Es decir, a mayor duración del desarrollo, mayor masa en los adultos.

4.5 Discusión

Las larvas recién eclosionadas buscan el alimento y se exponen a los epífitos desde sus primeros bocados. En este sentido, la interacción de las larvas con los epífitos es constante a lo largo de su desarrollo. Si bien, las comunidades de epífitos no son indispensables para la supervivencia o desarrollo de los insectos, su presencia influye en el aprovechamiento del tejido foliar así como en la masa de los adultos. La presencia de los epífitos tuvo un efecto positivo en la eficacia del consumo foliar y las larvas que no estuvieron expuestas a tales microorganismos incrementaron su ingesta de tejido foliar para compensarlo. Pese a que la duración del desarrollo no fue influenciada por la presencia de los habitantes del filoplano la interacción con el mes hizo la diferencia sobre todo en los meses más fríos como noviembre y diciembre. Finalmente resultó interesante que hubo una correlación positiva entre el tiempo de desarrollo y la masa de los adultos. Esto sugiere que a mayor duración del desarrollo incrementa la masa de los adultos.

La supervivencia de *L. daturaphila* depende de su interacción con *D. inoxia* pero qué pasa cuando está de por medio la presencia de los epífitos. En este estudio se observó que las comunidades de epífitos no afectan la supervivencia de *L. daturaphila*, lo cual coincide con lo reportado en los insectos *Trichoplusia ni* (Freitak et al., 2007) y *Malacosoma californicum* (Olson et al., 2017). En tanto que, los

epífitos no son indispensables en la supervivencia de los insectos cuando se tiene suficiente alimento. Por el contrario, la supervivencia de los insectos es afectada negativamente al exponer a los insectos a los microorganismos de la superficie en condiciones de escaso alimento (Olson et al., 2017). Por tanto, variar las condiciones bióticas y abióticas podría ser relevante al estudiar el efecto de los epífitos en el insecto. En este sentido, considerar cómo diferentes contextos pueden cambiar la respuesta de interacción filoplano-insecto podría ser útil en estudios posteriores.

En contraste, las comunidades de epífitos afectaron positivamente la eficiencia del consumo foliar de *L. daturaphila*. Esto podría ser consecuencia del efecto que tiene la producción de metabolitos de los epífitos en la composición de la microbiota intestinal residente. Al respecto varios estudios muestran que la filósfera influye en la composición de la microbiota intestinal de los herbívoros (Aluja et al., 2021; Leite-Mondin et al., 2021; Mogouong et al., 2021; L. Zhu et al., 2021). Así que, la presencia de los habitantes del filoplano podría aumentar la abundancia de cepas residentes involucradas en la digestión o el procesamiento del tejido foliar, y con ello el impacto positivo en la eficiencia de la ingesta foliar (Guidolin & Cônsoli, 2017; Qin, 2018; Leite-Mondin et al., 2021). La producción de compuestos antimicrobianos por parte de los epífitos podría afectar diferencialmente las proporciones de los microorganismos residentes del intestino. En el análisis de inferencias funcionales se detectó la producción de compuestos antimicrobianos de la familia de las ansamicinas, tetraciclinas y vancomicinas (datos no publicados); la secreción de dichas moléculas podría ser responsable de modular las abundancias de algunos géneros residentes impactando así en la interacción entre la microbiota intestinal transitoria (epífitas) y la residente (Coyte et al., 2015; Miyashita et al., 2015; Schmidt & Engel, 2021). Ante esta situación, sería valioso evaluar los géneros co-ocurrentes de los diferentes grupos taxonómicos; además de analizar si hay un incremento en los géneros bacterianos que se relacionan con la degradación de metabolitos secundarios y por tanto el efecto observado (Leite-Mondin et al., 2021). En este sentido, algunas actividades de los epífitos que contribuirían directamente

en la eficacia del consumo foliar son las enzimas involucradas en la descomposición de los alimentos, la digestión y la degradación de metabolitos secundarios (Engel & Moran, 2013; Gupta & Nair, 2020; Leite-Mondin et al., 2021).

Otra posibilidad es que el efecto de la interacción entre las comunidades de epífitos y la microbiota del insecto sería lo que influye en la eficacia del consumo foliar (Aglar et al., 2016) En este sentido, los habitantes del filoplano tendrían una actividad funcional relacionada con el aprovechamiento del tejido vegetal. Por ello, la interacción entre los epífitos, la microbiota intestinal y las enzimas del hospedero en conjunto pueden facilitar la digestión, la descomposición de los alimentos y/o los mecanismos de desintoxicación (Engel & Moran, 2013; Gupta & Nair, 2020; Kucuk, 2020; Luo et al., 2021). Por consiguiente, la función de los diferentes consorcios microbianos de la microbiota intestinal, que incluye a los epífitos interactuando entre sí y con el hospedero, permitiría un mejor aprovechamiento del tejido foliar (Newell & Douglas, 2014; Sommer & Newell, 2019; Jing et al., 2020; Mogouong et al., 2021). En este sentido, la capacidad enzimática del intestino del hospedero en combinación con la del filoplano y la microbiota intestinal harían más eficiente el consumo de tejido foliar en los insectos (Watanabe & Tokuda; 2010; Newell & Douglas, 2014; Bost et al., 2018; Mogouong et al., 2021, 2010).

En síntesis, las comunidades de epífitos intervienen en la eficiencia de la ingesta foliar, aunque no son indispensables. El peso de las larvas, con y sin epífitos al día siete, no mostró diferencias significativas, pues las larvas no expuestas a los microorganismos consumieron más área foliar. El incremento del consumo foliar, como consecuencia de la reducción de la eficiencia de la ingesta foliar, podría relacionarse con una mala ingesta nutricional. En algunos herbívoros se ha visto que al no alcanzar el valor nutricional óptimo, tienden a aumentar su consumo de alimento (Chapman, 1995; Yang & Joern, 1994; Clancy et al., 2014). Por este motivo, el consumo extra de tejido foliar podría deberse a una reducción en la eficiencia de la degradación de polisacáridos, que es una de las principales funciones de la microbiota intestinal (Arias-Cordero et al., 2012; Cazemier et al., 2003; Salem et al., 2017; Schmidt & Engel, 2021). El consumo de carbohidratos

afecta la ganancia de peso de los insectos, que en insectos holometábolos es muy importante para el desarrollo de la pupa (Le Gall & Behmer, 2014). Por ello, cuando los epífitos están ausentes, la eficiencia en el aprovechamiento de carbohidratos se reduce y la ingesta aumenta para compensarlo.

Otro aspecto en el que los epífitos podrían estar involucrados, además de la degradación de carbohidratos, es en la degradación de metabolitos secundarios de las plantas (Mason et al., 2014). Se sabe que la microbiota intestinal contribuye en dicha función (Berasategui et al., 2016; Douglas, 2015; Jing et al., 2020; Wielkopolan & Obrępalska-Stęplowska, 2016). En cuanto al papel de los epífitos, se ha encontrado que participan en la degradación de los glucósidos favoreciendo el crecimiento larvario (Mason et al., 2014). Por lo que en el caso de *L. daturaphila* y los habitantes del filoplano se necesitan más estudios para determinar si el impacto de los microorganismos se debe al procesamiento de metabolitos secundarios o al metabolismo del tejido vegetal.

La comunidad de epífitos por sí sola no afectó la duración del desarrollo larvario, pero sí se observó su efecto al interactuar con la variable meses, la cual conlleva cambios en la temperatura. En consecuencia, la duración del desarrollo fue mayor cuando las larvas estuvieron expuestas a temperaturas más bajas y sin epífitos. Al respecto, estudios muestran que la presencia de algunos microorganismos en los insectos les permite responder mejor a las variaciones en la temperatura (Fahim et al., 2020; Jaramillo & Castañeda, 2021). Dado que la temperatura es una variable que interviene en la duración del desarrollo de los insectos, las bajas temperaturas prolongan el tiempo de desarrollo, pues hay una reducción en la actividad metabólica (Riaz et al., 2014; Cui et al., 2018; Huang et al., 2018). A su vez, la duración del desarrollo se redujo al aumentar la temperatura, esto ya se ha reportado en otros insectos (Riaz et al., 2014; Cui et al., 2018; Huang et al., 2018). En este sentido, hay estudios que muestran que la microbiota intestinal afecta la duración del desarrollo de los insectos (Salem et al., 2014; Jing et al., 2020; Wang et al., 2020). Por lo que cambios en la temperatura pueden afectar la

capacidad metabólica de los microorganismos, sus interacciones y la interacción microbiota-hospedero afectando así la duración del desarrollo del insecto.

Aunque no se observaron diferencias en la masa de las larvas, la masa de los adultos fue mayor en el grupo control. La relevancia de considerar la masa de los adultos es porque se relaciona con la fecundidad de los insectos, donde hembras más grandes ponen más huevos brindando una ventaja en términos de adecuación (Calvo & Molina, 2005; Berger et al., 2008; Sturm, 2016). Lo cual sugiere que los epífitos al estar en contacto con el hospedero favorecen una descendencia más numerosa. Además, los machos más grandes tienen más probabilidades de aparearse (Agosta, 2010; Hanks, 1996). El efecto de los epífitos en la masa de los adultos podría promover el desarrollo de más hembras que machos, ya que las hembras son más grandes que los machos en *L. daturaphila* (Garrido, 2004). Al respecto, existen microorganismos que manipulan la proporción de los sexos (Zakharov, 2015). En este sentido será necesario posteriormente determinar si los habitantes de la superficie afectan directamente la masa o si más bien actúan sobre la proporción de los sexos. Sin embargo, si la presencia de los epífitos afecta a la descendencia de los insectos podría sugerir que dichos microorganismos podrían participar en la adaptación local (Tsuchida et al., 2004; Biere & Tack, 2013; Beran et al., 2019).

Las variables evaluadas estuvieron influenciadas por los epífitos y el mes, que incluyó los cambios de temperatura. En consecuencia, a mayor temperatura se incrementó el consumo foliar, la masa larvaria, la eficiencia de consumo foliar y la masa adulta. En otros insectos, la temperatura también influye en su desempeño (Liu et al., 2021; Sun et al., 2022). Tal efecto podría ser por la influencia de la temperatura directamente en el hospedero o por el impacto indirecto de ésta sobre las interacciones entre los microorganismos.

La duración del desarrollo se correlacionó negativamente con la masa larval. Esto significa que las larvas más pequeñas tardan más días en completar su desarrollo. En cambio, una mayor masa en los adultos corresponde a un mayor tiempo de desarrollo. Esto sugiere que existe un *trade-off* entre la masa de los

adultos y la duración del desarrollo (Stearns, 1989; Roff, 2000; Zera & Harshman, 2001). Lo cual es relevante porque la masa de los adultos está relacionada con el número de huevos que puede depositar una hembra (Calvo & Molina, 2005; Berger et al., 2008; Sturm, 2016). Por tanto, una mayor tasa de reproducción implica prolongar su tiempo de desarrollo, la pérdida de parejas potenciales y la susceptibilidad a ser parasitados o consumidos por depredadores (Verdolin et al., 2006; Thaler et al., 2012). En este sentido, la presencia de los epífitos, al considerar la temperatura, promueve un mayor tiempo de desarrollo, aunque el costo es la pérdida de parejas potenciales y la susceptibilidad a ser depredado. Lo cual sugiere que la interacción de las epífitas con los insectos interviene en este *trade-off*.

Contrario a las suposiciones iniciales, se encontró que la comunidad de epífitos no afecta negativamente la supervivencia, la duración del desarrollo, la eficiencia de la ingesta foliar, la masa de las larvas y los adultos. En cambio, se observó que, aunque los habitantes del filoplano no son esencial para la supervivencia y el desarrollo larvario, afectan positivamente la eficiencia de consumo foliar y el tamaño de los adultos. Hace falta determinar si las interacciones con los epífitos impactan directa o indirectamente en el procesamiento del tejido foliar. Así como establecer si el impacto de las interacciones entre los microorganismos de la superficie foliar y el insecto es en términos ecológicos y/o evolutivos.

V. Discusión general

La interacción planta-insecto se desarrolla en medio de la presencia microbiana, esta última influye en las defensas de las plantas y las contra-defensas de los insectos. La relevancia evolutiva de los microorganismos es que representan una fuente potencial de variación genética para ambos hospederos (Rosenberg & Zilber-Rosenberg, 2016). Por lo que depende del tipo de asociación y la historia compartida entre plantas e insectos con los microorganismos que el efecto sea positivo o negativo para la interacción. En dicho contexto se planteó la pregunta, ¿cuál es el efecto de las microbiotas asociadas en la interacción planta-insecto? La resolución de dicha pregunta se pretendió abordar al considerar el impacto de la filósfera sobre el desempeño de los insectos pues es un atributo en el que la carrera armamentista podría estar involucrada.

Los resultados mostraron que *D. inoxia* y *L. daturaphila* comparten varios géneros, lo que sugiere que la composición de sus bacteriomas es afectada por la interacción planta-insecto. Pese a la similitud en la composición bacteriana, se observaron diferencias en las abundancias dependiendo del hospedero. Lo cual muestra que plantas e insectos tienen características que propician ambientes diferentes y ello favorece distintas formas de interacción. Asimismo la estructura y la dinámica que mantienen sus microorganismos podría ser relevante al detectar el papel funcional que tienen sobre los hospederos.

Las inferencias funcionales mostraron que las actividades potenciales de los bacteriomas son: la biosíntesis de metabolitos secundarios así como la presencia de enzimas relacionadas con la degradación del tejido vegetal y con los mecanismos de detoxificación. Esto sugiere que los bacteriomas asociados a plantas e insectos tienen funciones que se relacionan directamente con la interacción planta-insecto. Sin embargo, se necesitan más estudios empíricos para determinar el efecto que tiene el intercambio recíproco de dichos microorganismos tanto para el herbívoro como para la planta. Pues habrá que ver sí la cantidad

secretada es significativa para el hospedero y sí la dinámica de interacciones microbianas permite la expresión de dichas actividades funcionales.

De la filósfera, los epífitos son una fuente diversa de microorganismos a la que los insectos están expuestos desde que eclosionan. De los tejidos evaluados el bacterioma de *D. inoxia*, tuvo la mayor diversidad filogenética; por lo que el filoplano, representa una de las principales fuentes de adquisición microbiana para los insectos. La relevancia de la adquisición de microorganismos es que representa una fuente potencial de variación genética para los insectos. La cual en caso de reflejar una ventaja en el desempeño de los insectos podría estar involucrada en procesos evolutivos como la adaptación local.

La evaluación empírica del efecto de las comunidades de epífitos en el insecto mostró su influencia en la eficiencia del consumo de alimento. Los resultados sugieren que tal efecto podría derivar de la participación de los epífitos en el metabolismo del alimento o en los mecanismos de detoxificación. Al respecto hacen falta más estudios para determinar el papel funcional microbiano en dicho contexto. A su vez, los resultados mostraron que la masa de los adultos es ligeramente mayor cuando están presentes las comunidades de epífitos. El que los habitantes del filoplano influyan en la masa de los adultos sugiere la implicación microbiana sobre la reproducción de los insectos. En este caso hacen falta estudios que distingan sí los epífitos favorecen hembras de mayor tamaño o un incremento en el número de hembras. Esto podría hacer una diferencia en la descendencia y por tanto ser una ventaja promovida por la adaptación local.

En el capítulo 1 se observó como las herramientas tecnológicas han permitido incorporar a los microorganismos en nuestra manera de ver a plantas e insectos. En tanto que ambos participantes existen como holobiontes que son unidades que están en evolución y que la presencia microbiana afecta sus interacciones (Moran & Sloan, 2015). Por lo que al buscar comprender a la interacción planta-insecto ya sea en términos ecológicos y/o evolutivos no podemos dejar fuera la estructura ni el papel funcional que desempeñan los microorganismos. (Doolittle & Andrew, 2018).

El uso de herramientas bioinformáticas, entre las que se incluyen las redes de interacción, podría aproximar de forma más eficiente el procesamiento de la vasta información que deriva de los estudios de microbioma. Dado que las redes de interacción permiten resumir información y dar una idea de la estructura, que es importante cuando se trata de interacciones. Pues hay limitantes empíricas y detectar aquellos que son relevantes en la interacción planta-insecto puede facilitar estudios posteriores.

Varios estudios muestran que los herbívoros modifican la composición de la microbiota residente de las plantas (Humphrey et al., 2014; Humphrey & Whiteman, 2020; Smets & Koskella, 2020). No obstante, se conoce menos acerca de cómo tales cambios afectan las defensas de las plantas, no considerando de forma aislada a plantas e insectos sino viéndolos como un mismo sistema que implica intercambios y respuestas recíprocas (Mason, 2020; Mayoral-Peña, et al., 2020). En este sentido aún hace falta comprender qué tanto de la respuesta defensiva de las plantas es producto de los elicitores microbianos y qué tanto es de los del insecto. Así como en el caso del insecto qué tanto de su capacidad para ingerir alimento depende de la presencia microbiana y de qué manera ésta afecta el desempeño de los insectos.

En el segundo capítulo se mostró que los bacteriomas de la planta *D. inoxia* y de su insecto *L. daturaphila* son similares, lo que sugiere que hay intercambio microbiano entre ambos. Esto coincide con lo reportado para insectos como *Lymatria dispar*, *Helicoverpa armígera* y *Pieris rapae* donde la composición de su microbiota es similar a la del alimento (Broderick et al., 2004; Robison et al 2010; Priya et al., 2012). Pese a la similitud en la composición microbiana, las diferencias estuvieron en las abundancias. Tal es el caso de *Serratia* que fue más abundante en el insecto que en la planta, en cambio *Massilia* lo fue en la planta. Tales diferencias implican que ambos bacteriomas tienen dinámicas y estructuras diferentes como resultado de las características fisicoquímicas de cada hospedero así como de las interacciones microbianas. Lo cual podría ser relevante en términos funcionales. De hecho, la presencia de algunas cepas en determinadas

proporciones influye en el establecimiento de otros microorganismos (Arias-Cordero et al., 2012). A su vez, el que los filo Proteobacteria y Actinobacteriota muestren un patrón de co-abundancia en el insecto pero no en la planta indica que pese a la similitud en la composición hay variaciones estructurales que podrían ser relevantes en términos funcionales. Por lo que es importante tomarlos en cuenta al estudiar la interacción planta-insecto.

En cuanto a la composición, la muestra de epífitos fue la que tuvo mayor riqueza y diversidad filogenética, por ser un ambiente expuesto a las condiciones del entorno (Andreote et al., 2014). Este dato muestra que al alimentarse los insectos una de las principales fuentes de adquisición microbiana es la superficie de las hojas. Pese a que el intestino es un ambiente más selectivo, la constante exposición a la filósfera puede reforzar la adquisición microbiana o la modificación de la dinámica de las cepas residentes del intestino. No obstante, la composición de la microbiota intestinal está fuertemente influenciada por las características de la fuente de alimento. Lo cual se vio en las diferencias entre los intestinos de las larvas de campo y las de laboratorio. Dado que la composición microbiana foliar cambia al cortar las hojas (Hannula et al., 2019) y ello se refleja en la composición de la microbiota intestinal.

En este estudio no se observó que la microbiota de las heces fuera un reflejo de la intestinal. El paso de los microorganismos por el tracto intestinal es un desafío para los microorganismos, algunos no sobreviven, otros son incorporados, por lo que finalmente los que se desechan son menos de los que ingresaron. Esto podría verse reflejado en la baja diversidad filogenética. Incluso las condiciones físico-químicas de las heces pueden ser muy selectivas y restringir la proliferación de varios grupos bacterianos.

A pesar de que la composición es importante como un primer paso, conocer el papel funcional de los microorganismos es fundamental. En este sentido, las inferencias funcionales mostraron algunas actividades del bacterioma de los insectos que se relacionan con el procesamiento del tejido foliar en términos del metabolismo de carbohidratos y los mecanismos de detoxificación. Mientras que en

las plantas se detectó la producción de metabolitos secundarios (terpenos y alcaloides) y proteasas que tienen que ver con los mecanismos de defensa (Habib & Fazili, 2007; Mason et al., 2018). Esto sugiere que los bacteriomas de ambos hospederos participan en aspectos relacionados con las defensas de las plantas y contradefensas de los insectos. Sin embargo, habría que evaluarlo de manera empírica, ya que aunque se detecten ciertos genes, el contexto en el que se desarrollan es lo que determina la expresión o no de éstos.

En el tercer capítulo se evaluó empíricamente el efecto de las comunidades de epífitos en el desempeño del insecto. En este sentido se observó que los epífitos tienen un papel funcional en los insectos que se relaciona con la eficiencia del consumo foliar. Por lo que a diferencia de lo planteado inicialmente al parecer la filósfera influye positivamente en el herbívoro. Dicho efecto, no solo podría resultar positivo por permitir un mejor aprovechamiento del tejido foliar sino que los resultados sugieren que hay una potencial ventaja sobre la adecuación de los insectos. Lo cual se muestra en la masa de las larvas que fueron mayores en los que ingirieron tejido foliar con epífitos. Lo cual podría ser producto del tiempo de la interacción, quizás en algún punto los microorganismos de la filósfera tuvieron un efecto negativo pero ahora el efecto observado es positivo. Al respecto hay reportes que muestran que los microorganismos adquiridos pueden influir en las capacidades adaptativas de los hospederos (Fukatsu et al., 2000; Hosokawa et al., 2007; Kikuchi et al., 2007). En este caso hacen falta más estudios que nos permitan concluir sobre el efecto de los epífitos en la adaptación de los insectos.

Los insectos no dependen de la filósfera para sobrevivir o desarrollarse, pero su presencia les da una ventaja. En tanto que el efecto observado es el resultado de la sinergia que resulta de combinar la actividad de las enzimas de los hospederos, de la microbiota intestinal y de la filósfera. Una colaboración que aunque no es indispensable resulta ventajosa. Lo cual de manera parcial nos permite contestar parte de la pregunta planteada, pues los microorganismos sí tienen un efecto en el aprovechamiento del tejido foliar por parte de los insectos.

Este estudio fue un primer acercamiento para estudiar el efecto de los microorganismos en la interacción *D. inoxia*-*L. daturaphila*, sin embargo, hacen falta más estudios que clarifiquen el rol microbiano en la ecología y evolución de la interacción. En cuanto al papel de las comunidades de epibiontes en el insecto hace falta conocer sí su efecto es producto de cambios en las proporciones microbianas asociadas al hospedero, o sí es consecuencia de la actividad funcional de los epífitos. Lo que se observó en este estudio fue que las comunidades de epífitos impactan positivamente el desempeño de los insectos. Pese a que hace falta examinar el papel funcional que tienen las comunidades de epífitos de *D. inoxia* en la eficiencia del consumo foliar y en la masa de los adultos del insecto *L. daturaphila*.

VI. Perspectivas

Los avances tecnológicos recientes y la emergencia de nuevos conceptos como el de holobionte han permitido observar a plantas e insectos como la integración del hospedero con sus microorganismos asociados. Aunque conceptualmente funciona, el holobionte es difícil de delimitar para su estudio, ya que es un continuo dinámico de interacciones con distintos grados de integración (Roughgarden et al., 2018; Salem et al., 2020). En consecuencia, no toda la microbiota que forma parte de un hospedero se mantiene todo el tiempo o pasa con fidelidad a través de las generaciones (Roughgarden et al., 2018). Por ello, es importante ser cuidadosos al considerar al holobionte como unidad evolutiva. A su vez, se debe tomar en cuenta que los microorganismos forman unidades funcionales que son influenciadas directamente por el contexto más allá de su identidad taxonómica ya que podría facilitar los estudios empíricos (Doolittle & Booth, 2017). En tanto que el holobionte puede ser comprendido mejor al combinar herramientas bioinformáticas que den dirección a los futuros planteamientos experimentales.

En el contexto de la interacción planta-insecto se requieren estudios que identifiquen el efecto del intercambio recíproco de sus microbiotas, ya que se sabe que la presencia microbiana no es inocua (Mason, 2020; Mayoral-Peña et al., 2020). Debido a que los microorganismos pueden influir en el fenotipo de sus hospederos, las interacciones que tienen con otras especies pueden verse afectadas por lo que sería interesante considerarlos en el contexto de la carrera armamentista planta-insecto. En este sentido no basta con identificar la presencia de los géneros compartidos también hay que tomar en cuenta sus abundancias; pues las interacciones entre los distintos microorganismos pueden inducir cambios en el ambiente que afectan su papel funcional.

El efecto de cepas individuales no es el mismo que el generado por distintas combinaciones de microorganismos, por lo que sería recomendable evaluar el papel que tiene la combinación de los diferentes grupos microbianos al exponer a las plantas y a los insectos. O bien, comparar los efectos individuales de las cepas, así como distintas combinaciones microbianas permitirá una mejor comprensión del papel que tienen los microorganismos en contextos como la herbivoría. Pues al final plantas e insectos son expuestos al mismo tiempo a diferentes microorganismos y es justo la combinación de las distintas señales lo que induce la respuesta en plantas e insectos.

En este estudio no se evaluó el impacto microbiano en las defensas de las plantas, pero es un campo fértil para estudios posteriores. Especialmente son pocos los estudios en los que se ha probado el efecto microbiano en aspectos relacionados con la tolerancia (Giron et al., 2017; Kaiser et al., 2010), por lo que en estudios futuros se podría evaluar la magnitud del efecto de los microorganismos en las respuestas de tolerancia. Una mejor comprensión al respecto nos permitirá encontrar mejores soluciones para el manejo de plagas.

Los epífitos representan una fuente importante de diversidad microbiana para los herbívoros. Su composición es influenciada por el componente biótico y abiótico, por lo que su dinámica podría influir directamente en la interacción de los insectos con las plantas (Vorholt, 2012; Dastogeer et al., 2020). Los resultados mostrados en el capítulo tres sugieren que la presencia de los epífitos en el alimento le proporciona una ventaja a las larvas en cuanto al aprovechamiento del tejido foliar lo cual podría reflejarse en la adecuación de los insectos. En consecuencia, podrían ser relevantes en la adaptación local planta-insecto pero hacen falta más estudios para abordarlo. En estudios posteriores sería recomendable analizar si la masa de los adultos es afectada por cambios en la proporción de los sexos o si más bien es promovido el desarrollo de adultos con una mayor masa. Aunado a ello haría falta evaluar empíricamente qué tanto el cambio en la masa de los adultos afecta en la puesta de huevos. En este sentido, falta comprender con más detalle cuál es el papel que tienen los epífitos en el desempeño de los insectos y conocer si éste es

positivo o negativo; así como detectar aquellas variables abióticas que influyen en el impacto de los microorganismos en sus hospederos. Pues los epífitos quizás no solo intervienen en procesos ecológicos sino también están presentes en los evolutivos.

En estudios posteriores podría abordarse la evaluación del efecto que tienen los endófitos y epífitos en el desempeño de los insectos. Así como analizar el impacto que tiene la combinación de ambos grupos de microorganismos en los insectos. Dicha comprensión permitirá encontrar alternativas que pudieran ayudarnos en el manejo de plagas en cultivos que tienen relevancia económica.

Otro aspecto relevante para estudios futuros es con respecto a las heces. Las heces al parecer tienen su propia dinámica, pues en el capítulo dos se vio que tenían altos niveles de dominancia, derivado de que son de los pocos microorganismos que sobreviven a todo el proceso digestivo. Quizás algunos de los microorganismos que se mantienen en las heces podrían ser útiles en la emisión de compuestos que afectan la comunicación inter- e intraespecífica. Sin embargo, ello necesita ser analizado empíricamente.

VII. Referencias

- Arias-Cordero, E., Ping, L., Reichwald, K., Delb, H., Platzer, M., & Boland, W. (2012). Comparative Evaluation of the Gut Microbiota Associated with the Below- and Above-Ground Life Stages (Larvae and Beetles) of the Forest Cockchafer, *Melolontha hippocastani*. *PLoS ONE*, 7(12). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0051557>
- Biere, A., & Tack, A. J. M. (2013). Evolutionary adaptation in three-way interactions between plants, microbes and arthropods. *Functional Ecology*, 27(3), 646–660. <https://doi.org/10.1111/1365-2435.12096>
- Blankenchip, C. L., Michels, D. E., Elizabeth Braker, H., & Goffredi, S. K. (2018). Diet breadth and exploitation of exotic plants shift the core microbiome of *Cephaloleia*, a group of tropical herbivorous beetles. *PeerJ*, 2018(5). <https://doi.org/10.7717/peerj.4793>
- Broderick, N. A., Raffa, K. F., Goodman, R. M., & Handelsman, J. (2004). Census of the bacterial community of the gypsy moth larval midgut by using culturing and culture-independent methods. *Applied and Environmental Microbiology*, 70(1), 293–300. <https://doi.org/10.1128/AEM.70.1.293>
- Carvalho, S. D., & Castillo, J. A. (2018). Influence of Light on Plant–Phyllosphere Interaction. *Frontiers in Plant Science*, 9(October), 1–16. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01482>
- Caspi-Fluger, A., Inbar, M., Mozes-Daube, N., Katzir, N., Portnoy, V., Belausov, E., ... Zchori-Fein, E. (2012). Horizontal transmission of the insect symbiont *Rickettsia* is plant-mediated. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 279(1734), 1791–1796. <https://doi.org/10.1098/rspb.2011.2095>
- Chrostek, E., Pelz-Stelinski, K., Hurst, G. D. D., & Hughes, G. L. (2017). Horizontal transmission of intracellular insect symbionts via plants. *Frontiers in Microbiology*, 8(NOV), 1–8. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02237>
- Chung, S. H., Scully, E. D., Peiffer, M., Geib, S. M., Rosa, C., Hoover, K., & Felton, G. W. (2017). Host plant species determines symbiotic bacterial community mediating suppression of plant defenses. *Scientific Reports*, 7, 1–13. <https://doi.org/10.1038/srep39690>
- Dastogeer, K. M. G., Tumpa, F. H., Sultana, A., Akter, M. A., & Chakraborty, A. (2020). Plant microbiome—an account of the factors that shape community composition and diversity. *Current Plant Biology*, 23, 100161. <https://doi.org/10.1016/j.cpb.2020.100161>
- Dillon, R. J., & Dillon, V. M. (2004). The gut bacteria of insects: Nonpathogenic Interactions, (98), 71–92. <https://doi.org/10.1146/annurev.ento.49.061802.123416>
- Engel, P., & Moran, N. A. (2013). The gut microbiota of insects - diversity in structure and function. *FEMS Microbiology Reviews*, 37(5), 699–735. <https://doi.org/10.1111/1574-6976.12025>

- Felton, G. W., & Tumlinson, J. H. (2008). Plant – insect dialogs: complex interactions at the plant – insect interface, 457–463. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2008.07.001>
- Ford Doolittle, W., & Andrew Inkpen, S. (2018). Processes and patterns of interaction as units of selection: An introduction to ITSNTS thinking. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 115(16), 4006–4014. <https://doi.org/10.1073/pnas.1722232115>
- Frago, E., Dicke, M., & Godfray, H. C. J. (2012). Insect symbionts as hidden players in insect – plant interactions. *Trends in Ecology & Evolution*, 27(12), 705–711. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2012.08.013>
- Garcia, J., Escanuela, M., Bhat, S., & Lampert, E. (2020). The Trichoplusia Ni Gut Microbiome and Its Derivation from the Phyllosphere of Its Food Plants. *Georgia Journal of Science*, 78(2), 9.
- Giron, D., Dedeine, F., Dubreuil, G., Huguet, E., Mouton, L., Outreman, Y., ... Simon, J. C. (2017). *Influence of Microbial Symbionts on Plant–Insect Interactions. Advances in Botanical Research* (Vol. 81). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/bs.abr.2016.09.007>
- Goswami, S., Goel, N., & Majumdar, R. S. (2021). Phylloplane microbes impact host physiology : a review. <https://doi.org/10.24425/jppr.2021.137949>
- Grunseich, J. M., Thompson, M. N., Aguirre, N. M., & Helms, A. M. (2020). The role of plant-associated microbes in mediating host-plant selection by insect herbivores. *Plants*, 9(1), 1–23. <https://doi.org/10.3390/plants9010006>
- Gupta, A., & Nair, S. (2020). Dynamics of Insect–Microbiome Interaction Influence Host and Microbial Symbiont. *Frontiers in Microbiology*, 11(June). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.01357>
- Halitschke, R., Hamilton, J. G., & Kessler, A. (2011). Herbivore-specific elicitation of photosynthesis by mirid bug salivary secretions in the wild tobacco *nicotiana attenuata*. *New Phytologist*, 191(2), 528–535. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2011.03701.x>
- Hammer, T. J., Janzen, D. H., Hallwachs, W., Jaffe, S. P., & Fierer, N. (2017). Caterpillars lack a resident gut microbiome. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 114(36), 9641–9646. <https://doi.org/10.1073/pnas.1707186114>
- Hannula, S. E., Zhu, F., Heinen, R., & Bezemer, T. M. (2019). Foliar-feeding insects acquire microbiomes from the soil rather than the host plant. *Nature Communications*, 10(1), 1–9. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-09284-w>
- Hashidoko, Y. (2005). Ecochemical studies of interrelationships between epiphytic bacteria and host plants via secondary metabolites. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 69(8), 1427–1441. <https://doi.org/10.1271/bbb.69.1427>
- Humphrey, P. T., Nguyen, T. T., Villalobos, M. M., & Whiteman, N. K. (2014). Diversity and abundance of phyllosphere bacteria are linked to insect herbivory. *Molecular Ecology*, 23(6), 1497–1515. <https://doi.org/10.1111/mec.12657>
- Humphrey, P. T., & Whiteman, N. K. (2020a). Insect herbivory reshapes a native leaf

- microbiome. *Nature Ecology and Evolution*, 4(2), 221–229. <https://doi.org/10.1038/s41559-019-1085-x>
- Humphrey, P. T., & Whiteman, N. K. (2020b). Insect herbivory reshapes a native leaf microbiome. *Nature Ecology and Evolution*, 4(2), 221–229. <https://doi.org/10.1038/s41559-019-1085-x>
- Itoh, H., Tago, K., Hayatsu, M., & Kikuchi, Y. (2018). Detoxifying symbiosis: Microbe-mediated detoxification of phytotoxins and pesticides in insects. *Natural Product Reports*, 35(5), 434–454. <https://doi.org/10.1039/c7np00051k>
- Jones, A. G., Mason, C. J., Felton, G. W., & Hoover, K. (2019). Host plant and population source drive diversity of microbial gut communities in two polyphagous insects. *Scientific Reports*, 9(1), 1–11. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-39163-9>
- Kaiser, W., Huguet, E., Casas, J., Commin, C., & Giron, D. (2010). Plant green-island phenotype induced by leaf-miners is mediated by bacterial symbionts. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 277(1692), 2311–2319. <https://doi.org/10.1098/rspb.2010.0214>
- Kariñho-Betancourt, E., Agrawal, A. A., Halitschke, R., & Núñez-Farfán, J. (2015). Phylogenetic correlations among chemical and physical plant defenses change with ontogeny. *New Phytologist*, 206(2), 796–806. <https://doi.org/10.1111/nph.13300>
- Korpita, T., Gómez, S., & Orians, C. M. (2014). Cues from a specialist herbivore increase tolerance to defoliation in tomato. *Functional Ecology*, 28(2), 395–401. <https://doi.org/10.1111/1365-2435.12184>
- Leite-Mondin, M., DiLegge, M. J., Manter, D. K., Weir, T. L., Silva-Filho, M. C., & Vivanco, J. M. (2021). The gut microbiota composition of *Trichoplusia ni* is altered by diet and may influence its polyphagous behavior. *Scientific Reports*, 11(1), 1–16. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-85057-0>
- Lindow, S. E., & Brandl, M. T. (2003). Microbiology of the Phyllosphere MINIREVIEW Microbiology of the Phyllosphere. *Applied and Environmental Microbiology*, 69(4), 1875–1883. <https://doi.org/10.1128/AEM.69.4.1875>
- Lü, J., Guo, W., Chen, S., Guo, M., Qiu, B., Yang, C., ... Pan, H. (2019). Host plants influence the composition of the gut bacteria in *Henosepilachna vigintioctopunctata*. *PLoS ONE*, 14(10). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0224213>
- Martínez y Díaz de Salas, M., Sandoval, Luis Hernández Pantoja Hernández, Y., Gómez Sánchez, M., Bárcenas Luna, R., & Cabrera Luna, A. (2017). *Guía ilustrada de la flora del Valle de Querétaro*.
- Mason, C. J. (2020). Complex Relationships at the Intersection of Insect Gut Microbiomes and Plant Defenses. *Journal of Chemical Ecology*, 46(8), 793–807. <https://doi.org/10.1007/s10886-020-01187-1>
- Mason, C. J., Couture, J. J., & Raffa, K. F. (2014). Plant-associated bacteria degrade defense chemicals and reduce their adverse effects on an insect defoliator. *Oecologia*, 175(3), 901–910. <https://doi.org/10.1007/s00442-014-2950-6>

- Mason, C. J., Jones, A. G., & Felton, G. W. (2018). Co-option of microbial associates by insects and their impact on plant–folivore interactions. *Plant Cell and Environment*, *42*, 1078–1086. <https://doi.org/10.1111/pce.13430>
- Mason, C. J., & Raffa, K. F. (2014). Acquisition and Structuring of Midgut Bacterial Communities in Gypsy Moth (Lepidoptera: Erebidae) Larvae. *Environmental Entomology*, *43*(3), 595–604. <https://doi.org/10.1603/en14031>
- Mayoral-Peña, Z., Álvarez-Martínez, R., Fornoni, J., & Garrido, E. (2020). *How microbes shape plant-insect interactions*. (Nuñez-Farfán & P. J. Valverde, Eds.). Springer, Cham. https://doi.org/https://doi.org/10.1007/978-3-030-46012-9_7
- Mayoral-peña, Z., Lázaro-Vidal, V., Fornoni, J., Álvarez-Martínez, R., & Garrido, E. (2022). Studying Plant – Insect Interactions through the Analyses of the Diversity , Composition , and Functional Inference of Their Bacteriomes. *Microorganisms*, *11*, 1–40.
- Mogouong, J., Constant, P., Legendre, P., & Guertin, C. (2021). The phyllosphere microbiome of host trees contributes more than leaf phytochemicals to variation in the *Agilus planipennis* Fairmaire gut microbiome structure. *Scientific Reports*, *11*(1), 1–15. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-95146-9>
- Moran, N. A., & Sloan, D. B. (2015). The Hologenome Concept: Helpful or Hollow? *PLoS Biology*, *13*(12), 1–10. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1002311>
- Newton, A. C., Gravouil, C., & Fountaine, J. M. (2010). Managing the ecology of foliar pathogens: Ecological tolerance in crops. *Annals of Applied Biology*, *157*(3), 343–359. <https://doi.org/10.1111/j.1744-7348.2010.00437.x>
- Pons, I., Renoz, F., Noël, C., & Hance, T. (2019). Circulation of the cultivable symbiont *Serratia symbiotica* in aphids is mediated by plants. *Frontiers in Microbiology*, *10*(MAR), 1–13. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00764>
- Poveda, J. (2021). Beneficial effects of microbial volatile organic compounds (MVOCs) in plants. *Applied Soil Ecology*. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2021.104118>
- Priya, N. G., Ojha, A., Kajla, M. K., Raj, A., & Rajagopal, R. (2012). Host plant induced variation in gut bacteria of *Helicoverpa armigera*. *PLoS ONE*, *7*(1), 1–10. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0030768>
- Robinson, C. J., Schloss, P., Ramos, Y., Raffa, K., & Handelsman, J. (2010). Robustness of the bacterial community in the cabbage white butterfly larval midgut. *Microbial Ecology*, *59*(2), 199–211. <https://doi.org/10.1007/s00248-009-9595-8>
- Rosenberg, E., & Zilber-Rosenberg, I. (2016). Microbes Drive Evolution of Animals and Plants: the Hologenome Concept. *American Society for Microbiology*, *7*(2), e01395-15. <https://doi.org/10.1128/mBio.01395-15>. Editor
- Salem, H., Kirsch, R., Pauchet, Y., Berasategui, A., Fukumori, K., Moriyama, M., ... Gerardo, N. M. (2020). Symbiont Digestive Range Reflects Host Plant Breadth in Herbivorous Beetles. *Current Biology*, *30*(15), 2875-2886.e4. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2020.05.043>

- Santos-Garcia, D., Mestre-Rincon, N., Zchori-Fein, E., & Morin, S. (2020). Inside out: microbiota dynamics during host-plant adaptation of whiteflies. *ISME Journal*, *14*(3), 847–856. <https://doi.org/10.1038/s41396-019-0576-8>
- Shikano, I., Olson, G. L., & Cory, J. S. (2015). Impact of non-pathogenic bacteria on insect disease resistance: Importance of ecological context. *Ecological Entomology*, *40*(5), 620–628. <https://doi.org/10.1111/een.12235>
- Smets, W., & Koskella, B. (2020). Microbiome: Insect Herbivory Drives Plant Phyllosphere Dysbiosis. *Current Biology*, *30*(9), R412–R414. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2020.03.039>
- Steinbrenner, A. D., Gómez, S., Osorio, S., Fernie, A. R., & Orians, C. M. (2011). Herbivore-Induced Changes in Tomato (*Solanum lycopersicum*) Primary Metabolism: A Whole Plant Perspective. *Journal of Chemical Ecology*, *37*(12), 1294–1303. <https://doi.org/10.1007/s10886-011-0042-1>
- Sugio, A., Dubreuil, G., Giron, D., & Simon, J. C. (2015). Plant-insect interactions under bacterial influence: Ecological implications and underlying mechanisms. *Journal of Experimental Botany*, *66*(2), 467–478. <https://doi.org/10.1093/jxb/eru435>
- Tsuchida, T., Koga, R., & Fukatsu, T. (2004). Host Plant Specialization Governed by Facultative Symbiont. *Science*, *303*(5666), 1989. <https://doi.org/10.1126/science.1094611>
- Višňovska, D., Pyszko, P., Šigut, M., Kostovíik, M., Kolaíik, M., Kotaskova, N., & Drozd, P. (2020). Caterpillar gut and host plant phylloplane mycobiomes differ: A new perspective on fungal involvement in insect guts. *FEMS Microbiology Ecology*, *96*(9). <https://doi.org/10.1093/femsec/fiaa116>
- Wang, J., Chung, S. H., Peiffer, M., Rosa, C., Hoover, K., Zeng, R., & Felton, G. W. (2016). Herbivore Oral Secreted Bacteria Trigger Distinct Defense Responses in Preferred and Non-Preferred Host Plants. *Journal of Chemical Ecology*, *42*(6), 463–474. <https://doi.org/10.1007/s10886-016-0712-0>
- Wielkopolan, B., & Obrępalska-Stęplowska, A. (2016). Three-way interaction among plants, bacteria, and coleopteran insects. *Planta*, *244*(2), 313–332. <https://doi.org/10.1007/s00425-016-2543-1>
- Yoon, A. S., Harrison, J., Philbin, C. S., Dodson, C. D., Jones, D. M., Wallace, I. S., ... Smilanich, A. M. (2019). Host plant - dependent effects of microbes and phytochemistry on the insect immune response. *Oecologia*. <https://doi.org/10.1007/s00442-019-04480-3>
- Zhang, S., Shu, J., Xue, H., Zhang, W., Zhang, Y., Liu, Y., ... Wang, H. (2020a). The Gut Microbiota in Camellia Weevils Are Influenced by Plant Secondary Metabolites and Contribute to Saponin Degradation. *MSystems*, *5*(2), 1–17. <https://doi.org/10.1128/msystems.00692-19>
- Zhang, S., Shu, J., Xue, H., Zhang, W., Zhang, Y., Liu, Y., ... Wang, H. (2020b). The Gut Microbiota in Camellia Weevils Are Influenced by Plant Secondary Metabolites and Contribute to Saponin Degradation. *MSystems*, *5*(2). <https://doi.org/10.1128/msystems.00692-19>

Anexo 1. Capítulo de libro publicado a partir de la revisión del capítulo 1

Mayoral-Peña, Z.; Álvarez-Martínez, R.; Fornoni, J.; Garrido, E. (2020). *The Extended Microbiota: How Microbes Shape Plant-Insect Interactions*. In: Núñez-Farfán, J., Valverde, P. (eds) *Evolutionary Ecology of plant-herbivore interaction*. Springer, Cham.

https://doi.org/10.1007/978-3-030-46012-9_7

Chapter 7

The Extended Microbiota: How Microbes Shape Plant-Insect Interactions



Zyanya Mayoral-Peña, Roberto Álvarez-Martínez, Juan Fornoni,
and Etzel Garrido

Abstract Microorganisms were the first forms of life on Earth and are now part of all living organisms, but the role they played during the evolution of multicellular species is still a mystery. Among other biotic interactions, plants and their herbivorous insects have always occurred under a microbial milieu. During the past 20 years, our understanding of how microorganisms shape the ecology and evolution of plant-insect interactions has increased rapidly. However, the extent to which plant-associated microbes influence insect performance and how insect-associated microbes influence plant defenses remains largely unexplored. Here, we will highlight the potential reciprocal feedbacks between the microbiotas of plants and insects that could affect their interaction. We also bring attention to how network theory can help us understand the potential interactions within and between microbiotas. Finally, we will point out some promising directions for future experimental studies in order to better understand microbe-insect-plant interactions.

Keywords Defense · Microbiota · Network theory · Plant-insect interactions · Resistance · Tolerance

Despite the historical pairwise perception of the coevolutionary process between plants and herbivorous insects, the environment surrounding plants and their consumers is far from sterile; thus all their interactions take place under a microbial milieu that can significantly alter the ecology and evolution of both plants and insects (Felton and Tumlinson 2008). Metagenomic studies have accelerated our understanding of the fundamental role played by microorganisms in the survival

Z. Mayoral-Peña · R. Álvarez-Martínez · E. Garrido (✉)
Unidad de Microbiología Básica y Aplicada, Facultad de Ciencias Naturales, Universidad
Autónoma de Querétaro, Santiago de Querétaro, Querétaro, Mexico
e-mail: etzel.garrido@uaq.mx

J. Fornoni
Departamento de Ecología Evolutiva, Instituto de Ecología, Universidad Nacional Autónoma
de México, Ciudad de México, Mexico

and adaptation of plants (Partida-Martínez and Heil 2011; Pineda et al. 2013) and their herbivorous insects (Chu et al. 2013; Chung et al. 2013; Asplen et al. 2014; Sharpton 2018). Nowadays, we also acknowledge that microorganisms can mediate biochemical communication between plants and insects (Hansen and Moran 2013). Indeed, the field of microbe-insect-plant interactions has been rapidly expanding over the past two decades with excellent reviews about the ecological implications of microorganisms (Biere and Bennet 2013; Biere and Tack 2013; Casteel and Hansen 2014; Sugio et al. 2015; Mason et al. 2019). However, the extent to which plant-associated microbes influence insect performance and how insect-associated microbes influence plant defenses remains largely unknown (but see Schausberger 2018 for induced resistance). Our aim is to provide a conceptual framework to fill this gap through the understanding of possible reciprocal feedbacks between the microbiotas of plants and insects that could affect their evolution. First, we will discuss how the holobiont concept came to be and whether this view actually helps us in understanding the ecology and evolution of hosts and their interactions. Next, we will review evidence about how the phyllosphere affects insect performance and possible feedbacks between the insect microbiota and plant defenses. We will finally point out how network theory can shed light into evaluating coevolutionary processes between the microbiotas of plants and insects.

From Microbes Through Holobionts to Plant-Insect Interactions

Our understanding of how microorganisms can shape the ecology and evolution of plant-insect interactions has been increasing rapidly since the last 20 years. However, along with all these advances came a general confusion in the terms and concepts frequently used in the context of the host-microbe interactions. The term holobiont was coined by Lynn Margulis (1990) to describe the intimacy between a host and its microbial symbiont. While this term was initially developed to explain the origin of eukaryotic cells, it was latter extended to include other obligatory symbioses (O'Malley 2017). At the beginning of this century, and under the umbrella of the hologenome theory of evolution, the term holobiont was redefined as a host (plant or animal) together with all its associated microorganisms upon which natural selection can operate (Zilber-Rosenberg and Rosenberg 2008; Theis et al. 2016; Rosenberg and Zilber-Rosenberg 2018). Along with this new view of holobionts, other concepts were commonly used although not always with the same meaning. Thus, in 2015 Marchesi and Ravel proposed clear definitions which we will follow throughout this review. The microbiota refers to the assemblage of microorganisms present in a defined host. The microbiome includes the host, all its microorganisms, their genomes, and the surrounding environmental conditions. The hologenome can then be defined as the sum of the genetic information of the host and its microbiota. While there is now plenty of evidence supporting the hologenome hypothesis of

evolution, whether the holobiont can function as an evolutionary unit is still under debate (Moran and Sloan 2015; Douglas and Werren 2016; Doolittle and Booth 2017; Doolittle and Inkpen 2018). Holobionts are indeed evolving units, but not evolutionary units upon which natural selection can act because a holobiont is better viewed as an ecological community with interactions that range from parasitic to mutualistic, with horizontal and vertical transmission and multiple levels of fidelity among the partners.

In considering the ecology and evolution of holobionts, the fidelity in the transmission of the microbiota along generations is of the most interest. It has been then proposed that the holobiont is constituted by resident microbiota (of vertical transmission), semi-resident microbiota (of vertical and horizontal transmission), and transient microbiota (of horizontal transmission) (Roughgarden et al. 2018). While all three types of microbiota can affect its host fitness (Zakharov 2015; Hurst 2017), the resident microbiota might be more important in evolutionary terms, while the transient microbiota represents an important source of variation affecting the host ecological interactions (Callens et al. 2018; Guégan et al. 2018). In this sense, it is interesting to note that a group of microbes appear to be shared and maintained among most individuals of a single population despite spatial and temporal variation (Roeselers et al. 2011; Lowe et al. 2012; Dougal et al. 2013; Astudillo-García et al. 2017; Kwong et al. 2017). This group of microbes has been termed the core microbiota (Shapira 2016), and while there is still no clear consensus on how to delimit or measure it (Shade and Handelsman 2012; Hurst 2017), considering its function rather than its composition could prove more insightful.

The core microbiota becomes more relevant if functional groups are considered, instead of taxonomic groups, because the latter gives no information about their contribution to the host phenotype (Doolittle and Booth 2017; Foster et al. 2017; Lemanceau et al. 2017). Moreover, considering the functional core microbiota implies that those transient or horizontally transmitted microbes could eventually replace those from the core without altering the host ecology and evolution. Thus, the presence of certain specific lineages of microbes would be sufficient to allow the functional assembly of the holobiont (Roughgarden et al. 2018). This functional contribution could then be relevant even when the microorganisms do not have a common evolutionary history with their host (Catania et al. 2017). Ultimately, the (extended) phenotype expressed by a particular host is the result of not only the presence of different microbes but also their functional contribution. Because this extended phenotype is the one that interacts with the consumers, the functional core microbiota will play a role in plant-insect evolution. Thus, in the context of plant-insect interactions, it is important to understand the effects of the microbiota on its host but also on how this host interacts with other organisms. If the presence/absence of specific lineages in the microbiota affects the fitness of either the plant, the herbivore, or both, a third-party player should be recognized in the battle between plants and herbivorous insects.

The Phyllosphere and Insect Performance

The surface of the leaves is the habitat for large and diverse microbial communities defined as phyllosphere (Ruinen 1956; Lindow and Brandl 2003; Vorholt 2012). All of these microbes are, at some point, inevitably consumed by the insects. While the impact of consuming entomopathogens has been the aim of several studies (Cory and Hoover 2006; Shikano 2017), little is still known about the possible effects of consuming nonpathogenic microbes. Recent evidence suggests that phyllosphere bacteria can indeed colonize the insect midgut (Mason and Raffa 2014; Bansal et al. 2011). Actually, it has been shown that the symbionts in the midgut of the gypsy moth *Lymantria dispar* are mostly obtained from its host plant (Broderick et al. 2004). However, few studies have evaluated the effect of the phyllosphere on insect performance. To our knowledge only two studies have specifically evaluated the effect of the phyllosphere on insect performance.

Shikano et al. (2015) evaluated the effect of two common bacterial colonizers of the phyllosphere (*Pseudomonas fluorescens* and *P. syringae*) on the performance, immunity, and resistance of the cabbage looper *Trichoplusia ni*. They found that consumption of the phyllosphere bacteria decreased larval growth rate but had no effect on immunity and, while the larval resistance to a baculovirus was not affected, resistance to pathogenic bacteria was concentration-dependent. The phyllosphere, however, can also have positive effects on larval performance. Larvae of the gypsy moth were bigger when consuming diet enriched with bacteria from the phyllosphere of the quaking aspen *Populus tremuloides* compared than when consuming diet enriched with bacteria previously isolated from their own guts (Mason et al. 2014). That is, bacteria that most benefitted larvae were initially foliar residents, suggesting that toxin-degrading abilities of phyllosphere inhabitants indirectly benefit herbivores upon ingestion (Mason et al. 2014). Interestingly, herbivory can in turn influence the phyllosphere. In the plant *Cardamine cordifolia*, the abundance of *Pseudomonas syringae* was higher in herbivore-damaged vs. herbivore-undamaged leaves, while *Pedobacter* spp. and *Pseudomonas fluorescens* infections were negatively associated with herbivory (Humphrey et al. 2014). All this evidence suggest that the composition and provenance of the microorganisms involved in the interaction between plants and insects should be identified before further experimental manipulation aimed at demonstrating their functional role.

The Gut Microbiota and Plant Defenses

In general, plant tissue consumption results in a reconfiguration of the primary and secondary metabolism. Several studies have reported that after damage, those processes related to the primary metabolism such as growth, photosynthesis, carbon assimilation, respiration, and reallocation of resources decrease (Zangerl et al. 2002; Schwachtje and Baldwin 2008), whereas the secondary metabolism,

responsible for the production of chemical defenses, increases (Kessler and Baldwin 2002). These physiological and metabolic changes are closely related to the expression of defensive mechanisms of tolerance and resistance, respectively. It is now recognized that the expression of tolerance is related to changes in primary metabolism that allow tolerant genotypes to reduce the negative effects of herbivory in terms of fitness (Strauss and Agrawal 1999; Stowe et al. 2000; Fornoni 2011). On the other hand, increases in resistance are given by changes in the production and abundance of various secondary metabolites that prevent or limit the loss of foliar tissue (Fritz and Simms 1992; Karban and Baldwin 1997). The triggering of signaling cascades that produce changes in both metabolisms can be either initiated by endogenous biochemical pathways that start when plant cells are damaged (Mithöfer and Boland 2008) or initiated by elicitors of microbial origin present in the regurgitant of herbivorous insects (Felton et al. 2014).

The regurgitant of many insects contains chemical compounds with eliciting properties. Among the substances found in the regurgitant are plant growth promoters such as auxins (Dyer et al. 1995), pectinases (Hori 1975), indoleacetic acid (Miles and Lloyd 1967), epidermal growth factors (Detling and Dyer 1981; Dyer et al. 1995), cytokinins that increase the photosynthetic rate (Giron et al. 2007; Kaiser et al. 2010; Halitschke et al. 2011), and transcription factors involved in the transport of carbon and nitrogen (Steinbrener et al. 2011) as well as in the reactivation of secondary meristems (Korpita et al. 2014). All these compounds have the potential to alter the tolerance response of plants through different mechanisms. Studies carried out with the tomato plant, *Solanum lycopersicum*, show that plants treated with *Manduca sexta* regurgitant recovered more quickly after a defoliation treatment by increasing their growth rate and the reactivation of secondary meristems (Korpita et al. 2014) probably because of metabolites involved in the transport of carbon and nitrogen that come in contact with the plant cells via the regurgitant (Steinbrener et al. 2011). Some other studies have shown an effect of the regurgitant on plant traits, but the identity and origin of the particular elicitors are still unknown. For example, in the tobacco plant *Nicotiana attenuata*, it was found that damage by the moth *M. sexta* decreases the photosynthetic rate; however, when consumed by the hemipteran *Tupiocoris notatus*, a specific induction of elevated photosynthetic activity was shown (Halitschke et al. 2011). To our knowledge only one study has indeed shown that the gut endosymbionts are responsible for the production of these elicitors. Such is the case of the Lepidoptera *Phyllonorycter blancardella*, in which its endosymbionts such as *Wolbachia* spp. produce cytokinins that are deposited on the leaves, via regurgitation, leading to the formation of photosynthetically active “green patches” on damaged leaves (Kaiser et al. 2010). If a general pattern where the gut microbiota participates actively in the production of those compounds present in the regurgitant that triggers some tolerance-related trait, it is still to be confirmed.

On the other hand, there is also evidence that the regurgitant contains elicitors related to resistance mechanisms such as glucose oxidase (Diezel et al. 2009), polyphenol oxidases (Major and Constabel 2006; Ma et al. 2010), and proteinase inhibitors (Korth and Dixon 1997). The presence of such elicitors can sometimes decrease

(Bede et al. 2006; Lawrence et al. 2008; Weech et al. 2008; Chung and Felton 2011; Chung et al. 2013) or increase plant resistance (Spiteller et al. 2000; Musser et al. 2002; Ping et al. 2007; Diezel et al. 2009). Many studies have even identified the microbial symbionts known to be responsible for affecting plant resistance. The bacterium *Hamiltonella defensa* is a facultative endosymbiont of the whitefly *Bemisia tabaci*, and it is involved in the suppression of JA in tomato plants (Su et al. 2015). Also, in the tomato plant, the larvae of the Colorado potato beetle, *Leptinotarsa decemlineata*, exploit bacteria in their oral secretions to decrease the production of JA and JA-responsive antiherbivore defenses (Chung et al. 2013). In the same study system, applying bacteria isolated from larval oral secretions to wounded plants confirmed that three microbial symbionts belonging to the genera *Stenotrophomonas*, *Pseudomonas*, and *Enterobacter* were responsible for defense suppression (Chung et al. 2013).

Interestingly, the effects of the bacterial symbionts on plant resistance seem to be host-dependent. For example, bacterial isolates from oral secretions of the false potato beetle *Leptinotarsa juncta* belonging to the genera *Pantoea*, *Acinetobacter*, *Enterobacter*, and *Serratia* were found to suppress polyphenol oxidase activity in the non-preferred host tomato, while only *Pantoea* sp. was observed to suppress the same activity in the preferred host horsenettle (Wang et al. 2016). There is even evidence of potential trade-offs among resistance traits mediated by bacterial symbionts. The bacterium *Pantoea ananatis*, isolated from the oral secretions of the armyworm *Spodoptera frugiperda*, downregulates the activity of the proteins polyphenol oxidase and trypsin proteinase inhibitors, but upregulates the peroxidase activity in the tomato plant (Acevedo et al. 2017). In turn, plant chemical defense can also affect the composition and structure of the insect microbial community. In the trembling aspen, *Populus tremuloides*, phenolic glycosides and condensed tannins affected the relative abundances of *Ralstonia* and *Acinetobacter* in the midgut of the gypsy moth *Lymantria dispar* (Mason et al. 2015). Taken together, these examples show the potential feedbacks between insect microbial communities and plant resistance. However, future studies should be designed to specifically test reciprocal feedbacks between the gut microbiota and plant resistance. Overall, all the evidence points at microorganisms modulating the expression of tolerance and resistance mechanisms against herbivory. We visualized two approaches that can complement each other to disentangle the evolutionary role of plant and insect microbiotas: network theory and experimental studies.

Network Theory and Interactions Among Microbiotas

Over the last 20 years, it has been recognized the value and importance of networks in a myriad of applications in biology. The concepts and tools developed from graph theory have provided new insights into evolutionary ecology as well as a valuable conceptual framework to address new challenges. Fundamental concepts from ecological systems – such as communities – to networks of biological interactions

among their components provide a way to summarize large amounts of information within single objects. Perhaps, one of the most successful examples of the application of network theory in biology is plant science where key regulators, functional modules, and novel phenotypes have been identified through gene regulatory networks (Álvarez-Buylla et al. 2007). In the field of microbial evolution, network theory has been used to identify new targets for probiotic treatments (Lemon et al. 2012), find the most influential biotic and abiotic factors that structurally change the structure of the microbial community (Fisher and Mehta 2014), and distinguish the topological properties of microbial networks between health and disease states (Sánchez et al. 2017; Sommer et al. 2017). Microbial networks thus constitute a heuristic tool that could help us model and understand the complexity of the interactions within the microbiota and among microbiotas of interacting hosts.

In general, ecological networks can be divided in static or dynamic networks. Static networks focus on the study of its topological properties: measures of centrality (the relative importance of the nodes, each node representing a particular microorganism), the distribution of links to other nodes (degree distribution), identifying modules or clusters, and finding overrepresented or recurrent subgraphs (motifs). These kinds of networks are useful because they take into account any binary dependence between the elements, that is, the presence-absence of interactions among species. Weighted networks are a generalization of static networks, adding to the edges a measure of the relevance or certainty of its links. This value can be represented by the frequency or the strength of the different interactions. On the other hand, dynamical or evolving networks represent not only the species (i.e., microorganisms) and the topology/strength of the interactions but also the dynamic nature of the whole system (i.e., the holobiont). However, these kinds of networks are more difficult to infer from empirical data because they need a detailed and specific information almost never available. Due to the fact that static networks are much easier to obtain from data, the ample majority of ecological networks belong to this kind.

In microbiome studies, particular approaches have been adapted and combined to infer co-occurrence networks of OTUs, interaction networks, and a new multi-network approach involving networks of microorganisms with its host. In a seminal paper, Gould and collaborators (2018) mapped the interactions between individual species of bacteria against several fitness traits of its hosts, the fruit fly. They showed that the same bacterial interactions that shape microbial abundances in the microbiota also determine the fly fecundity. In a recent study, Huitzil et al. (2018) proposed an evolutionary computational model in which a network representing the host can adapt in order to perform a predefined function related to its host. In this model, the host network interacts with its microbial network, and these complex interactions can explain the presence of dysbiosis, specialization, and microbial diversity.

One of the most important goals in microbial networks is to identify the so-called keystone taxa in microbial communities and to determine the factors that influence its function in a given environment. The dominant taxa could be the most abundant or the most important, structurally speaking, in terms of the topology of the network. In an extraordinary example, Flores et al. (2013) observed that complex

networks between host and parasites or between bacteria and phages are at the same time, but at different scales, modular and nested. This observation suggests that different evolutionary regimes operate at different scales. The next natural step would be to integrate various layers of information via multiple single networks. This approach is called multilayer networks or multi-networks and could be defined as an amalgamation of networks that interact and evolve with each other (Bianconi 2018). Multilayer network applied to whole holobionts and to the interactions among holobionts could be an extremely valuable tool in understanding microbe-insect-plant interactions. Each one of these networks (plant microbiota network and insect microbiota network) will then form a meta-network, which will undoubtedly be a more realistic approach to the study of ecological interactions among holobionts. Thus, multilayer networks have the potential to take into account multitrophic interactions (Mirzaei and Maurice 2017).

Experimental Studies

To date most studies about microbe-insect-plant interactions have concentrated on the description of the microbiotas within multicellular species as well as in the sources of possible environmental regulation. One of the major assumptions behind these studies is that microorganisms directly affect the survival, performance, and fitness of their hosts as well as the interactions between hosts and other community members. Correlative evidence support this premise but have not yet identified the functional role of most microbial lineages. If microorganisms have the potential to regulate the ecological and evolutionary dynamics between plants and insects, then our technological efforts to reduce or control herbivory levels should not neglect the effects of microorganisms. Pests are usually controlled with the use of insecticides and/or genetically modified crops, whereas the manipulation of microorganisms within plants or insects is still underdeveloped. We highlight two experimental approximations that can shed light into the functional role of microorganisms within the context of a plant-insect interaction. First, performing cross-infection experiments (i.e., reciprocal transplants) of microorganisms from different host populations or environmental conditions can provide relevant information on their role for plant and insect coadaptation to each other. These kinds of experiments are also fundamental to differentiate the relative importance of natural selection and genetic drift in the conformation and function of the microbial communities. Second, experiments where the microbiota composition is manipulated, either the presence/absence or the relative abundance of certain microorganisms, can identify their functional role on the plant-insect interaction. These experimental approximations, among others, will demonstrate whether the understanding and manipulation of plants and insects require the recognition that the evolution of the interaction depends not only upon the plant and insect genetics within a specific environmental context but also on the microbiome as well.

Acknowledgments We want to thank the GMEE group for fruitful discussions about biotic interactions. This work was supported by grants from FOFI-UAQ 2018 (Programa: 205014190826, Fondo: 1299) to RAM, PAPIIT IN 210617 to JF, and FNB-2019-05 to EG.

References

- Acevedo FE, Peiffer M, Tan CW, Stanley BA, Stanley A, Wang J, Jones AG, Hoover K, Rosa C, Luthe D, Felton G (2017) Fall armyworm-associated gut bacteria modulate plant defense responses. *Mol Plant-Microbe Interact* 30:127–137
- Alvarez-Buylla ER, Benitez M, Dávila EB, Chaos A, Espinosa-Soto C, Padilla-Longoria P (2007) Gene regulatory network models for plant development. *Curr Opin Plant Biol* 10:83–91
- Asplen MK, Bano N, Brady CM, Desneux N, Hopper KR, Malouines C, Oliver KM, White JA, Heimpel GE (2014) Specialisation of bacterial endosymbionts that protect aphids from parasitoids. *Ecol Entomol* 39:736–739
- Astudillo-García C, Bell JJ, Webster NS, Glasl B, Jompa J, Montoya JM, Taylor MW (2017) Evaluating the core microbiota in complex communities: a systematic investigation. *Environ Microbiol* 19:1450–1462
- Bansal R, Hulbert S, Schemerhorn B, Reese JC, Whitworth RJ, Stuart JJ, Chen MS (2011) Hessian fly-associated bacteria: transmission, essentiality, and composition. *PLoS One* 6:e23170
- Bede JC, Musser RO, Felton GW, Korth KL (2006) Caterpillar herbivory and salivary enzymes decrease transcript levels of *Medicago truncatula* genes encoding early enzymes in terpenoid biosynthesis. *Plant Mol Biol* 60:519–531
- Bianconi G (2018) Multilayer networks: structure and function. Oxford University Press, Oxford
- Biere A, Bennet AE (2013) Three-way interactions between plants, microbes and insects. *Funct Ecol* 27:567–573
- Biere A, Tack AJM (2013) Evolutionary adaptation in three-way interactions between plants, microbes and arthropods. *Funct Ecol* 27:646–660
- Broderick NA, Raffa KF, Goodman RM, Handelsman J (2004) Census of the bacterial community of the gypsy moth larval midgut by using culturing and culture-independent methods. *Appl Environ Microbiol* 70:293–300
- Callens M, Watanabe H, Kato Y, Miura J, Decaestecker E (2018) Microbiota inoculum composition affects holobiont assembly and host growth in *Daphnia*. *Microbiome* 6:56
- Casteel CL, Hansen AK (2014) Evaluating insect-microbiomes at the plant-insect interface. *J Chem Ecol* 40:836–847
- Catania F, Krohs U, Chittò M, Ferro D, Ferro K, Lepennetier G, Görtz HD, Schreiber RS, Kurtz J, Gadau J (2017) The hologenome concept: we need to incorporate function. *Theory Biosci* 136:89–98
- Chu CC, Spencer JL, Curzi MJ, Zavala JA, Suefferheld MJ (2013) Gut bacteria facilitate adaptation to crop rotation in the western corn rootworm. *Proc Natl Acad Sci* 110:11917–11,922
- Chung SH, Felton GW (2011) Specificity of induced resistance in tomato against specialist lepidopteran and coleopteran species. *J Chem Ecol* 37:378–386
- Chung SH, Rosa C, Scully ED, Peiffer M, Tooker JF, Hoover K, Luthe DS, Felton GW (2013) Herbivore exploits orally secreted bacteria to suppress plant defenses. *Proc Natl Acad Sci* 110:15728–15733
- Cory JS, Hoover K (2006) Plant-mediated effects in insect-pathogen interactions. *Trends Ecol Evol* 21:278–286
- Detling JK, Dyer MI (1981) Evidence for potential plant growth regulators in grasshoppers. *Ecology* 62:485–488
- Diesel C, von Dahl CC, Gaquerel E, Baldwin IT (2009) Different lepidopteran elicitors account for cross-talk in herbivory-induced phytohormone signaling. *Plant Physiol* 150:1576–1586

- Doolittle WF, Booth A (2017) It's the song, not the singer: an exploration of holobiosis and evolutionary theory. *Biol Philos* 32:5–24
- Doolittle WF, Inkpen SA (2018) Processes and patterns of interaction as unit of selection: and introduction to ITSNTS thinking. *Proc Natl Acad Sci* 115:4006–4014
- Dougal K, de la Fuente G, Harris PA, Girdwood SE, Pinloche E, Newbold CJ (2013) Identification of a core bacterial community within the large intestine of the horse. *PLoS One* 8:1–12
- Douglas AE, Werren JH (2016) Holes in the hologenome: why host-microbe symbioses are not holobionts. *Am Soc Microbiol* 7:e02099–e02015
- Dyer MI, Moon AM, Brown MR, Crossley DA (1995) Grasshopper crop and midgut extract effects on plants: an example of reward feedback. *Proc Natl Acad Sci* 92:5475–5478
- Felton GW, Tumlinson JH (2008) Plant-insect dialogs: complex interactions at the plant-insect interface. *Curr Opin Plant Biol* 11:457–463
- Felton GW, Chung SH, Estrada-Hernández MG, Louis J, Peiffer M, Tian D (2014) Herbivore oral secretions are the first line of protection against plant-induced defences. *Annu Plant Rev* 47:37–76
- Fisher CK, Mehta P (2014) Identifying keystone species in the human gut microbiome from metagenomic time-series using sparse linear regression. *PLoS One* 9:e102451
- Flores CO, Valverde S, Weitz JS (2013) Multi-scale structure and geographic drivers of cross-infection within marine bacteria and phages. *ISME J* 7:520–532
- Fornoni J (2011) Ecological and evolutionary implications of plant tolerance to herbivory. *Funct Ecol* 25:399–407
- Foster KR, Schluter J, Coyte KZ, Rakoff-Nahoum S (2017) The evolution of the host microbiome as an ecosystem on a leash. *Nature* 548:43–51
- Fritz RS, Simms EL (1992) *Plant resistance to herbivores and pathogens: ecology, evolution and genetics*. Chicago University Press, Chicago
- Giron D, Kaiser W, Imbault N, Casas J (2007) Cytokinin-mediated leaf manipulation by a leafminer caterpillar. *Biol Lett* 3:340–343
- Gould AL, Zhang V, Lamberti L, Jones EW, Obadia B, Korasidis N, Gavryushkin A, Carlson JM, Beerenwinkel N, Ludington WB (2018) Microbiome interactions shape host fitness. *Proc Natl Acad Sci* 115:E11951–E11960
- Guégan M, Zouache K, Démichel C, Minard G, Van VT, Potier P, Mavingui P, Moro CV (2018) The mosquito holobiont: fresh insight into mosquito-microbiota interactions. *Microbiome* 6:49
- Halitschke R, Hamilton JG, Kessler A (2011) Herbivore-specific elicitation of photosynthesis by mirid bug salivary secretions in the wild tobacco *Nicotiana attenuata*. *New Phytol* 191:528–535
- Hansen AK, Moran NA (2013) The impact of microbial symbionts on host plant utilization by herbivorous insects. *Mol Ecol* 23:1473–1496
- Hori K (1975) Pectinase and plant growth-promoting factors in the salivary glands of the larva of the bug, *Lygus disponsi*. *J Insect Physiol* 21:1271–1274
- Huitzil S, Sandoval-Motta S, Frank A, Aldana M (2018) Modeling the role of the microbiome in evolution. *Front Physiol* 9:1836
- Humphrey PT, Nguyen TT, Villalobos MM, Whiteman NK (2014) Diversity and abundance of phyllosphere bacteria are linked to insect herbivory. *Mol Ecol* 23:1497–1515
- Hurst GDD (2017) Extended genomes: symbiosis and evolution. *Interface Focus* 7:20170001
- Kaiser W, Hugué E, Casas J, Commin C, Giron D (2010) Plant green-island phenotype induced by leaf-miners is mediated by bacterial symbionts. *Proc R Soc B* 277:2311–2319
- Karban R, Baldwin IT (1997) *Induced responses to herbivory*. Chicago University Press, Chicago
- Kessler A, Baldwin IT (2002) Plant responses to insect herbivory: the emerging molecular analysis. *Annu Rev Plant Biol* 53:299–328
- Korpita T, Gómez S, Orians CM (2014) Cues from a specialist herbivore increase tolerance to defoliation in tomato. *Funct Ecol* 28:395–401
- Korth KL, Dixon RA (1997) Evidence for chewing insect-specific molecular events distinct from a general wound response in leaves. *Plant Physiol* 115:1299–1305

- Kwong WK, Medina LA, Koch H, Sing KW, Soh EJY, Ascher JS, Jaffé R, Moran NA (2017) Dynamic microbiome evolution in social bees. *Sci Adv* 3:e1600513
- Lawrence SD, Novak NG, Ju CJT, Cooke JEK (2008) Potato, *Solanum tuberosum*, defense against Colorado potato beetle, *Leptinotarsa decemlineata* (Say): microarray gene expression profiling of potato by Colorado potato beetle regurgitant treatment of wounded leaves. *J Chem Ecol* 34:1013–1025
- Lemanceau P, Blouin M, Muller D, Moënne-Loccoz Y (2017) Let the core microbiota be functional. *Trends Plant Sci* 22:583–595
- Lemon KP, Armitage GC, Relman DA, Fischbach MA (2012) Microbiota-targeted therapies: an ecological perspective. *Sci Transl Med* 4:137rv5
- Lindow SE, Brandl MT (2003) Microbiology of the phyllosphere. *Appl Environ Microbiol* 69:1875–1883
- Lowe B, Marsh T, Isaacs-Cosgrove N, Kirkwood R, Kiupel M, Mulks M (2012) Defining the “core microbiome” of the microbial communities in the tonsils of healthy pigs. *BMC Microbiol* 12:20
- Ma R, Chen JL, Cheng DF, Sun JR (2010) Activation of defense mechanism in wheat by polyphenol oxidase from aphid saliva. *J Agric Food Chem* 58:2410–2418
- Major IT, Constabel CP (2006) Molecular analysis of poplar defense against herbivory: comparison of wound- and insect elicitor-induced gene expression. *New Phytol* 172:617–635
- Marchesi JR, Ravel J (2015) The vocabulary of microbiome research: a proposal. *Microbiome* 3:31
- Margulis L (1990) Words as battle cries: symbiogenesis and the new field of endocytobiology. *Bioscience* 40:673–677
- Mason CJ, Raffa KF (2014) Acquisition and structuring of midgut bacterial communities in gypsy moth (Lepidoptera: Erebidae) larvae. *Environ Entomol* 43:595–604
- Mason CJ, Couture JJ, Raffa KF (2014) Plant-associated bacteria degrade defense chemicals and reduce their adverse effects on an insect defoliator. *Oecologia* 175:901–910
- Mason CJ, Rubert-Nason KF, Lindroth RL, Raffa KF (2015) Aspen defense chemicals influence midgut bacterial community composition of gypsy moth. *J Chem Ecol* 41:75–84
- Mason CJ, Jones AG, Felton GW (2019) Co-option of microbial associates by insects and their impact on plant-herbivore interactions. *Plant Cell Environ* 42:1078–1086
- Miles PW, Lloyd J (1967) Synthesis of a plant hormone by the salivary apparatus of plant-sucking Hemiptera. *Nature* 213:801–802
- Mirzaei MK, Maurice CF (2017) Ménage à trois in the human gut: interactions between host, bacteria and phages. *Nat Rev Microbiol* 15:397–408
- Mithöfer A, Boland W (2008) Recognition of herbivory-associated molecular patterns. *Plant Physiol* 146:825–831
- Moran NA, Sloan DB (2015) The hologenome concept: helpful or hollow? *PLoS Biol* 13:1–10
- Musser RO, Hum-Musser SM, Eichenseer H, Peiffer M, Ervin G, Murphy JB, Felton GW (2002) Caterpillar saliva beats plant defences. *Nature* 416:599–600
- O’Malley MA (2017) From endosymbiosis to holobionts: evaluating a conceptual legacy. *J Theor Biol* 434:34–41
- Partida-Martínez LP, Heil M (2011) The microbe-free plant: fact or artifact? *Front Plant Sci* 2:100
- Pineda A, Dicke M, Pieterse CJ, Pozo MJ (2013) Beneficial microbes in changing environment: are they always helping plants to deal with insects? *Funct Ecol* 27:574–586
- Ping L, Büchler R, Mithöfer A, Svatoš A, Spiteller D, Dettner K, Gmeiner S, Piel J, Schlott B, Boland W (2007) A novel Dps-type protein from insect gut bacteria catalyses hydrolysis and synthesis of N-acyl amino acids. *Environ Microbiol* 9:1572–1583
- Roeselers G, Mittge EK, Stephens WZ, Parichy DM, Cavanaugh CM, Guillemin K, Rawls JF (2011) Evidence for a core gut microbiota in the zebrafish. *ISME J* 5:1595–1608
- Rosenberg E, Zilber-Rosenberg I (2018) The hologenome concept of evolution after 10 years. *Microbiome* 6:78

- Roughgarden J, Gilbert SF, Rosenberg E, Zilber-Rosenberg I, Lloyd EA (2018) Holobionts as units of selection and a model of their population dynamics and evolution. *Biol Theory* 13:44–65
- Ruinen J (1956) Occurrence of *Beijerinckia* species in the ‘phyllosphere’. *Nature* 177:220–221
- Sánchez B, Delgado S, Blanco-Míguez A, Lourenço A, Gueimonde M, Margolles A (2017) Probiotics, gut microbiota, and their influence on host health and disease. *Mol Nutr Food Res* 61:1600240
- Schausberger P (2018) Herbivore-associated bacteria as potential mediators and modifiers of induced plant defense against spider mites and thrips. *Front Plant Sci* 9:1107
- Schwachtje J, Baldwin IT (2008) Why does herbivore attack reconfigure primary metabolism? *Plant Physiol* 146:845–851
- Shade A, Handelsman J (2012) Beyond the Venn diagram: the hunt for a core microbiome. *Environ Microbiol* 14:4–12
- Shapira M (2016) Gut microbiotas and host evolution: scaling up symbiosis. *Trends Ecol Evol* 31:539–549
- Sharpton TJ (2018) Role of the gut microbiome in vertebrate evolution. *mSystems* 3:e00174–e00117
- Shikano I (2017) Evolutionary ecology of multitrophic interactions between plants, insect herbivores and entomopathogens. *J Chem Ecol* 43:586–598
- Shikano I, Olson GL, Cory JS (2015) Impact of non-pathogenic bacteria on insect disease resistance: importance of ecological context. *Ecol Entomol* 40:620–628
- Sommer F, Anderson JM, Bharti R, Raes J, Rosenstiel P (2017) The resilience of the intestinal microbiota influences health and disease. *Nat Rev Microbiol* 15:630–638
- Spiteller D, Dettner K, Boland W (2000) Gut bacteria may be involved in interactions between plants, herbivores and their predators: microbial biosynthesis of N-acylglutamine surfactants as elicitors of plant volatiles. *Biol Chem* 381:755–762
- Steinbrenner AD, Gómez S, Osorio S, Fernie AR, Orians CM (2011) Herbivore-induced changes in tomato (*Solanum lycopersicum*) primary metabolism: a whole plant perspective. *J Chem Ecol* 37:1294–1303
- Stowe KA, Marquis RJ, Hochwender CG, Simms EL (2000) The evolutionary ecology of tolerance to consumer damage. *Annu Rev Ecol Syst* 31:565–595
- Strauss SY, Agrawal AA (1999) The ecology and evolution of plant tolerance to herbivory. *Trends Ecol Evol* 14:179–185
- Su Q, Oliver KM, Xie W, Wu Q, Wang S, Zhang Y (2015) The whitefly-associated facultative symbiont *Hamiltonella defensa* suppresses induced plant defences in tomato. *Funct Ecol* 29:1007–1018
- Sugio A, Dubreuil G, Giron D, Simon JC (2015) Plant-insect interactions under bacterial influence: ecological implications and underlying mechanisms. *J Exp Bot* 66:467–478
- Theis KR, Dheilly NM, Klassen JL, Brucker RM, Baines JF, Bosch TCG, Cryan JF, Gilbert SF, Goodnight CJ, Lloyd EA, Sapp J, Vandenkoornhuyse P, Zilber-Rosenberg I, Rosenberg E, Bordenstein SR (2016) Getting the hologenome concept right: an eco-evolutionary framework for hosts and their microbiomes. *mSystems* 1:e00028–e00016
- Vorholt JA (2012) Microbial life in the phyllosphere. *Nat Rev Microbiol* 10:828–840
- Wang J, Chung SH, Peiffer M, Rosa C, Hoover K, Zeng R, Felton GW (2016) Herbivore oral secreted bacteria trigger distinct defense responses in preferred and non-preferred host plants. *J Chem Ecol* 42:463–474
- Weech MH, Chapleau M, Pan L, Ide C, Bede JC (2008) Caterpillar saliva interferes with induced *Arabidopsis thaliana* defence responses via the systemic acquired resistance pathway. *J Exp Bot* 59:2437–2448
- Zakharov IA (2015) Intracellular symbionts as a factor of insect evolution. *Biol Bull Rev* 5:99–108
- Zangerl AR, Hamilton JG, Miller TJ, Crofts AR, Oxborough K, Berenbaum MR, de Lucia EH (2002) Impact of folivory on photosynthesis is greater than the sum of its holes. *Proc Natl Acad Sci* 99:1088–1091
- Zilber-Rosenberg I, Rosenberg E (2008) Role of microorganisms in the evolution of animals and plants: the hologenome theory of evolution. *FEMS Microbiol Rev* 32:723–735

Anexo 2. Artículo científico publicado a partir de los resultados del Capítulo 2

Mayoral-Peña, Zyanya, Víctor Lázaro-Vidal, Juan Fornoni, Roberto Álvarez-Martínez, and Etzel Garrido (2023). Studying Plant–Insect Interactions through the Analyses of the Diversity, Composition, and Functional Inference of Their Bacteriomes *Microorganisms* 11, no. 1: 40.

<https://doi.org/10.3390/microorganisms11010040>



Article

Studying Plant–Insect Interactions through the Analyses of the Diversity, Composition, and Functional Inference of Their Bacteriomes

Zyanya Mayoral-Peña¹, Víctor Lázaro-Vidal¹, Juan Fornoni² , Roberto Álvarez-Martínez^{1,*} and Etzel Garrido^{1,*}

¹ Unidad de Microbiología Básica y Aplicada, Facultad de Ciencias Naturales, Universidad Autónoma de Querétaro, Santiago de Querétaro 76123, Mexico

² Departamento de Ecología Evolutiva, Instituto de Ecología, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad de México 04510, Mexico

* Correspondence: roberto.alvarez@uaq.edu.mx (R.Á.-M.); etzel.garrido@uaq.edu.mx (E.G.)

Abstract: As with many other trophic interactions, the interchange of microorganisms between plants and their herbivorous insects is unavoidable. To test the hypothesis that the composition and diversity of the insect bacteriome are driven by the bacteriome of the plant, the bacteriomes of both the plant *Datura innoxia* and its specialist insect *Lema daturaphila* were characterised using 16S rRNA gene amplicon sequencing. Specifically, the bacteriomes associated with seeds, leaves, eggs, guts, and frass were described and compared. Then, the functions of the most abundant bacterial lineages found in the samples were inferred. Finally, the patterns of co-abundance among both bacteriomes were determined following a multilayer network approach. In accordance with our hypothesis, most genera were shared between plants and insects, but their abundances differed significantly within the samples collected. In the insect tissues, the most abundant genera were *Pseudomonas* (24.64%) in the eggs, *Serratia* (88.46%) in the gut, and *Pseudomonas* (36.27%) in the frass. In contrast, the most abundant ones in the plant were *Serratia* (40%) in seeds, *Serratia* (67%) in foliar endophytes, and *Hymenobacter* (12.85%) in foliar epiphytes. Indeed, PERMANOVA analysis showed that the composition of the bacteriomes was clustered by sample type ($F = 9.36$, $p < 0.001$). Functional inferences relevant to the interaction showed that in the plant samples, the category of Biosynthesis of secondary metabolites was significantly abundant (1.4%). In turn, the category of Xenobiotics degradation and metabolism was significantly present (2.5%) in the insect samples. Finally, the phyla Proteobacteria and Actinobacteriota showed a pattern of co-abundance in the insect but not in the plant, suggesting that the co-abundance and not the presence–absence patterns might be more important when studying ecological interactions.

Keywords: bacteriomes; co-abundance networks; diversity; foliar microbiota; functional inference; gut microbiota; plant–insect interaction



Citation: Mayoral-Peña, Z.; Lázaro-Vidal, V.; Fornoni, J.; Álvarez-Martínez, R.; Garrido, E. Studying Plant–Insect Interactions through the Analyses of the Diversity, Composition, and Functional Inference of Their Bacteriomes. *Microorganisms* **2023**, *11*, 40. <https://doi.org/10.3390/microorganisms11010040>

Academic Editor: Xiao-Wei Wang

Received: 4 November 2022

Revised: 13 December 2022

Accepted: 20 December 2022

Published: 22 December 2022



Copyright: © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

Plants and their herbivorous insects have always interacted under a microbial milieu that allows the constant and reciprocal exchange of all the microorganisms associated with both interacting species [1–4]. Because the presence of all these microorganisms is not innocuous, their effects extend to the ecology and evolution of their hosts as well as their ecological interactions [1]. Indeed, over the past years, excellent reviews about the ecological and evolutionary implications of microorganisms on plant–insect interactions have been published [5–8]. However, most of the studies to date have focused on describing the microbiota within individual multicellular hosts, either plants or insects. They have not yet identified the functional role of most microbial lineages. Here, we aim to expand our understanding of plant–insect interactions by simultaneously studying their bacteriomes

to assess possible patterns of co-abundances among bacterial strains belonging to the core microbiome of both organisms that might be important in the interaction.

Overall, the microbiota refers to all the microorganisms associated with a given host, and it is composed of different taxonomic groups such as bacteria, fungi, algae, viruses, archaea, and, less frequently, nematodes and protozoa [9,10]. However, in both plants and insect herbivores, the most abundant group is bacteria [10,11], thus the term bacteriome is preferred when characterising only the bacterial groups [12]. Those microorganisms associated with the aerial parts of a plant constitute the phyllosphere which can be further classified into the endosphere (microbes residing within the tissue) and the phylloplane (microbes residing on the surface) [13,14]. In turn, the microorganisms that reside within the tissues of an insect are called endogenous, while those on the surface of their bodies are exogenous microbes [15]. Recent studies have described the microbiota associated with both plants and insects, but when evaluating its potential effects, the same studies have only focused on one of the interacting species [16–18]. That is, the role of the microorganisms has been traditionally studied in terms of its effects on the survival and adaptation of each host but not in terms of understanding the ecological interaction between the hosts. If reciprocal effects between the foliar and gut bacteriomes have the potential to shape plant–insect interactions [19–22], a new player must be considered as part of the co-evolutionary arena. Thus, studying possible associations and interactions among the bacteriomes of both plants and insects might help us understand the ecology and evolution of the interaction.

The phyllosphere is, at some point, inevitably consumed by phytophagous insects. Recent evidence suggests that phyllosphere bacteria can indeed colonise the insect gut [23–26], become part of the transient gut microbiota [25,27] and affect insect survival and performance [19,28–30] by facilitating detoxification and nutrient acquisition [10,20,31]. Most of the transient gut microbiota come from the foliar tissue consumed and is usually excreted in the faeces [32]. Thus, the composition of the intestinal microbiota can be affected by the food source, the host genotype, the composition of the egg microbiota, and the biogeographic region it inhabits [24,33–35]. Indeed, it has been suggested that diet plays a relevant role in the composition of the gut microbiota of various insects [16,17,36,37]. In turn, it has been shown that the gut microbiota affects the pattern and intensity of foliar damage [2,38] as well as the diversity and composition of the phyllosphere [39,40] via the incorporation of some insect-associated microbes by the plant [41,42]. Moreover, the gut bacteriome can alter the expression of putative mechanisms of plant defence [43–45]. It has been shown that the microbiota associated with the oral secretions of the insects reduces the levels of induced plant defences, favouring food intake [1,2]. Therefore, microorganisms can alter the expression of plants and insect traits involved in their reciprocal evolutionary responses. After consumption, insect frass might come into contact with the surface of the leaves, and it has been shown that certain bacterial strains can be effectively transferred to the surface of neighbouring leaves or plants [46]. Whether this kind of phyllosphere transfer is possible throughout frass contact remains to be tested (but see [47]).

The aim of the study was threefold. First, to describe and compare the diversity and composition of the bacteriome associated with the seeds and leaves of the host plant *Datura innoxia* and the bacteriome associated with the eggs, gut, and frass of its specialist insect, *Lema daturaphila*. Given the nature of the interaction, we hypothesize a high degree of overlap in the composition of both sets of bacteriomes because the foliar tissue—along with all the microbes associated with it—is necessarily consumed by the larvae. However, differences in the abundance of those shared bacterial strains are expected. Second, to determine the functional inferences of the most abundant bacterial families. Finally, to assess the patterns of co-abundance and analyse the spatial dynamic of both sets of bacteriomes following a multilayer network approach. To our knowledge, this is the first attempt to characterize the diversity, the patterns of co-abundance, and the spatial dynamics of the bacteriomes associated with both hosts to shed light into their ecological interaction.

2. Materials and Methods

2.1. Study System and Sample Collection

Lema daturaphila Kogan & Goeden (Coleoptera: Chrysomelidae) is the specialist herbivorous insect of *Datura inoxia* L., an annual plant belonging to the Solanaceae. Under natural conditions, *D. inoxia* typically grows in disturbed areas, forming uneven patches, and during the peak season, an individual plant can experience more than 80% of foliar loss due to the presence of *L. daturaphila* (personal observation). Both the eggs and larvae of the beetle can be parasitised. In the eggs, the presence of a specialist wasp has been reported [48], and the larvae of all stages can be parasitized by either a generalist fly (Diptera: Tachinidae) or a specialist wasp (Hymenoptera: Ichneumonidae) [49]. All the biological samples used in this study were collected from a natural population in the municipality of El Marqués, Querétaro, México (20.66° N, 100.32° W). During the months of August and September of 2019, the following samples were collected: ten undamaged leaves and five unripe fruits from each of four healthy plants, as well as all the clusters of eggs and larvae of all developmental stages found in the same plants and neighbouring plants. All the samples were kept on ice and taken to the laboratory to be processed.

In a flux cabinet, epiphytes from seeds and leaves were recovered with a phyllosphere removal buffer (6.75 g of KH₂PO₄, 8.75 g of K₂HPO₄, and 1 mL of Triton X-100 per litre, 1 min) and a 0.9% NaCl solution (1 min). Phyllosphere pellets were then obtained by centrifugation and stored at -80 °C prior to DNA extraction. To obtain endophytes, the samples were then surface-sterilised with serial washes: 70% ethanol (2 min), 10% sodium hypochlorite (1 min), and four final washes with sterile water (2 min each) (modified from [50]). To validate our epiphyte-removal procedure, the leaves and seeds were then imprinted in Petri dishes filled with TSA medium. The dishes were incubated at 28 °C and checked for one month for any microbial growth. Finally, seed coats were manually removed, and approximately 270 mg of uncoated seeds and 580 mg of leaves per plant (from our four biological replicates each) were stored at -80 °C prior to DNA extraction.

To assure that all the insect samples were not parasitised, a colony was initiated with the eggs and larvae collected from the field and maintained under laboratory conditions (12L:12D photoperiod, 25 °C, fed with plants from the same population, without the presence of parasitoids or pathogens). Once there were plenty of eggs in our colony (late October), we collected four biological samples, each consisting of three to four clutches (approximately fifty eggs in total). To remove the exogenous microbes, the eggs were placed in 1.5 mL tubes and washed with Microdacyn (OCULUS, Sodium < 55 ppm, and Chlorine < 80 ppm) for 15 min and with sterile water for 30 min. Prior to dissecting the larvae, the exogenous microbes were removed following the same procedure as the one for epiphytes removal. Only third- and fourth-instar larvae were dissected to obtain their entire guts. All dissections were performed in a flux cabinet. Four biological samples were taken, each consisting of around ten to fifteen guts. Finally, during October, all the frass produced by fourth-instar larvae of our colony was collected daily with the use of a brush, and four biological samples consisting of approximately 250–300 mg were kept at 80 °C until DNA extraction.

2.2. DNA Extraction and Generation of 16S rRNA Amplicons

Epiphytes from seeds and leaves were centrifuged at 10,000 rpm for 3 min, the supernatant was removed, and the resultant pellet was diluted to a final volume of 2 mL. Genomic DNA was then extracted using a DNeasy blood and tissue kit (QIAGEN, Germantown, MD, USA) following the manufacturer's instructions. Endophyte samples were first macerated in liquid nitrogen, and genomic DNA was extracted using a DNeasy PowerSoil kit (QIAGEN, Germantown, MD) following the manufacturer's instructions. Surface-sterilised eggs and entire guts were macerated in liquid nitrogen. DNA extraction from eggs was done following the protocol described by [51]. Genomic DNA from guts was extracted using a DNeasy blood and tissue kit (QIAGEN, Germantown, MD) following the manufacturer's instructions. Finally, extraction of genomic DNA from frass samples was done with slight

modifications of the IHMS procedure described by [52]. For all the samples, the v3-v4 hypervariable region of the 16S rRNA gene was sequenced in a 250 bp paired-end run using the Illumina Miseq platform. Sequencing was carried out at the Instituto Nacional de Medicina Genómica (INMEGEN), México.

2.3. Data Analyses

All statistical and bioinformatics analyses, as well as all plots were done using R and its libraries [53]. Raw sequencing data were processed following the DADA2 pipeline [54]. Because of the low Phred quality, it was decided to work only with the forward reads. The Phred quality threshold was 20, and the length of the sequences was 230 pb. The Silva 16S rRNA (release 138 [55,56]) database was used for taxonomic identification. The diversity of the different samples was estimated using the Rényi profile implemented in the vegan v. 2.5–7 package [57], and the results were plotted using ggplot2 v. 3.3.2 [58]. The Rényi diversity profile summarises various aspects of alpha diversity such as richness, dominance, and equity [59]. When calculating the Rényi profile, if the value of alpha tends to 1, 2, and infinity, it behaves like the Shannon–Weaver diversity index, the logarithm of the reciprocal Simpson diversity index, and the Berger–Parker diversity index, respectively. Thus, if a Rényi profile of a particular sample is consistently higher, it is considered as the most diverse, and those profiles that tend to be horizontal suggest that the species are distributed with less equity. From the Rényi profiles, the Shannon diversity index and richness values of the different samples were then compared with an ANOVA test. The phylogenetic diversity of the samples was estimated using the picante v. 1.8.2 package [60]. To visualise possible dissimilarities among bacterial communities, an RDA was performed using the Bray–Curtis distances [61]. For this, a logarithmic transformation of the data was first made, and a PERMANOVA analysis was then carried out. To test for significant differences in the abundances of the bacteria present in the samples, a Wald’s parametric test was performed using the DEseq2 function from the phyloseq package v. 1.32.0 [62]. Considering those ASVs with abundances greater than 10% in the samples processed, the functional inference analysis was done using the tax4fun2 package v. 1.1.5 [63]. Differences in the functional categories among samples were tested with an ANOVA and a Kruskal–Wallis test.

Finally, the co-abundance networks were inferred and built following a multilayer network approach using the igraph [64] and MuxViz [65] R-packages. In a multilayer network, co-abundances are represented by edges connecting nodes, which represent the individual species in the community. The thickness of the edges represents the strength of the co-abundance relationship between the species, with thicker edges indicating a stronger relationship. This type of network can be useful for visualising the relationships between species in a microbial community and for identifying potential interactions or correlations between them. Overall, studying co-abundances in a multilayer network can provide valuable insights into the complex interactions within a microbial community. Both networks were inferred from the abundance tables using SparCC and SPIEC-EASI from the SpiecEasi R-package [66]. SparCC (Sparse Correlations for Compositional data) estimates the linear Pearson correlations between the log-transformed components of the abundance table, represented as nodes in the network. The algorithm does not assume that the data must have a normal distribution and is very robust about the assumption that the interconnectivity is sparse [67]. On the other hand, SPIEC-EASI (SParse Inverse Covariance Estimation for Ecological Association Inference) estimates the interaction network by neighbourhood selection or by sparse inverse covariance selection, assuming that interconnectivity between nodes is low. This method avoids the detection of indirect correlations [66]. The networks were coloured at the phylum level before adding them to the multilayer networks using the MuxViz package.

3. Results

3.1. Composition and Diversity of the Bacteriomes

From 21 samples, 84,444 high-quality and filtered read sequences and 3021 ASVs were analysed, with a median of 3452 reads and 146 ASVs per sample (Table S1). The following taxonomic categories were identified from the ASV sequences: 100% to phylum, 99.37% to class, 94.25% to order, 88.91% to family, and 69.98% to genus. After removing chloroplasts and mitochondria, the number of ASVs identified in the seed and foliar endophyte samples were low (Table S1, Figure S1). Thus, these samples were not included in some of the analyses, mainly in those comparing the diversity and abundance of the bacterial communities.

According to the Rényi profile, foliar epiphytes had the highest diversity of all the bacterial communities analysed (Figure 1A), while the communities associated with the gut and frass had ASVs that are considered dominant (Figure 1A). For the alpha diversity, the ranges observed for total ASVs were 100–294, for the Shannon index were 3.02–5.09, and for the Faith PD index were 1.89–10.24 (Figure 1B–D). The richness ($p < 0.0001$) and diversity ($p = 0.0017$) of the gut samples were significantly lower compared with those of the other samples (Figure 1B). The bacterial community associated with the episphere had the highest Faith PD index and the highest number of taxa but in lower abundance ($p < 0.0001$) (Figure 1D). In contrast, the gut and frass samples had the lowest diversity (Figure 1D), with the genus *Serratia* dominating in the gut samples and *Pseudomonas* dominating in the frass samples (Figure S2).

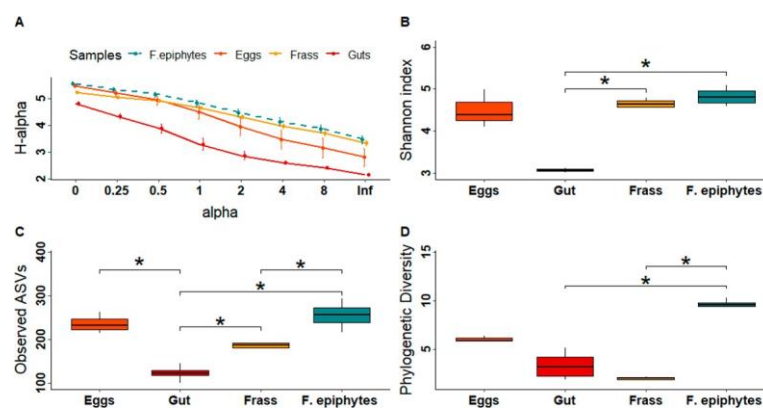


Figure 1. Distribution of alpha diversity in samples collected from the plant *D. innoxia* and its specialist insect *L. daturaphila*. (A) Comparison of the Rényi profiles of bacterial communities considering the total number of ASVs. Alpha values of 0, 1, 2, and infinity correspond to the species richness, Shannon diversity index, the logarithm of the reciprocal Simpson diversity index and Berger–Parker diversity index, respectively. Each colour represents a different sample. Solid lines correspond to insect samples, while dotted lines correspond to plant samples. (B) Richness. (C) Index of Shannon. (D) Phylogenetic diversity. Endophyte and seed samples were not included in this analysis, given the relatively small number of ASVs identified. Asterisks denote significant differences following an ANOVA test ($p < 0.05$).

The most abundant phyla identified in the plant samples were Proteobacteria (71.1%), Actinobacteriota (17.3%), Firmicutes (0.44%), and Bacteroidota (6.57%). At the genus level, eight, eighty-five, and six genera were identified in the seed endophytes, foliar epi-, and endophyte, respectively. Specifically, the most abundant genera in the seed endophyte samples were *Serratia* (40%), *Pantoea* (27.9%), and *Pseudomonas*/*Streptomonas* (20%). As for the foliar epiphytes, the most abundant genera were *Hymenobacter* (12.85%), *Pseudomonas* (6.49%), and *Sphingomonas* (7.65%), while in the foliar endophytes they were *Serratia* (67%), *Escherichia*/*Shigella* (50%), *Janthinobacterium* (50%), *Stenotrophomonas* (50%), and *Microvirga* (50%) (Figure 2). On the other hand, the most abundant phyla detected in the insect samples were Proteobacteria (92.79%), Actinobacteriota (3.11%),

Firmicutes (2.43%), and Bacteroidota (1.34%). From the total of 77 genera identified, only the twelve most abundant represented 70.2% of the total readings (Figure 3). Seventy-one, 56, and 24 genera were identified in the eggs, gut, and frass, respectively. The most abundant genera in the eggs were *Pseudomonas* (24.64%), *Escherichia/Shigella* (18.59%), and *Stenotrophomonas* (4.08%). In the gut, the most abundant were *Serratia* (88.46%), *Escherichia/Shigella* (15.69%), and *Kosakonia* (0.36%). In the frass, *Pseudomonas* (36.27%), *Pantoea* (10.22%) and *Serratia* (7.18%) were the most abundant ones (Figure 2).

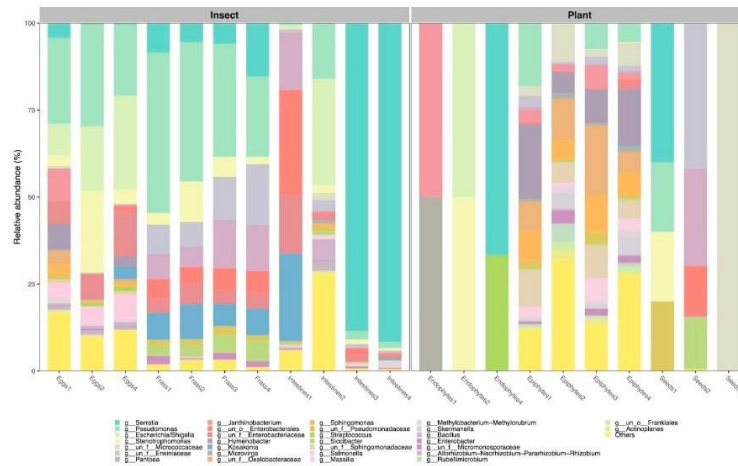


Figure 2. Taxonomic composition of the 12 most abundant bacterial genera of the plant *D. innoxia* and its specialist insect *L. daturaphila*. In the insect, it represented 70.2%, while in the plant, it corresponded to 56.3% of the total readings.

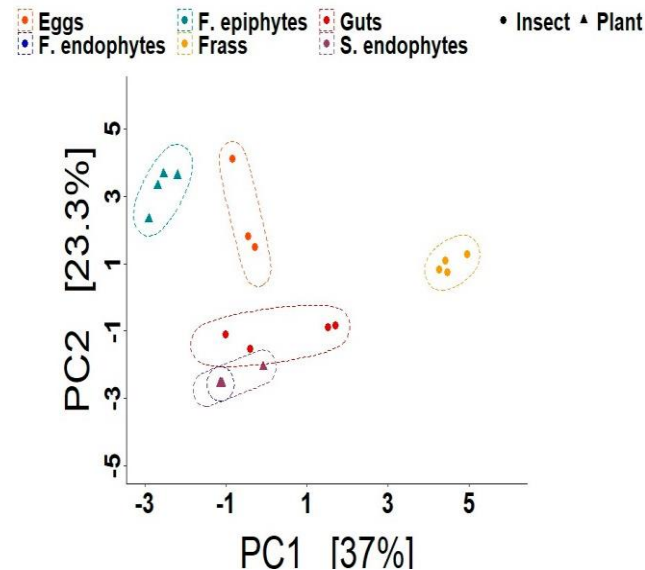


Figure 3. Beta diversity analysis for the samples of *L. daturaphila* (eggs, gut, and frass) and *D. innoxia* (foliar epiphytes). Principal component analysis (PCA) plot based on the Bray–Curtis distance of the ASVs. Each colour represents the bacteriome community in a single type of sample. The symbols represent the origin of the samples: plants or insects. The enclosing ellipses are estimated using the *Khachiyan* algorithm. Endophyte and seed samples were not included in this analysis, given the relatively small number of ASVs identified.

Overall, the PCA showed that the bacteriomes were grouped by type of sample (Figure 3), and significant differences were detected among them via a PERMANOVA ($F = 9.36, p < 0.001$). Interestingly, the endophytes from seeds and leaves overlapped (Figure 3). Moreover, the gut samples were closer to both endophytes from the seeds

and leaves than from any other insect sample, while frass samples were the most distant from the rest (Figure 3). Further comparisons among bacteriomes showed ASVs and genera shared between the different samples (Figures S3 and S4). Specifically, genera like *Azomonas*, *Bacillus*, *Brucella*, *Serratia*, *Pantoea*, *Pseudomonas*, *Roseomonas*, *Lawsonella*, *Microvirga*, and *Enterobacter* were present in the foliar epiphytes as well as in the eggs and gut, albeit in different abundances (Table S2). Several genera like *Azomonas*, *Enterobacter*, *Kosakonia*, *Massilia*, *Pantoea*, *Pseudomonas*, *Serratia*, *Siccibacter*, and *Stenotrophomonas* were shared between the epiphytes, gut, and frass. In contrast, *Methylobacterium-Methylorubrum*, *Bacillus*, *Hymenobacter*, *Escherichia-Shigella*, *Sphingomonas*, *Skermanella*, *Janthinobacterium*, and *Lechevalieria* were shared between the epiphytes and gut but were absent from the frass samples (Table S2).

3.2. Functional Inference of the ASVs Found in the Samples

In both plant and insect samples, 330 KEGG Orthology groups (KOs) at level 1 were identified. From the 41 categories at level 2 of KEGG, only 21 were related to plant–insect interactions, and the rest were classified as “Others”. Those 21 categories grouped at level 2 belonged to four categories at level 3 which were Metabolism, Cellular process, Genetic information processing, and Environmental information processing. However, most of the predicted functions belonged to the Metabolism category, suggesting that one of the main functions of the microorganisms associated is related to the metabolism of their hosts. Specifically, the most abundant categories (mean \pm sd) at level 2 were Global and overview maps (eggs: 35.21 \pm 0.03; gut: 35.38 \pm 0.81; frass: 34.8 \pm 0.12; seeds: 36.87 \pm 3.36; foliar endophytes: 34.24 \pm 2.03; foliar epiphytes: 36.35 \pm 0.27); Carbohydrate metabolism (eggs: 9.6 \pm 0.46; gut: 10.47 \pm 0.45; frass: 9.1 \pm 0.27; seeds: 10.14 \pm 1.33; foliar endophytes: 9.72 \pm 1.37; foliar epiphytes: 9.09 \pm 0.13), and Amino acid metabolism (eggs: 9.2 \pm 0.38; gut: 8.38 \pm 0.9; frass: 9 \pm 0.19; seeds: 8.83 \pm 1.08; foliar endophytes: 8.49 \pm 0.44; foliar epiphytes: 9.14 \pm 0.07). On contrary, the least abundant categories were Transcription (eggs: 0.063 \pm 0.002; gut: 0.067 \pm 0.008; frass: 0.06 \pm 0.001; seeds: 0.07 \pm 0.008; foliar endophytes: 0.06 \pm 0.014; foliar epiphytes: 0.069 \pm 0.0006) and Transport and catabolism (eggs: 0.24 \pm 0.020; gut: 0.19 \pm 0.03; frass: 0.20 \pm 0.016; seeds: 0.17 \pm 0.05; foliar endophytes: 0.22 \pm 0.004; foliar epiphytes: 0.3 \pm 0.01) (Figure 4). The functions of Cellular process, Genetic information processing, and Environmental information processing are mainly related to the survival and development of the bacteria. In contrast, the Metabolism category also includes functions that could be relevant to the plant–insect interaction such as the synthesis of secondary metabolites, enzymes related to carbohydrate metabolism, and the degradation of xenobiotics.

Interestingly, the level 2 category of Metabolism of terpenoids and polyketides had the highest abundance in foliar epiphytes relative to all other samples but eggs (Kruskal–Wallis, $p = 0.00004$). At level 1 specifically, the most abundant categories in the epiphytes were Sesquiterpenoid and triterpenoid biosynthesis (ANOVA, $p > 0.01$; Figure 5A), Biosynthesis of terpenoids and steroids (ANOVA, $p > 0.01$; Figure 5B), Monoterpenoid biosynthesis (ANOVA, $p > 0.001$; Figure 5C), and Indole alkaloid biosynthesis (ANOVA, $p > 0.01$; Figure 5D). In contrast, in the samples of eggs, gut, and frass, the level 1 category Drug metabolism—other enzymes had higher abundance than the category Drug metabolism—cytochrome p450 (t -test, $p > 0.05$; Figure 5F).

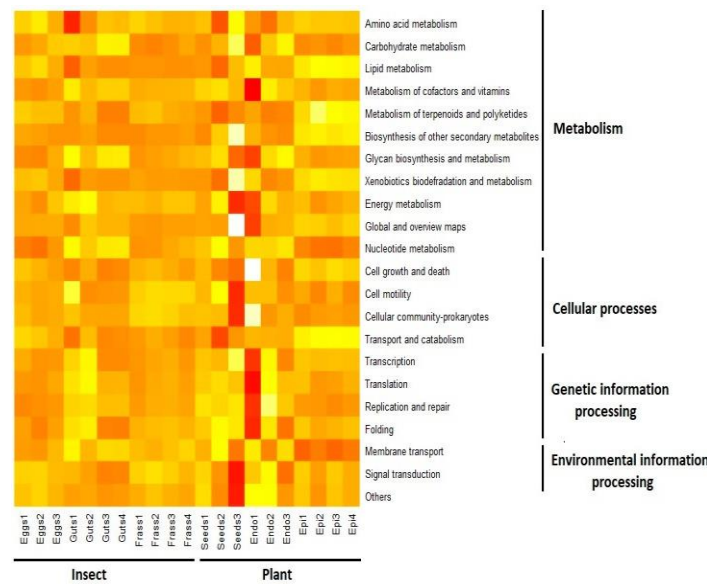


Figure 4. Heatmap of the functional categories inferred from samples collected from the plant *D. innoxia* and its specialist insect *L. daturaphila*. Each column corresponds to a sample, and rows correspond to a specific functional category. The lightest colours represent the highest values, while darker colours correspond to the lowest values.

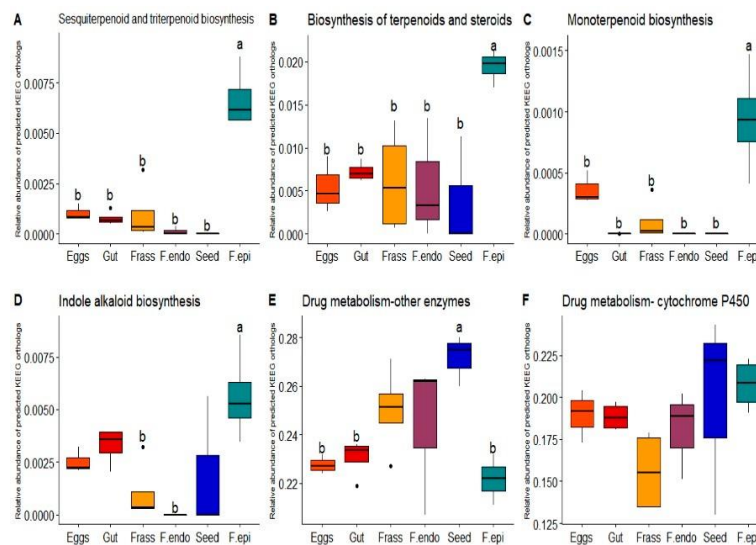


Figure 5. Relative abundances of KEGG orthologs (KOs) at level 1 involved drug metabolism of other enzymes, cytochrome p450, an indole alkaloid, sesquiterpenoid, and terpenoid, monoterpenoid biosynthesis, aminobenzoate degradation, geraniol degradation, and other glycan degradation inferred from samples of the plant *D. innoxia* and its specialist insect *L. daturaphila*. Different letters denote significant differences following a *t*-test ($p < 0.05$).

3.3. Co-Abundance Networks

Following a multilayer network approach, the co-abundance networks for both the plant and the insect were also inferred (Figure 6). The network connections correspond to the co-abundance patterns. That is, if two nodes are connected, they have similar abundance profiles in the different samples, and the thickness of the connection lines indicates the similarity of these abundances. Building a multilayer network allow us to simultaneously visualise how the correlations in abundance changes among the bacterial strains associated with both interacting hosts. In any insect–plant interaction where the microbiota of the insects is evidently affected by the microbiota of the leaves they are consuming,

multilayer networks help us detect patterns and changes in the co-abundance profiles of the bacteria associated with both hosts. In the samples processed, Proteobacteria was the most abundant and most connected phyla in both networks (Figure 6, red nodes). The second most abundant phyla were Actinobacteria and Firmicutes. Both phyla belonged to the core cluster, showing that the presence of both phyla was correlated. In other words, the abundance of one phylum affects the abundance of the other and vice versa. Surprisingly, we found that in the insect co-abundance network, the connection pattern between Proteobacteria and Actinobacteriota was common, but in the plant co-abundance network, this pattern was not evident. These differences in connectivity within the networks could be explained because communities associated with the fecal matter of the insect *L. daturaphila* (mainly Proteobacteria, red nodes in Figure 6) were found in both networks inferred from the samples. In addition, nitrogen-fixing bacterial communities (Cyanobacteria, blue nodes in Figure 6) were found to be unique to the plant tissues sampled, which suggest a mutualistic interaction. However, some connections with the Cyanobacteria phylum were absent or there was no direct connection (i.e., co-abundance pattern) in the plant network as was the case between Chloroflexi, Cyanobacteria, and Proteobacteria (top three nodes in both networks), suggesting that the abundances of those other phyla could affect the dynamic within the bacterial communities associated with the plant *D. inoxia*.

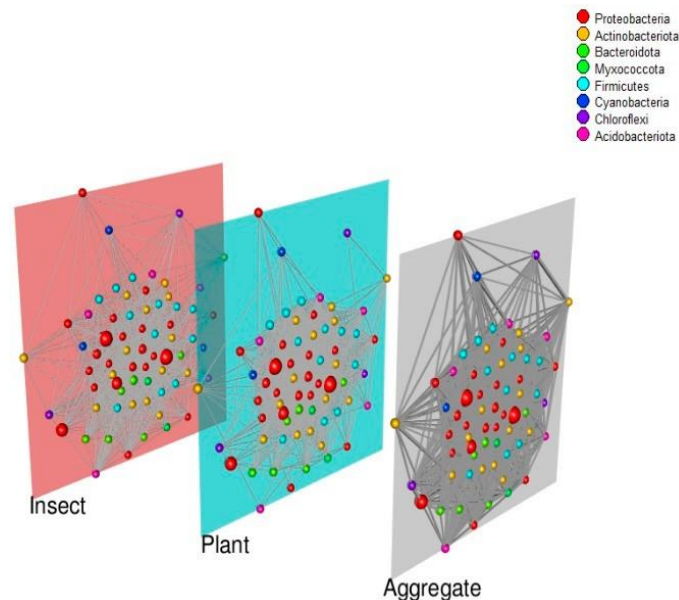


Figure 6. Multilayer network showing the co-abundances among bacterial phyla in the plant *D. inoxia* and its specialist insect *L. daturaphila*. The colours of the nodes correspond to the phylum level, and their sizes are proportional to their abundance in the different samples. Layers depicted the co-abundance networks inferred by the algorithm SPIEC-EASI. The third layer is the resulting aggregate network, where the links are the sum of the weighted individual connections, and the size of the nodes is the sum of the abundances.

4. Discussion

4.1. The Composition and Diversity of the Plant and Insect Bacteriomes

The foliar epiphytes of *D. inoxia* had the highest Richness and Faith PD indices, probably because of the continuous exposure to microorganisms associated with soil, air, and water [68]. Among the most abundant genera in the phyllosphere were *Hymenobacter* and *Sphingomonas*, which are common in urban patches [69]. Other genera like *Pseudomonas*, *Methylobacterium*, *Massilia*, *Aureimonas*, *Listeria*, *Staphylococcus*, and *Pantoea* had been previously reported as part of the phyllosphere of plants belonging to the Solanaceae family, to which *D. inoxia* also belongs [70–72]. Interestingly, the phyllosphere had the highest value in phylogenetic diversity, but the abundances of its ASVs were low. It has

been shown that interactions among different bacterial strains already colonising the leaves affect the establishment of new strains [15], thus the incorporation of new microorganisms into the phyllosphere is not stochastic. Moreover, the oligotrophic environment of the leaf surface [73] might also alter the composition and abundance of the phyllosphere.

The egg bacteriome of *L. daturaphila* was more diverse than the one from the gut, probably because the gut environment is more selective [74,75]. However, in other species such as *Copris incertus* and *Brithys crini*, no significant differences are observed in the bacterial diversity associated with both eggs and gut [76,77]. The gut bacteriome was the least diverse and the one with the greatest variation between samples. Other studies have found that the environment and the soil microbiome affect the composition of the gut bacteriome [16,31,78]. Thus, it is possible that variation in the foliar tissue used to maintain our insect colony was the source for such variation among gut samples [3,21,42,79]. Differences in the composition of the gut bacteriome have important ecological implications, given their direct effect on insect survival and performance [16,19,23,42,80,81]. Finally, the phylogenetic diversity was the lowest in the frass samples, given that *Pseudomonas* was the most dominant genus. It has been suggested that the frass microbiota must reflect the intestinal one [82]. In this study, however, this pattern was not found, but significant differences were detected not only in the composition but also in the abundance of both bacteriomes, as other studies have shown [79]. The presence of *Bacillus* in the frass bacteriome is interesting because it has been shown to promote the production of volatile alkyl disulphides that act as attractants [20].

When comparing the composition and abundances of the plant and insect bacteriomes, the egg bacteriome resembled that of the foliar epiphytes, suggesting that, as a result of the interaction, some microorganisms associated with the plant have the potential to reach the germ cells of the insect, ensuring their permanence and incorporation [20]. Among the genera present in both plants and insects were *Serratia* and *Pseudomonas*. Interestingly, the presence of these genera in plants has been shown to affect their development [3,83], while in insects, they can be obligate symbionts of entomopathogens [84–87]. Moreover, *Serratia* is also known to promote an anaerobic environment in the gut, which could favour the presence of specific strains over others [88]. While *Enterobacter*, *Stenotrophomonas*, *Pseudomonas*, and *Sphingomonas* were also present in both plant and insect tissues, they were all more abundant in the plant, where they are known to affect the expression of plant defences [42] and protect against pathogens [70–73]. It is possible that the presence of all these genera in the insect tissues is the result of their direct interaction with their host plant. Whether these microorganisms affect insect performance remains to be tested.

4.2. Functional Inferences of the ASVs Found in the Samples

The functional inferences obtained from the samples collected indicate that the bacteriomes of the plant *D. inoxia* and its specialist insect *L. daturaphila* mainly contribute to their host's metabolisms, as has been reported previously for other plants [89,90] and insects [76,91]. In particular, the bacteriome associated with the insect samples collected mainly contributed to the Carbohydrate metabolism function, which is relevant because foliar consumption involves the degradation of polysaccharides, a process in which the gut microbiota is known to participate [92,93]. Functions related with the metabolism of starch and sucrose were also detected, which again are relevant in the interaction because both polymers are the main storage products in leaves [94]. In addition, β -glucosidase enzymes were detected, which has been linked to the degradation of cellulose [95] and has been detected in the bacteriomes of other insects [75–95]. These enzymes were also detected in the epiphytes, which protect plants against herbivores [96]. In addition to carbohydrate metabolism, functions related to the metabolism of different amino acids like alanine, tyrosine, glutathione, glutamine, and glutamate were detected [90,91,97–99]. Specifically, the bacteriomes contribute to the metabolism of cofactors, vitamins, and lipids, thus contributing to the number of nutrients in their hosts. Given that the vegetative tissue does not always provide herbivores with the necessary nutrients, it has been proposed

that the gut microbiota might contribute to the efficiency of food consumption [91,93] with possible benefits for the insect.

The bacteriome associated with the plant tissues participates in the production of secondary metabolites as well as proteases which all reduce the amount of damage caused by herbivores [8,100]. The biosynthesis of secondary metabolites such as monoterpenes, sesquiterpenes, and triterpenes was higher in epiphytes. In other studies, the potential of epiphytes in the production of secondary metabolites was also reported [100,101]. In addition to the terpenes, the biosynthesis of alkaloids was found, among which was the biosynthesis of an indole alkaloid and tropane in both the plant and the insect. Although tropane was not significantly higher in the plant than in the insect, it is known that tropane is one of the primary secondary metabolites detected in *D. inoxia*. In *D. stramonium*, it is known to participate in the resistance mechanisms against herbivores [102–104]. In addition to secondary metabolites, the presence of enzymes such as inhibitors of cysteine peptidase, which protect plants from some insect larvae [105], was inferred. Those enzymes were mainly seen in plant epiphytes. Therefore, the bacteriome associated with the epiphytes could contribute to the resistance mechanisms of plants. In this sense, the magnitude of the impact of some epiphytic metabolites on the survival or performance of *L. daturaphila* could be empirically evaluated in the future, given that as part of the arms race and local adaptation patterns, the bacteriome associated with the insect might improve its detoxification mechanisms [5]. In turn, it would be interesting to evaluate the quantitative relevance provided by the bacteriome in the production of secondary metabolites. Because the amounts produced by the foliar bacteriome are probably low and might not contribute to host performance, it is still possible that the production of these secondary metabolites promotes the expression of plant genes related to the production of secondary metabolites.

Functions relevant in the interaction, like those related to the degradation of xenobiotics [76,91,106,109], were also found. In this category, some enzymes that were detected in the epiphytes as well as in the insect were cytochrome p450, dye-decolourizing peroxidase (DyP), and glutathione-S-transferase (GST), all of which have been previously reported in plants [110,111] and insects [91,112]. In plants, cytochrome p450 enzymes regulate the synthesis of allelochemicals [110]. The microbial activity of this enzyme could increase plant defence because allelochemicals affect the assimilation of nutrients [113,114]. It is also possible that the epiphytic community, which also participates in the synthesis of this enzyme, might contribute to the detoxification mechanisms in the insect [21,107]. Other enzymes that could be involved are the dye-decolourizing peroxidase (DyP), glutathione-S-transferase (GST), and phenol oxidases that participate in the degradation of toluene or xylene [91]. One of the many functions attributed to the gut microbiota is the degradation of xenobiotics [3,25,91,93], thus, the efficiency of detoxification mechanisms might be better understood as the result of the interaction between these enzymes in both the plant and the insect [92,108,115,116].

4.3. Co-Abundance Networks

In the multilayer networks built for this study, one layer corresponds to the co-abundance network among bacterial strains present in all the tissues of the insect, and the second layer shows the same kind of network but in the plant. In the last decade, we have acknowledged that multilayer networks represent a powerful tool to study a large variety of ecological systems like plant–pollinator or plant–microbe interactions [117], but, to our knowledge, no study to date has built multilayer networks to study plant–insect interactions. In the case for the interaction between the plant *D. inoxia* and its specialist insect *L. daturaphila*, most phyla and genera were present in both the plant and the insect samples processed, but their abundances and connectivity within the networks were different. In other words, the abundance of certain phyla was correlated in the insect but not in the plant. Whether this differential co-abundance pattern has consequences in terms of the ecological interactions among the bacterial strains remains unknown.

Specifically, in the plant network, clusters of bacteria formed by the Chloroflexi, Cyanobacteria, and Proteobacteria phyla were associated with functions like nitrogen fixation. These bacterial communities, however, were absent in the insect tissues, indicating that these bacterial strains might be plant-specific (Figure 6). Moreover, these phyla were correlated within the plant co-abundance network, suggesting their importance in establishing mutualistic interactions with the plant. The nitrogen fixation by bacterial species such as *Azotobacter*, *Clostridium*, or *Rhizobium* has been reported to be of vital importance in plant growth [118]. Some of the genera found exclusively in the plant tissues like *Pseudomonas* [119], *Pantoea* [120], and *Siccibacter* [121] have been associated with nitrogen fixation and auxin biosynthesis [122]. It should be noted that rhizobacteria such as *Bacillus amyloliquefaciens* and *Pseudomonas putida* can promote the activation of the jasmonic acid and salicylate acid pathway, which increases the resistance levels to insects such as caterpillars [123]. Meanwhile, genera such as *Serratia*, *Shigella*, and *Escherichia* were more abundant in the *L. daturaphila* layer (Figure 6), although they also had an important presence in the superficial tissues of the plant. That is, these genera were found in both layers, but they were especially abundant in the gut samples. The fact that these communities were found in both hosts could be related to the fact that, when feeding on the plant, the larvae defecate on its surface, also leaving traces of these bacterial populations. It has been reported that the larvae of *L. daturaphila* tend to cover themselves with their own frass while remaining on the plant they feed on, which could be a defence mechanism against potential parasitoids [48]. The phylum Proteobacteria had a preponderant presence in all the samples, but its role in the plant–insect interaction is complex. While some genera have been reported as plant pathogens [124], other Proteobacteria, such as *Pseudomonas spp.*, have been linked to reducing whitefly survival as well as inhibiting aphid growth [125] with potential benefits for the plant. Furthermore, bacteria such as *Serratia symbiotica*, another gamma-proteobacterium, is closely associated with aphids, giving them protection against some parasites [86]. Therefore, it is possible that the phylum Proteobacteria plays different roles in the interaction with both hosts, from mutualistic through commensalisms to antagonistic interactions.

The microbiota of highly embedded systems such as plant–herbivore relationships usually displays multiple kinds of interactions. As mentioned before, network formalism is a suitable tool to study complex biological systems. These intricate relationships could be faithfully represented in multilayer networks. In our case, layers represent profiles of abundances of bacteria in plants and insects. This novel network framework is useful to capture interlayer co-abundance patterns, and the aggregate layer summed up both plant and insect abundance patterns. These patterns of co-occurrence suggest a mixture of microbes from different niches and revealed that Proteobacteria, Actinobacteria, and Firmicutes are ubiquitous, suggesting their potential importance in the functional role of the microbiota in the interaction between the plant *D. inoxia* and its specialist insect *L. daturaphila*.

5. Conclusions

Given the nature of the interaction between the annual plant *D. inoxia* and its herbivorous insect *L. daturaphila*, the bacterial communities associated with both hosts shared many phyla and genera, suggesting that the composition of the leaf bacteriome determines the composition of the insect bacteriome. However, the patterns of co-abundances among those bacterial groups differed significantly between plants and insects. That is, those genera that were the most abundant in the plant were not necessarily the most abundant in the insect. Thus, changes in the co-abundance patterns and not in the presence–absence ratio of the bacterial groups conforming the bacteriomes are relevant when studying plant–insect interactions.

Supplementary Materials: The following supporting information can be downloaded at: <https://www.mdpi.com/article/10.3390/microorganisms11010040/s1>, Figure S1: Rarefaction curves; Figure S2: Relative abundance; Figure S3: Shared ASVs; Figure S4: Significant abundances of genera; Table S1: Sequences and ASVs; Table S2: Shared genera.

Author Contributions: Conceptualization, R.Á.-M. and E.G.; methodology, Z.M.-P. and E.G.; formal analysis, Z.M.-P., V.L.-V., R.Á.-M. and E.G.; writing—original draft preparation, Z.M.-P.; writing—review and editing, R.Á.-M., J.F. and E.G.; funding acquisition, J.F., R.Á.-M. and E.G. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by a FONDEC-UAQ-2022 grant (Fondo: 1299, Nue: 4131; FNB-22-05) to R.Á.-M. and by a PRODEP-SEP grant (FNB-2021-1) to E.G.

Data Availability Statement: Not applicable.

Acknowledgments: We are grateful to L. Partida-Martínez and R. Bárcenas-Luna for their critical and constructive comments that improved the manuscript.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest. The funders had no role in the design of the study; in the collection, analyses, or interpretation of data; in the writing of the manuscript; or in the decision to publish the results.

References

1. Felton, G.W.; Tumlinson, J.H. Plant-insect dialogs: Complex interactions at the plant-insect interface. *Curr. Opin. Plant Biol.* **2008**, *11*, 457–463. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. Sugio, A.; Dubreuil, G.; Giron, D.; Simon, J.C. Plant-insect interactions under bacterial influence: Ecological implications and underlying mechanisms. *J. Exp. Bot.* **2015**, *66*, 467–478. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Mason, C.J. Complex Relationships at the Intersection of Insect Gut Microbiomes and Plant Defenses. *J. Chem. Ecol.* **2020**, *46*, 793–807. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Mayoral-Peña, Z.; Álvarez-Martínez, R.; Fornoni, J.; Garrido, E. *The Extended Microbiota: How Microbes Shape Plant-Insect Interactions*; Springer: Berlin/Heidelberg, Germany, 2020; pp. 135–146. [[CrossRef](#)]
5. Biere, A.; Tack, A.J.M. Evolutionary adaptation in three-way interactions between plants, microbes and arthropods. *Func. Ecol.* **2013**, *27*, 646–660. [[CrossRef](#)]
6. Wielkopolan, B.; Obrępańska-Stęplowska, A. Three-way interaction among plants, bacteria, and coleopteran insects. *Planta* **2016**, *244*, 313–332. [[CrossRef](#)]
7. Grunseich, J.M.; Thompson, M.N.; Aguirre, N.M.; Helms, A.M. The role of plant-associated microbes in mediating host-plant selection by insect herbivores. *Plants* **2020**, *9*, 6. [[CrossRef](#)]
8. Mason, C.J.; Jones, A.G.; Felton, G.W. Co-option of microbial associates by insects and their impact on plant-herbivore interactions. *Plant Cell Environ.* **2019**, *42*, 1078–1086. [[CrossRef](#)]
9. Lindow, S.E.; Brandl, M.T. Microbiology of the Phyllosphere MINIREVIEW Microbiology of the Phyllosphere. *App. Environ. Microbiol.* **2003**, *69*, 1875–1883. [[CrossRef](#)]
10. Engel, P.; Moran, N.A. The gut microbiota of insects—Diversity in structure and function. *FEMS Microbiol. Rev.* **2013**, *37*, 699–735. [[CrossRef](#)]
11. Dastogeer, K.M.G.; Tumpa, F.H.; Sultana, A.; Akter, M.A.; Chakraborty, A. Plant microbiome—An account of the factors that shape community composition and diversity. *Curr. Plant Biol.* **2020**, *23*, 100161. [[CrossRef](#)]
12. Hopson, L.M.; Singleton, S.S.; David, J.A.; Basuchoudhary, A.; Prast-Nielsen, S.; Klein, P.; Sen, S.; Mazumder, R. Bioinformatics and machine learning in gastrointestinal microbiome research and clinical application. In *Progress in Molecular Biology and Translational Science*; Elsevier Inc.: Amsterdam, The Netherlands, 2020; Volume 176, pp. 141–178.
13. Newton, A.C.; Gravouil, C.; Fountaine, J.M. Managing the ecology of foliar pathogens: Ecological tolerance in crops. *Ann. Appl. Biol.* **2010**, *157*, 343–359. [[CrossRef](#)]
14. Carvalho, S.D.; Castillo, J.A. Influence of Light on Plant–Phyllosphere Interaction. *Front. Plant Sci.* **2018**, *9*, 1482. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Rosenberg, E.; Zilber-Rosenberg, I. Microbes Drive Evolution of Animals and Plants: The Hologenome Concept. *ASM* **2016**, *7*, e01395-15. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. Hannula, S.E.; Zhu, F.; Heinen, R.; Bezemer, T.M. Foliar-feeding insects acquire microbiomes from the soil rather than the host plant. *Nat. Commun.* **2019**, *10*, 1254. [[CrossRef](#)]
17. Višňovská, D.; Pyszko, P.; Šigut, M.; Kostovčík, M.; Kolařík, M.; Kotaskova, N.; Drozd, P. Caterpillar gut and host plant phylloplane microbiomes differ: A new perspective on fungal involvement in insect guts. *FEMS Microbiol. Ecol.* **2020**, *96*, fiae116. [[CrossRef](#)]
18. Mogouong, J.; Constant, P.; Legendre, P.; Guertin, C. The phyllosphere microbiome of host trees contributes more than leaf phytochemicals to variation in the *Agilus planipennis* Fairmaire gut microbiome structure. *Sci. Rep.* **2021**, *11*, 1–15. [[CrossRef](#)]

19. Zhang, S.; Shu, J.; Xue, H.; Zhang, W.; Zhang, Y.; Liu, Y.; Fang, L.; Wang, Y.; Wang, H. The gut microbiota in camellia weevils are influenced by plant secondary metabolites and contribute to saponin degradation. *MSystems* **2020**, *5*, e00692-19. [[CrossRef](#)]
20. Santos-García, D.; Mestre-Rincón, N.; Zchori-Fein, E.; Morin, S. Inside out: Microbiota dynamics during host-plant adaptation of whiteflies. *ISME J.* **2020**, *14*, 847–856. [[CrossRef](#)]
21. Tsuchida, T.; Koga, R.; Fukatsu, T. Host plant specialization governed by facultative symbiont. *Science* **2004**, *303*, 1989. [[CrossRef](#)]
22. Salem, H.; Kirsch, R.; Pauchet, Y.; Berasategui, A.; Fukumori, K.; Moriyama, M.; Cripps, M.; Windsor, D.; Fakatsu, T.; Gerardo, N.M. Symbiont digestive range reflects host plant breadth in herbivorous beetles. *Curr. Biol.* **2020**, *30*, 2875–2886. [[CrossRef](#)]
23. Broderick, N.A.; Raffa, K.F.; Goodman, R.M.; Handelsman, J. Census of the bacterial community of the gypsy moth larval midgut by using culturing and culture-independent methods. *Appl. Environ. Microbiol.* **2004**, *70*, 293–300. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Priya, N.G.; Ojha, A.; Kajla, M.K.; Raj, A.; Rajagopal, R. Host plant induced variation in gut bacteria of *Helicoverpa armigera*. *PLoS ONE* **2012**, *7*, e30768. [[CrossRef](#)]
25. Mason, C.J.; Raffa, K.F. Acquisition and structuring of midgut bacterial communities in gypsy moth (Lepidoptera: Erebidae) larvae. *Environ. Entomol.* **2014**, *43*, 595–604. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Jones, A.G.; Mason, C.J.; Felton, G.W.; Hoover, K. Host plant and population source drive diversity of microbial gut communities in two polyphagous insects. *Sci. Rep.* **2019**, *9*, 2792. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
27. Dillon, R.J.; Dillon, V.M. The gut bacteria of insects: Nonpathogenic interactions. *Annu. Rev. Entomol.* **2004**, *49*, 71–92. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
28. Mason, C.J.; Couture, J.J.; Raffa, K.F. Plant-associated bacteria degrade defense chemicals and reduce their adverse effects on an insect defoliator. *Oecologia* **2014**, *175*, 901–910. [[CrossRef](#)]
29. Shikano, I.; Olson, G.L.; Cory, J.S. Impact of non-pathogenic bacteria on insect disease resistance: Importance of ecological context. *Ecol. Entomol.* **2015**, *40*, 620–628. [[CrossRef](#)]
30. Yoon, S.A.; Harrison, J.G.; Philbin, C.S.; Dodson, C.D.; Jones, D.M.; Wallace, I.S.; Forister, M.L.; Smilanich, A.M. Host plant-dependent effects of microbes and phytochemistry on the insect immune response. *Oecologia* **2019**, *191*, 141–152. [[CrossRef](#)]
31. Itoh, H.; Tago, K.; Hayatsu, M.; Kikuchi, Y. Detoxifying symbiosis: Microbe-mediated detoxification of phytotoxins and pesticides in insects. *Nat. Prod. Rep.* **2018**, *35*, 434–454. [[CrossRef](#)]
32. Gupta, A.; Nair, S. Dynamics of insect-microbiome interaction influence host and microbial symbiont. *Front. Microbiol.* **2020**, *11*, 1357. [[CrossRef](#)]
33. Lü, J.; Guo, W.; Chen, S.; Guo, M.; Qiu, B.; Yang, C.; Lian, T.; Pan, H. Host plants influence the composition of the gut bacteria in *Henosepilachna vigintioctopunctata*. *PLoS ONE* **2019**, *14*, e0224213. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Robinson, C.J.; Schloss, P.; Ramos, Y.; Raffa, K.; Handelsman, J. Robustness of the bacterial community in the cabbage white butterfly larval midgut. *Microb. Ecol.* **2010**, *59*, 199–211. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Blankenchip, C.L.; Michels, D.E.; Braker, H.E.; Goffredi, S.K. Diet breadth and exploitation of exotic plants shift the core microbiome of *Cephaloleia*, a group of tropical herbivorous beetles. *PeerJ* **2018**, *5*. [[CrossRef](#)]
36. Leite-Mondin, M.; DiLegge, M.J.; Manter, D.K.; Weir, T.L.; Silva-Filho, M.C.; Vivanco, J.M. The gut microbiota composition of *Trichoplusia ni* is altered by diet and may influence its polyphagous behavior. *Sci. Rep.* **2022**, *11*, 1–16. [[CrossRef](#)]
37. Garcia, J.; Escanuela, M.; Bhat, S.; Lampert, E. The *Trichoplusia ni* gut microbiome and its derivation from the Phyllosphere of Its food plants. *Ga. J. Sci.* **2020**, *78*, 9.
38. Frago, E.; Dicke, M.; Godfray, H.C.J. Insect symbionts as hidden players in insect-plant interactions. *TREE* **2012**, *27*, 705–711. [[CrossRef](#)]
39. Humphrey, P.T.; Nguyen, T.T.; Villalobos, M.M.; Whiteman, N.K. Diversity and abundance of phyllosphere bacteria are linked to insect herbivory. *Mol. Ecol.* **2014**, *23*, 1497–1515. [[CrossRef](#)]
40. Humphrey, P.T.; Whiteman, N.K. Insect herbivory reshapes a native leaf microbiome. *Nat. Ecol. Evol.* **2020**, *26*, 221–229. [[CrossRef](#)]
41. Caspi-Fluger, A.; Inbar, M.; Mozes-Daube, N.; Katzir, N.; Portnoy, V.; Belausov, E.; Hunter, M.S.; Zchori-Fein, E. Horizontal transmission of the insect symbiont *Rickettsia* is plant-mediated. *Proc. Biol. Sci.* **2012**, *279*, 1791–1796. [[CrossRef](#)]
42. Pons, I.; Renoz, F.; Noël, C.; Hance, T. Circulation of the cultivable symbiont *Serratia symbiotica* in aphids is mediated by plants. *Front. Microbiol.* **2019**, *10*, 764. [[CrossRef](#)]
43. Kaiser, W.; Hugué, E.; Casas, J.; Commin, C.; Giron, D. Plant green-island phenotype induced by leaf-miners is mediated by bacterial symbionts. *Proc. R. Soc. B* **2010**, *277*, 2311–2319. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. Wang, J.; Chung, S.H.; Peiffer, M.; Rosa, C.; Hoover, K.; Zeng, R. Herbivore oral secreted bacteria trigger distinct defense responses in preferred and non-preferred host plants. *J. Chem. Ecol.* **2016**, *42*, 463–474. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
45. Chung, S.H.; Scully, E.D.; Peiffer, M.; Geib, S.M.; Rosa, C.; Hoover, K.; Felton, G.W. Host plant species determine symbiotic bacterial communities mediating suppression of plant defenses. *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 39690. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
46. Lilley, A.K.; Hails, R.S.; Cory, J.S.; Bailey, M.J. The dispersal and establishment of *Pseudomonas* populations in the phyllosphere of sugar beet by phytophagous caterpillars. *FEMS Microbiol. Ecol.* **1997**, *24*, 151–157. [[CrossRef](#)]
47. Chrostek, E.; Pelz-Stelinski, K.; Hurst, G.D.D.; Hughes, G.L. Horizontal transmission of intracellular insect symbionts via plants. *Front. Microbiol.* **2017**, *8*, 2237. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
48. Bustos-Segura, C.E. Estudio de los cambios evolutivos en la resistencia contra la herbivoría en una población natural de la planta anual *Datura stramonium*, y sus consecuencias para el herbívoro. Master's Thesis, Universidad Autónoma de México, Mexico City, México, 2011.

49. Hernández-Cumplido, J. Ecología de la interacción tritrófica de *Datura stramoniu-Trichobaris sp.*-parasitoides. Master's Thesis, Universidad Autónoma de México, Mexico City, México, 2009.
50. Desgarenes, D.; Garrido, E.; Torres-Gomez, M.J.; Peña-Cabriales, J.J.; Partida-Martinez, L.P. Diazotrophic potential among bacterial communities associated with wild and cultivated Agave species. *FEMS Microbiol. Ecol.* **2014**, *90*, 844–857. [CrossRef]
51. Karpen, G.H. Preparation of high-molecular-weight DNA from *Drosophila* embryos. *Cold Spring Harb. Protoc.* **2009**, *7*, pdb.prot5254. [CrossRef]
52. Fiedorová, K.; Radvanský, M.; Němcová, E.; Grombiříková, H.; Bosák, J.; Černochová, J.M.; Lexa, S.; Smajs, D.; Freiberger, T. The impact of DNA extraction methods on stool bacterial and fungal microbiota community recovery. *Front. Microbiol.* **2019**, *10*, 821. [CrossRef]
53. R Core Team. *R: A Language and Environment for Statistical Computing*; R Foundation for Statistical Computing: Vienna, Austria, 2020; Available online: <https://www.R-project.org/> (accessed on 11 November 2022).
54. Callahan, B.J.; McMurdie, P.J.; Rosen, M.J.; Han, A.W.; Johnson, A.J.A.; Holmes, S.P. DADA2: High-resolution sample inference from Illumina amplicon data. *Nat. Methods* **2016**, *13*, 581–583. [CrossRef]
55. Quast, C.; Pruesse, E.; Yilmaz, P.; Gerken, J.; Schweer, T.; Yarza, P.; Glöckner, F.O. The SILVA ribosomal RNA gene database project: Improved data processing and web-based tools. *Nucl. Acids Res.* **2013**, *41*, D590–D596. [CrossRef]
56. Yilmaz, P.; Parfrey, L.W.; Yarza, P.; Gerken, J.; Pruesse, E.; Quast, C.; Glöckner, F.O. The SILVA and "All-species Living Tree Project (LTP)" taxonomic frameworks. *Nucl. Acids Res.* **2014**, *42*, D643–D648. [CrossRef] [PubMed]
57. Oksanen, J.; Blanchet, F.G.; Friendly, M.; Kindt, R.; Legendre, P.; McGlenn, D. *Vegan: Community Ecology Package*. R package Version 2.5-5. 2020. Available online: <https://cran.r-project.org/web/packages/vegan/index.html> (accessed on 11 November 2022).
58. Wickham, H. *ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis*; Springer: New York, NY, USA, 2016; pp. 1–260.
59. Masisi, L.; Nelwamondo, V.; Marwala, T. The use of entropy to measure structural diversity. In Proceedings of the IEEE International Conference on Computational Cybernetics, Stara Lesna, Slovakia, 27–29 November 2008; pp. 41–45. [CrossRef]
60. Kembel, S.W.; Cowan, P.D.; Helmus, M.R.; Cornwell, W.K.; Morlon, H.; Ackerly, D.D.; Blomberg, S.P.; Webb, C.O. Picante: R tools for integrating phylogenies and ecology. *Bioinformatics* **2010**, *26*, 1463–1464. [CrossRef] [PubMed]
61. Bray, J.R.; Curtis, J.T. An ordination of the upland forest communities of southern Wisconsin. *Ecol. Monogr.* **1957**, *27*, 325–349. [CrossRef]
62. McMurdie, P.J.; Holmes, S. phyloseq: An R package for reproducible interactive analysis and graphics of microbiome census data. *PLoS ONE* **2013**, *8*, e61217. [CrossRef]
63. Wemheuer, F.; Taylor, J.A.; Daniel, R.; Johnston, E.; Meinicke, P.; Thomas, T. Tax4Fun2: Prediction of habitat-specific functional profiles and functional redundancy based on 16S rRNA gene sequences. *Environ. Microbiome* **2020**, *15*, 1–12. [CrossRef]
64. Csardi, G.; Nepusz, T. The igraph software package for complex network research. *J. Complex Syst.* **2006**, *1695*, 1–9. Available online: <http://www.necsi.edu/events/iccs6/papers/c1602a3c126ba822d0bc4293371c.pdf> (accessed on 11 November 2022).
65. De Domenico, M.; Porter, M.A.; Arenas, A. MuxViz: A tool for multilayer analysis and visualization of networks. *J. Complex Networks* **2015**, *3*, 159–176. [CrossRef]
66. Kurtz, Z.D.; Müller, C.L.; Miraldi, E.R.; Littman, D.R.; Blaser, M.J.; Bonneau, R.A. Sparse and compositionally robust inference of microbial ecological networks. *PLoS Comput. Biol.* **2015**, *11*, e1004226. [CrossRef]
67. Friedman, J.; Alm, E.J. Inferring correlation networks from genomic survey data. *PLoS Comput. Biol.* **2012**, *8*, e1002687. [CrossRef]
68. Andreote, F.D.; Gumiere, T.; Durrer, A. Exploring interactions of plant microbiomes. *Sci. Agric.* **2014**, *71*, 528–539. [CrossRef]
69. Smets, W.; Wuyts, K.; Oerlemans, E.; Wuyts, S.; Denys, S.; Samson, R.; Leeber, S. Impact of urban land use on the bacterial phyllosphere of ivy (*Hedera sp.*). *Atmos. Environ.* **2016**, *147*, 376–383. [CrossRef]
70. Enya, J.; Koitabashi, M.; Shinohara, H.; Yoshida, S.; Tsukiboshi, T.; Negishi, H.; Suyama, K.; Tsushima, S. Phylogenetic diversities of dominant culturable *Bacillus*, *Pseudomonas* and *Pantoea* species on tomato leaves and their possibility as biological control agents. *J. Phytopathol.* **2007**, *155*, 446–453. [CrossRef]
71. Taghavi, S.; Garafola, C.; Monchy, S.; Newman, L.; Hoffman, A.; Weyens, N.; Barac, T.; Vangronsveld, J.; van der Leile, D. Genome survey and characterization of endophytic bacteria exhibiting a beneficial effect on growth and development of poplar trees. *Appl. Environ. Microbiol.* **2009**, *75*, 748–757. [CrossRef] [PubMed]
72. Chen, X.; Wicaksono, W.A.; Berg, G.; Cernava, T. Bacterial communities in the plant phyllosphere harbour distinct responders to a broad-spectrum pesticide. *Sci. Total Environ.* **2021**, *751*, 141799. [CrossRef]
73. Vorholt, J.A. Microbial life in the phyllosphere. *Nat. Rev. Microbiol.* **2012**, *10*, 828–840. [CrossRef] [PubMed]
74. Douglas, A.E. Multiorganismal insects: Diversity and function of resident microorganisms. *Annu. Rev. Entomol.* **2014**, *60*, 17–34. [CrossRef] [PubMed]
75. Chen, B.; Teh, B.S.; Sun, C.; Hu, S.; Lu, X.; Boland, W.; Shao, Y. Biodiversity and activity of the gut microbiota across the life history of the insect herbivore *Spodoptera littoralis*. *Sci. Rep.* **2016**, *6*, 29505. [CrossRef]
76. González-Serrano, F.; Pérez-Cobas, A.E.; Rosas, T.; Baixeras, J.; Latorre, A.; Moya, A. The gut microbiota composition of the moth *Brithys crini* reflects insect metamorphosis. *Microb. Ecol.* **2020**, *79*, 960–970. [CrossRef]
77. Suárez-Moo, P.; Cruz-Rosales, M.; Ibarra-Laclette, E.; Desgarenes, D.; Huerta, C.; Lamelas, A. Diversity and composition of the gut microbiota in the developmental stages of the dung beetle *Copris incertus* Say (Coleoptera, Scarabaeidae). *Front. Microbiol.* **2020**, *11*, 1698. [CrossRef]

78. Gomes, S.I.F.; Kielak, A.M.; Hannula, S.E.; Heinen, R.; Jongen, R.; Keesmaat, I.; De Long, J.R.; Bezemer, M. Microbiomes of a specialist caterpillar are consistent across different habitats but also resemble the local soil microbial communities. *Animal Microbiome* **2020**, *2*, 37. [CrossRef]
79. Hammer, T.J.; Janzen, D.H.; Hallwachs, W.; Jaffe, S.P.; Fierer, N. Caterpillars lack a resident gut microbiome. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2017**, *114*, 9641–9646. [CrossRef] [PubMed]
80. Martinez, A.J.; Ogao, T.; Chantal, O.; Ingham, S.; Sandoval-Calderón, M.; Salem, H.; Deckert, J.; Kaltenpoth, M. Angiosperm to Gymnosperm host-plant switch entails shifts in microbiota of the Welwitschia bug, *Probergrothius angolensis* (Distant, 1902). *Mol. Ecol.* **2019**, *28*, 5172–5187. [CrossRef] [PubMed]
81. Yang, F.Y.; Saqib, H.S.A.; Chen, J.H.; Ruan, Q.Q.; Vasseur, L.; He, W.Y.; You, M.S. Differential profiles of gut microbiota and metabolites associated with host shift of *Plutella xylostella*. *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, *21*, 6283. [CrossRef] [PubMed]
82. Zhu, Y.; Song, Z.; Song, Y.; Zhao, D.; Hong, X. The microbiota in spider mite feces potentially reflects intestinal bacterial communities in the host. *Insect Sci.* **2020**, *27*, 859–868. [CrossRef] [PubMed]
83. Ruiju, L. Plant-growth-promoting bacteria (PGPB) against insects and other agricultural pests. *Agronomy* **2020**, *10*, 861. [CrossRef]
84. Hurst, M.R.H.; Beard, S.S.; Jackson, T.A.; Jones, S.M. Isolation and characterization of the *Serratia entomophila* antifeeding prophage. *FEMS Microbiol. Lett.* **2007**, *270*, 42–48. [CrossRef]
85. Nehme, N.T.; Liégeois, S.; Kele, B.; Giammarinaro, P.; Pradel, E.; Hoffman, J.A. A model of bacterial intestinal infections in *Drosophila melanogaster*. *PLoS Pathog.* **2007**, *3*, e173. [CrossRef]
86. Renoz, F.; Pons, I.; Vanderpoorten, A.; Bataille, G.; Noël, C.; Foray, V.; Pierson, V.; Hance, T. Evidence for gut-associated *Serratia symbiotica* in wild aphids and ants provides new perspectives on the evolution of bacterial mutualism in insects. *Microb. Ecol.* **2019**, *78*, 159–169. [CrossRef]
87. Kozlova, E.V.; Hegde, S.; Roundy, C.M.; Golovko, G.; Saldaña, M.A.; Hart, C.E.; Anderson, E.R.; Hornett, E.A.; Khanipov, K.; Popov, V.L.; et al. Microbial interactions in the mosquito gut determine *Serratia* colonization and blood-feeding propensity. *ISME J.* **2021**, *15*, 93–108. [CrossRef]
88. Arias-Cordero, E.; Ping, L.; Reichwald, K.; Delb, H.; Platzer, M.; Boland, W. Comparative evaluation of the gut microbiota associated with the below- and above-ground life stages (larvae and beetles) of the forest cockchafer, *Melolontha hippocastani*. *PLoS ONE* **2012**, *7*, e51557. [CrossRef]
89. Stone, B.W.G.; Weingarten, E.W.; Jackson, C.R. The role of the phyllosphere microbiome in plant health and function. *Annu. Plant Rev.* **2018**, *1*, 1533–556. [CrossRef]
90. Lajoie, G.; Maglione, R.; Kembel, S.W. Adaptive matching between phyllosphere bacteria and their tree hosts in a neotropical forest. *Microbiome* **2020**, *8*, 70. [CrossRef] [PubMed]
91. Jing, T.Z.; Qi, F.H.; Wang, Z.Y. Most dominant roles of insect gut bacteria: Digestion, detoxification, or essential nutrient provision? *Microbiome* **2020**, *8*, 38. [CrossRef] [PubMed]
92. Giron, D.; Dedeine, F.; Dubreuil, G.; Huguet, E.; Mouton, L.; Outreman, Y.; Simon, J.C. Influence of Microbial Symbionts on Plant–Insect Interactions. In *Advances in Botanical Research*; Elsevier: Amsterdam, The Netherlands, 2017; pp. 225–257. [CrossRef]
93. Schmidt, K.; Engel, P. Review: Mechanisms underlying gut microbiota–host interactions in insects. *J. Exp. Biol.* **2021**, *224*, jeb.207696. [CrossRef] [PubMed]
94. Kochhar, S.L.; Gujral, S.K. Carbohydrate metabolism. In *Plant Physiology: Theory and Application*; Cambridge University Press: Cambridge, UK, 2022; pp. 253–266. [CrossRef]
95. Zang, X.; Liu, M.; Fan, Y.; Xu, J.; Xu, X.; Li, H. The structural and functional contributions of β -glucosidase-producing microbial communities to cellulose degradation in composting. *Biotechnol. Biofuels* **2018**, *11*, 51. [CrossRef] [PubMed]
96. Vassão, D.G.; Wielsch, N.; Moreira, A.M.; Gebauer-Jung, S.; Hupfer, Y.; Svatoš, A.; Gershenson, J. Plant defensive β -Glucosidases resist digestion and sustain activity in the gut of a lepidopteran herbivore. *Front. Plant Sci.* **2018**, *9*, 1389. [CrossRef]
97. Smith, C.M.; Boyko, E.V. The molecular bases of plant resistance and defense responses to aphid feeding. *Entomol. Exp. Appl.* **2006**, *122*, 1–16. [CrossRef]
98. Hosokawa, T.; Kikuchi, Y.; Nikoh, N.; Shimada, M.; Fukatsu, T. Strict host-symbiont cospeciation and reductive genome evolution in insect gut bacteria. *PLoS Biol.* **2006**, *4*, e337. [CrossRef]
99. Wu, J.; Hettenhausen, C.; Meldau, S.; Baldwin, I.T. Herbivory rapidly activates MAPK signaling in attacked and unattacked leaf regions but not between leaves of *Nicotiana attenuata*. *Plant Cell* **2007**, *19*, 1096–1122. [CrossRef]
100. Bringel, F.; Couée, I. Pivotal roles of phyllosphere microorganisms at the interface between plant functioning and atmospheric trace gas dynamics. *Front. Microbiol.* **2015**, *6*, 486. [CrossRef]
101. Ruiz-Pérez, C.A.; Restrepo, S.; Zambrano, M.M. Microbial and functional diversity within the phyllosphere of *Espeletia* species in an Andean high-mountain ecosystem. *Appl. Environ. Microbiol.* **2016**, *82*, 1807–1817. [CrossRef] [PubMed]
102. El Bazaoui, A.; Bellimam, M.A.; Soulaymani, A. Tropane alkaloids of *Datura innoxia* from Morocco. *Z. Fur Nat.* **2012**, *67*, 8–14. [CrossRef]
103. Miranda-Pérez, A.; Castillo, G.; Hernández-Cumplido, J.; Valverde, P.L.; Borbolla, M.; Cruz, L.L.; Tapia-López, R.; Fornoni, J.; Flores-Ortiz, C.M.; Núñez-Farfán, J. Natural selection drives chemical resistance of *Datura stramonium*. *PeerJ* **2016**, *4*, e1898. [CrossRef] [PubMed]

104. De-la-Cruz, I.M.; Cruz, L.L.; Martínez-García, L.; Valverde, P.L.; Flores-Ortiz, C.M.; Hernández-Portilla, L.B.; Núñez-Farfán, J. Evolutionary response to herbivory: Population differentiation in microsatellite loci, tropane alkaloids and leaf trichome density in *Datura stramonium*. *Arthropod Plant Interact.* **2020**, *14*, 21–30. [[CrossRef](#)]
105. Habib, H.; Fazili, K.M. Plant protease inhibitors: A defense strategy in plants. *Biotechnol. Mol. Biol. Rev.* **2007**, *2*, 68–85. [[CrossRef](#)]
106. Kikuchi, Y.; Hayatsu, M.; Hosokawa, T.; Nagayama, A.; Tago, K.; Fukatsu, T. Symbiont-mediated insecticide resistance. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2012**, *109*, 8618–8622. [[CrossRef](#)]
107. Feyereisen, R. Insect P450 Enzymes. *Ann. Rev. Entomol.* **1999**, *44*, 507–533. [[CrossRef](#)]
108. Scott, J.G.; Wen, Z. Cytochromes P450 of insects: The tip of the iceberg. *Pest Manag. Sci.* **2001**, *57*, 958–967. [[CrossRef](#)]
109. Adams, A.S.; Aylward, F.O.; Adams, S.M.; Erbilgin, N.; Aukema, B.H.; Currie, C.R.; Suen, G.; Raffa, K.F. Mountain pine beetles colonizing historical and naïve host trees are associated with a bacterial community highly enriched in genes contributing to terpene metabolism. *Appl. Environ. Microbiol.* **2013**, *79*, 3468–3475. [[CrossRef](#)]
110. Schuler, M.A. The role of cytochrome P450 monooxygenases in plant-insect interactions. *Plant Physiol.* **1996**, *112*, 1411–1419. [[CrossRef](#)]
111. Gullner, G.; Komives, T.; Király, L.; Schröder, P. Glutathione S-Transferase enzymes in plant-pathogen Interactions. *Front. Plant Sci.* **2018**, *9*, 1836. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
112. Francis, F.; Vanhaelen, N.; Haubruge, E. Glutathione S-transferases in the adaptation to plant secondary metabolites in the Myzus persicae aphid. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* **2005**, *58*, 166–174. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
113. Behmer, S.T. Insect herbivore nutrient regulation. *Annu. Rev. Entomol.* **2009**, *54*, 165–187. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
114. Honda, K.; Hori, M.; Ômura, H.; Kainoh, Y. Allelochemicals in Plant–Insect Interactions. In *Elsevier Reference Module in Chemistry, Molecular Sciences and Chemical Engineering*; Reedjik, J., Ed.; Elsevier: Waltham, MA, USA, 2013; pp. 563–594. [[CrossRef](#)]
115. Shi, H.; Pei, L.; Gu, S.; Zhu, S.; Wang, Y.; Zhang, Y.; Li, B. Glutathione S-transferase (GST) genes in the red flour beetle, *Tribolium castaneum*, and comparative analysis with five additional insects. *Genomics* **2012**, *100*, 327–335. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
116. Jaffar, S.; Ahmad, S.; Lu, Y. Contribution of insect gut microbiota and their associated enzymes in insect physiology and biodegradation of pesticides. *Front. Microbiol.* **2022**, *13*, 979383. [[CrossRef](#)]
117. Pilosof, S.; Porter, M.A.; Pascual, M.; Kéfi, S. The multilayer nature of ecological networks. *Nat. Ecol. Evol.* **2017**, *1*, 0101. [[CrossRef](#)]
118. Soumare, A.; Diedhiou, A.G.; Thuita, M.; Hafidi, M.; Ouhdouch, Y.; Gopalakrishnan, S.; Kouisni, L. Exploiting biological nitrogen fixation: A route towards a sustainable agriculture. *Plants* **2020**, *9*, 1011. [[CrossRef](#)]
119. Shang, L.; Yan, Y.; Zhan, Y.; Ke, X.; Shao, Y.; Liu, Y.; Yang, H.; Wang, S.; Dai, S.; Lu, J.; et al. A regulatory network involving Rpo, Gac and Rsm for nitrogen-fixing biofilm formation by *Pseudomonas stutzeri*. *NPJ Biofilms Microbiomes* **2021**, *7*, 54. [[CrossRef](#)]
120. Lv, L.; Luo, J.; Ahmed, T.; Zaki, H.E.; Tian, Y.; Shahid, M.S.; Chen, J.; Li, B. Beneficial effect and potential risk of *Pantoea* on rice production. *Plants* **2022**, *11*, 2608. [[CrossRef](#)]
121. Mamarasulov, B.; Davranov, K.; Shah, J.M.; Jabborova, D.; Nasif, O.; Javed, M.A.; Danish, S.; Datta, R. Characterization, enzymatic and biochemical properties of endophytic bacterial strains of the medicinal plant *Ajuga turkestanica* (Rgl.) Brig (Lamiaceae). *J. King Saud Univ. Sci.* **2022**, *34*, 102183. [[CrossRef](#)]
122. Holochová, P.; Mašláňová, I.; Sedláček, I.; Švec, P.; Králová, S.; Kovařovic, V.; Busse, H.-J.; Staňková, E.; Barták, M.; Pantůček, R. Description of *Massilia rubra* sp. nov., *Massilia aquatica* sp. nov., *Massilia mucilaginoso* sp. nov., *Massilia frigida* sp. nov., and one *Massilia* genomospecies isolated from Antarctic streams, lakes and regoliths. *Syst Appl Microbiol* **2020**, *43*, 126112. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
123. Cappellari, L.D.; Chiappero, J.; Palermo, T.B.; Giordano, W.; Banchio, E. Impact of soil rhizobacteria inoculation and leaf-chewing insect herbivory on *Mentha piperita* leaf secondary metabolites. *J. Chem. Ecol.* **2020**, *46*, 619–630. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
124. Preston, G.M.; Studholme, D.J.; Caldelari, I. Profiling the secretomes of plant pathogenic *Proteobacteria*. *FEMS Microbiol. Rev.* **2005**, *29*, 331–360. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
125. Haney, C.H.; Wiesmann, C.L.; Shapiro, L.R.; Melnyk, R.A.; O’Sullivan, L.R.; Khorasani, S.; Xiao, L.; Han, J.; Bush, J.; Carrillo, J.; et al. Rhizosphere-Associated *Pseudomonas* induce systemic resistance to herbivores at the cost of susceptibility to bacterial pathogens. *Mol. Ecol.* **2018**, *27*, 1833–1847. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

Disclaimer/Publisher’s Note: The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.