

**Universidad de Costa Rica**  
**Sede Rodrigo Facio**  
**Facultad de Ciencias Básicas**  
**Escuela de Biología**

**Identificación molecular de las especies de mosca blanca y sus  
endosimbiontes bacterianos secundarios presentes en el cultivo de tomate  
(*Solanum lycopersicum* L.) en Costa Rica**

**Tesis para optar por el grado de Licenciatura en Biología con énfasis en Biología  
Molecular y Biotecnología**

**Xareni Can Vargas**

**Ciudad Universitaria Rodrigo Facio**

**San José, Costa Rica**

**2018**

## **Miembros del Tribunal de Trabajos Finales de Graduación**

---

Lic. Eduardo Hernández Jiménez - Director de tesis

---

Ph.D. Natalia Barboza Vargas - Lectora de tesis

---

Ph.D. Federico Albertazzi Castro - Lector de tesis

---

Ph.D. Keilor Rojas Jiménez - Miembro del tribunal

---

M.Sc. Daniel Briceño Lobo - Miembro del tribunal

---

Bach. Xareni Can Vargas - Postulante

## **Dedicatoria**

A los que de sangre o no han sido mi familia

## **Reconocimientos**

A mis padres por su esfuerzo y constantes palabras de ánimo que me ayudaron a completar mis metas.

A mis tutores, Eduardo Hernández y Natalia Barboza por enseñarme tanto en el laboratorio y por motivarme a hacer lo mejor.

A Federico Albertazzi y Alcides Sánchez por sus aportes y amable disposición.

A mis compañeras del laboratorio 6 del CIBCM de las que recibí siempre conocimiento, apoyo, empatía y solidaridad.

## Índice general

<b>ANTECEDENTES</b> .....	<b>1</b>
Moscas blancas .....	1
Endosimbiosis bacteriana .....	5
<b>JUSTIFICACIÓN</b> .....	<b>9</b>
<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>10</b>
Objetivo general.....	10
Objetivos específicos .....	10
<b>METODOLOGÍA</b> .....	<b>11</b>
Recolección de mosca blanca .....	11
Extracción de ADN de moscas blancas .....	11
Identificación de la especie de mosca blanca mediante PCR-RFLP .....	11
Análisis de secuencias de la región parcial del gen mtCOI.....	12
Detección de endosimbiontes bacterianos secundarios .....	13
<b>RESULTADOS</b> .....	<b>13</b>
Identificación de la especie de mosca blanca mediante PCR-RFLP .....	13
Análisis de secuencias de la región parcial del gen mtCOI.....	18
Detección de endosimbiontes bacterianos secundarios .....	20
<b>DISCUSIÓN</b> .....	<b>23</b>
<b>CONCLUSIONES</b> .....	<b>24</b>
<b>REFERENCIAS</b> .....	<b>30</b>
<b>ANEXOS</b> .....	<b>46</b>

## Índice de figuras

- Fig. 1 Distribución de las especies de mosca blanca identificadas en las plantaciones de tomate visitadas durante el año 2015 (A) y 2016 (B). ..... 17
- Fig. 2 Árbol filogenético de *B. tabaci* NW considerando 657 nucleótidos de las secuencias del gen citocromo C oxidasa I mitocondrial (mtCOI) reportadas en América y una secuencia de *B. tabaci* NW2 (GenBank no. JN689353) proveniente de Brasil como grupo externo. Las secuencias se alinearon utilizando MUSCLE y el árbol se estimó mediante inferencia Bayesiana. Los números cercanos a las ramas representan las probabilidades posteriores Bayesianas; la barra indica el número de sustituciones por sitio. Los haplotipos se encuentran citados según la numeración dada en el cuadro S3. El haplotipo identificado en este estudio se encuentra señalado en negrita. .... 19
- Fig. 3 Frecuencia de las combinaciones de endosimbiontes *Arsenophonus* spp., *Rickettsia* spp. y *Wolbachia* spp. presentes en las especies de mosca blanca *T. vaporariorum*, *B. tabaci* MED y *B. tabaci* NW identificados en los sitios de muestreo del 2015 y 2016. .... 21

## Índice de cuadros

Cuadro 1. Resumen del número de individuos de mosca blanca identificados durante dos periodos de muestreo realizados durante los años 2015 y 2016 en las zonas productoras de tomate de Costa Rica. Se indica el cantón y provincia donde fueron recolectados así como el número de accesión del GenBank con el que se depositaron secuencias de un fragmento del gen mtCOI.....	15
Cuadro 2. Resumen del número de individuos de mosca blanca identificados en las zonas productoras de tomate de Costa Rica a los que se les detectó la presencia de tres géneros de endosimbiontes bacterianos ( <i>Arsenophonus</i> spp., <i>Rickettsia</i> spp., <i>Wolbachia</i> spp.). Se indica la provincia donde se recolectaron los individuos de mosca blanca.....	23
Cuadro S1. Secuencias obtenidas de GenBank de la región mtCOI de <i>B. tabaci</i> NW correspondientes a América que fueron consideradas para este estudio y su respectivo haplotipo. El haplotipo nombrado como NW-xv pertenece a la secuencia identificada en este estudio.....	46
Cuadro S2. Perfiles térmicos para la amplificación del gen 23S ADNr de <i>Arsenophonus</i> spp. y 16S ADNr de <i>Wolbachia</i> spp., <i>Hamiltonella</i> spp. y <i>Rickettsia</i> spp.....	47

## Lista de abreviaturas

**ADN** Ácido desoxirribonucleico

**BGMV** *Bean golden mosaic virus* (Virus del mosaico dorado del frijol)

**BPYV** *Beet pseudo-yellows virus* (Virus del falso amarilleo de la remolacha)

**CLCuV** *Cotton leaf curl virus* (Virus del enrollamiento de la hoja de algodón)

**CMD** Cassava mosaic disease (Enfermedad del mosaico de la yuca)

**FISH** Fluorescence *in situ* hybridization (Hibridación fluorescente *in situ*)

**ITS** Internal transcribed spacer (Espaciador interno transcrito)

**m s.n.m** metros sobre el nivel del mar

**LNA** Locked nucleic acid (Ácido nucleic bloqueado)

**MEAM1** Middle East-Asia Minor 1 (Medio Oriente-Asia Menor 1)

**MED** Mediterranean (Mediterránea)

**mtCOI** Mitochondrial cytochrome oxidase I (Citocromo oxidasa mitocondrial I)

**NW** New World (Nuevo Mundo)

**PCR-RFLP** Polymerase chain reaction-restriction fragment-length polymorphism (Reacción en cadena de la polimerasa-polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción)

**SPCSV** *Sweet potato chlorotic stunt virus* (Virus del enanismo clorótico del camote)

**ToLCSiV** *Tomato leaf curl Sinaloa virus* (Virus del enrollamiento de la hoja de tomate de Sinaloa)

**ToTV** *Tomato torrado virus* (Virus del torrado del tomate)

**ToYMoV** *Tomato yellow mottle virus* (Virus del moteado amarillo del tomate)

**TYLCV** *Tomato yellow leaf curl virus* (Virus del enrollamiento amarillo de la hoja del tomate)

## Resumen

Las moscas blancas, Aleyrodidae (Hemiptera), son un grupo de insectos consideradas plagas para la agricultura. Las más importantes en términos económicos son *Trialeurodes vaporariorum* y el complejo de especies de *Bemisia tabaci*. La identificación molecular de estas especies es relevante ya que poseen distinta resistencia a insecticidas y eficiencia en transmisión de patógenos. Unido a esto, los endosimbiontes bacterianos secundarios de la mosca blanca han mostrado tener un amplio impacto sobre su hospedero; ya que pueden influir en la resistencia a patógenos, la tolerancia a estrés térmico, la susceptibilidad a insecticidas, entre otros. En Costa Rica, uno de los cultivos más afectados debido a la abundancia de esta plaga, es el cultivo de tomate (*Solanum lycopersicum*). Dado lo anterior el objetivo de este trabajo fue determinar la distribución de las especies de mosca blanca y la frecuencia de sus endosimbiontes bacterianos secundarios presentes en estas plantaciones del país. Un total de 628 individuos fueron analizados mediante la PCR-RFLP de un fragmento del gen citocromo C oxidasa I mitocondrial (mtCOI) para la identificación de la especie de mosca blanca. La especie predominante fue *T. vaporariorum*, seguida por *B. tabaci* Mediterránea (MED) y en menor abundancia *B. tabaci* Nuevo Mundo (NW) y *B. tabaci* Medio Oriente-Asia Menor 1 (MEAM1). De estos individuos, 89 fueron seleccionados para realizar un análisis del fragmento de mtCOI mediante el cual se encontró un único haplotipo por especie de mosca blanca. Los 628 individuos fueron analizados con marcadores moleculares para la presencia de cuatro endosimbiontes bacterianos; se detectó una mayor frecuencia de *Arsenophonus* spp. en *T. vaporariorum* y de *Wolbachia* spp. y *Rickettsia* spp. en *B. tabaci* MED. Este estudio provee uno de los primeros pasos hacia la investigación de los endosimbiontes secundarios y su asociación con las especies de moscas blancas presentes en Costa Rica.

## ANTECEDENTES

### Moscas blancas

Las moscas blancas, familia Aleyrodidae (Hemiptera), son un grupo de insectos de distribución cosmopolita con al menos 1550 especies descritas, de las cuales 50 son consideradas plagas que causan importantes daños a la agricultura (Liu et al., 2015). Los daños que ocasionan a los cultivos pueden ser directos o indirectos; en el primer caso, los adultos y los estadios inmaduros provocan pérdidas en el rendimiento del cultivo si se alimentan de forma excesiva del floema de la planta hospedera (Brown, 1994). Al mismo tiempo, pueden inyectar fitotoxinas que inducen desórdenes fisiológicos en las hojas (Jones, 2003). De forma indirecta, son vectores importantes de viroides y virus de diversas familias (Navas-Castillo, Fiallo-Olivé & Sánchez-Campos, 2011; Zerbini et al., 2017), y al excretar una sustancia pegajosa, rica en azúcares, favorecen el crecimiento de hongos fumagina como *Cladosporium* sp. (Brown, 1994; De Barro, Liu, Boykin & Dinsdale, 2011), que afectan la capacidad fotosintética de la planta, además de recubrir los frutos, disminuyendo su valor comercial (Scotta, 2013).

Las especies más importantes en términos económicos son *Trialeurodes vaporariorum* Westwood y el complejo de especies tradicionalmente agrupado dentro de *Bemisia tabaci* Gennadius (Jones, 2003; De Barro et al., 2011; Brown, 2016). Ambas pueden ser vectores de diferentes géneros de virus (Navas-Castillo et al. 2011), por lo que la identificación molecular de estas especies es de mucha importancia, sobre todo en regiones tropicales y subtropicales, donde en los últimos decenios se han reportado aumentos en sus poblaciones y en los daños ocasionados a cultivos como el frijol común, cucurbitáceas, tomate, chile, entre otros (Varma & Malathi, 2003; Navas-Castillo et al., 2011).

La especie *T. vaporariorum*, conocida como la “mosca blanca de los invernaderos” es altamente polífaga y posee más de 250 especies de plantas como posibles hospederas, incluyendo hierbas, vegetales, frutas y ornamentales (Russel, 1963). Se cree que el origen evolutivo de *T. vaporariorum* se encuentra en América (Kapantaidaki et al., 2017); se adapta muy bien en altitudes entre 950 y 3000 metros sobre el nivel del mar (m s.n.m.), y a

temperaturas promedio de 18 a 22 °C; sin embargo, las altas precipitaciones afectan la dinámica de las poblaciones debido que se disminuye el número de adultos en campo y se pueden desprender gran cantidad de ninfas de las hojas (Cardona, Rodríguez, Bueno & Tapia, 2005). *T. vaporariorum* puede transmitir los géneros de fitovirus *Torradovirus* (Fam. *Secoviridae*) y *Crinivirus* (Fam. *Closteroviridae*) (Wintermantel & Wisler, 2006; Pospieszny, Borodynko, Obrepalska-Stepłowska & Hasiow, 2007; Navas-Castillo, López-Moya & Aranda, 2014). En Costa Rica se ha reportado el crinivirus *Sweet potato chlorotic stunt virus* (SPCSV) en plantaciones de camote (Valverde & Moreira, 2004), el *Beet pseudo-yellow virus* (BPYV) infectando ayote (Hammond, Hernández, Mora & Ramírez, 2005) y el *Tomato chlorosis virus* (ToCV) presente en tomate, chile dulce y al menos cinco especies de hierbas (Castro, Hernández, Mora, Ramírez & Hammond, 2009; Solórzano-Morales et al., 2011; Vargas-Asencio et al., 2013); estos dos últimos reportes asociados a altas poblaciones de *T. vaporariorum*.

Por otra parte, la mosca blanca del tabaco, *B. tabaci*, forma un complejo de especies que son morfológicamente indistinguibles entre sí (Hilje, 1996; Boykin & De Barro, 2014); se han identificado en más de 600 especies de plantas alrededor del mundo (Mound & Halsey, 1978) y se caracterizan por tener la capacidad de desarrollar resistencia a insecticidas rápidamente y la adaptación a latitudes y altitudes distintas (Brown, 1994; Horowitz, Kontsedalov, Khasdan & Ishaaya, 2005). Se presentan usualmente entre los 0-1000 m s.n.m, aunque puede migrar a mayores altitudes (Morales & Jones, 2004), como es el caso de Costa Rica, en donde se reportó la presencia de individuos a altitudes por encima de los 1700 m s.n.m. en condiciones de invernadero (Guevara-Coto, Barboza-Vargas, Hernández-Jiménez, Hammond & Ramírez-Fonseca, 2011). El rango de temperatura óptima, en la que puede alcanzar su potencial reproductivo es entre los 20 °C y 30 °C (Hilje, 1996). Son transmisores de los géneros de fitovirus *Begomovirus* (Fam. *Geminiviridae*), *Crinivirus* (Fam. *Closteroviridae*) e *Ipomovirus* (Fam. *Potyviridae*) (Lapidot & Polston, 2010). Los begomovirus son conocidos a nivel mundial por haber causado epidemias en diversos cultivos de importancia para la economía y/o seguridad alimentaria, como por ejemplo, las enfermedades conocidas como el Cassava mosaic disease (CMD), que afecta el cultivo de

yuca en la mayoría de países africanos desde finales de los 80s e inicios de los 90s, el *Cotton leaf curl virus* (CLCuV) presente en cultivos de algodón desde los 90s en países como Pakistán e India y el *Bean golden mosaic virus* (BGMV) presentes en cultivos de frijol común, que se reportó para Sur América sobre todo en Brasil desde la época de los años 70s (Gilbertson, Rojas & Natwick, 1993; Faria et al., 1994; Zhou, Liu, Robinson & Harrison, 2008; Legg French, Rogan, Okao-Okuja & Brown, 2002; Inoue-Nagata, Lima & Gilbertson, 2016). Debido a esto, los begomovirus continúan siendo objeto de arduo estudio y motivo para el control cuidadoso de las poblaciones del vector, *B. tabaci*.

Con respecto a la taxonomía de *B. tabaci*, la falta de características morfológicas en pupas y adultos que ayuden a distinguir entre poblaciones que poseen diferencias en el rango de plantas hospederas, capacidad de dispersión, transmisión de patógenos, resistencia a insecticidas e inducción de cambios fisiológicos en el hospedero; conllevó al uso de técnicas moleculares como parte importante de su sistemática (Gill & Brown 2009). En 1991 se proveyó evidencia del polimorfismo genético entre distintas poblaciones de *B. tabaci* apoyada en patrones de la enzima esterasa, por medio del cual se desarrolló una clasificación por biotipos (Costa & Brown, 1991); sin embargo, en 1993 Perring, Cooper, Rodriguez, Farrar & Bellows proponen una clasificación por especies en lugar de biotipos, lo que llevó a gran debate a nivel mundial y a la elaboración de análisis filogenéticos por medio de secuencias del espaciador interno transcrito nuclear (ITS, por sus siglas en inglés) y del gen citocromo C oxidasa mitocondrial I (mtCOI, por sus siglas en inglés). Producto de ello, se adicionaron nomenclaturas incluyendo razas y grupos genéticos, entre otras (De Barro, Trueman & Frohlich, 2005; Liu et al., 2007; Dinsdale, Cook, Riginos, Buckley & De Barro, 2010). Al menos cinco medidas para delimitar especies y separar entre los individuos de *B. tabaci* mediante análisis de agrupamiento por métodos bayesianos fueron descritos, además de experimentos que demuestran la incompatibilidad reproductiva entre los individuos del complejo de especies (Xu, De Barro & Liu, 2010; Boykin, Armstrong, Kubatko & De Barro, 2012; Lee, Park, Lee, Lee & Akimoto, 2013). De este modo, se podría dejar de lado la nomenclatura tradicionalmente utilizada y se podría designar al complejo de *B. tabaci* como un conjunto de hasta 47 especies independientes (Boykin & De

Barro, 2014; Boykin, Savill & De Barro, 2017; Mugerwa et al., 2018). El conjunto se encuentra en proceso de asignación de un nuevo epíteto según el Código Internacional de Nomenclatura Zoológica (Boykin, 2014).

La identificación de las especies del complejo *B. tabaci* es de mucha relevancia para la agricultura ya que cada una posee distinta resistencia a insecticidas y eficiencia en transmisión de patógenos (Perring et al., 1993). A nivel molecular, la identificación de este grupo de individuos a nivel de especie y haplotipo es utilizado por diferentes autores debido a la especificidad del gen mtCOI (McKenzie et al., 2012; Firdaus et al., 2013; Boykin & De Barro, 2014). El grado de variabilidad de este gen, ha demostrado ser un marcador molecular informativo en análisis filogenéticos y filogeográficos (Brown, 2010). Sin embargo, si se desea realizar diagnósticos periódicos de individuos de mosca blanca, varios estudios han sugerido el uso de la reacción en cadena de la polimerasa-polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción (PCR-RFLP por sus siglas en inglés) sobre la secuencia de mtCOI; como una herramienta confiable y efectiva, ya que permite analizar mayor número de muestras de forma económica en comparación a otras técnicas, es reproducible, de fácil y rápida interpretación, y permite identificar más de una especie a la vez (Bosco, Loria, Sartor & Cenis, 2006; Ma et al., 2009; Li, Jia, XiaoLi & ShuSheng, 2013).

Las especies del complejo de *B. tabaci* son vectores begomovirus, en el país se han reportado diferentes especies como el virus monopartita TYLCV en el cultivo del tomate, además de las especies bipartitas *Tomato yellow mottle virus* (ToYMoV), *Tomato leaf curl Sinaloa virus* (ToLCSiV) y *Pepper golden mosaic virus* (PepGMV) (Nakhla et al., 2005; Barboza, Blanco-Meneses, Hallwass, Moriones & Inoue-Nagata, 2014; Barboza, Blanco-Meneses, Esker, Moriones & Inoue-Nagata, 2017). Es relevante mencionar, que el complejo de *B. tabaci* es capaz de transmitir más de 380 especies de este género viral ([https://talk.ictvonline.org/ictv-reports/ictv\\_online\\_report/ssdna-viruses/w/geminiviridae/479/member-species-begomovirus](https://talk.ictvonline.org/ictv-reports/ictv_online_report/ssdna-viruses/w/geminiviridae/479/member-species-begomovirus) consultado el 29/03/2018).

Análisis del gen mtCOI, corroboran la presencia de dos especies del complejo de *B. tabaci* endémicas de América; *B. tabaci* Nuevo Mundo (NW, por sus siglas en inglés) y *B. tabaci*

NW2 (Brown, Frohlich & Rosell, 1995; Marubayashi et al., 2013). No obstante, el panorama general con respecto a la abundancia de moscas blancas indica la predominancia de la especie invasiva *B. tabaci* Medio Oriente-Asia Menor 1 (MEAM1, por sus siglas en inglés) desde su introducción al continente a finales de 1980s y gradual desplazamiento de las poblaciones nativas de *B. tabaci* NW en la mayoría de las regiones agrícolas (Brown, 1994; Morales, 2006a).

En Costa Rica estos patrones de distribución han cambiado con el tiempo, en el 2006 se detectó la presencia de *B. tabaci* NW, además de *B. tabaci* MEAM1 en diferentes regiones del país (Morales et al., 2005; Hilje & Morales, 2008). Durante en el 2009, *B. tabaci* Mediterránea (MED, por sus siglas en inglés), se reportó en la Región Central Occidental bajo condiciones de invernadero en Alfaro-Ruiz (Guevara-Coto et al., 2011), sin embargo, poco tiempo después en muestreos realizados en sitios de producción de tomate y chile dulce en el Región Central de Costa Rica (2011-2012), fue encontrada en campos de producción de tomate y chile dulce (Barboza, 2017). Lo anterior se suma a los recientes reportes en América en los que se informa la presencia de *B. tabaci* MED en cultivos en campo (Alemandri et al., 2015; McKenzie & Osborne, 2017).

En el presente documento, se utilizó la nomenclatura que hace referencia al sitio de origen de la especie de mosca blanca, es decir, *B. tabaci* NW, *B. tabaci* MEAM1 y *B. tabaci* MED (anteriormente conocidas como biotipos A, B y Q, respectivamente), por ser el sistema más utilizado previo a la incorporación del sistema tradicional binomial. Boykin (2014) propone una nueva clasificación y asignar un nombre por especies según corresponda: *Bemisia inconspicua* (NW2), *Bemisia argentifolii* (MEAM1) y *Bemisa tabaci* (MED); sin embargo, no es común que se usen estos epítetos como nomenclatura principal en las publicaciones que pude revisar.

### **Endosimbiosis bacteriana**

Un enfoque que podría explicar la diferencia de valor adaptativo y eficiencia en transmisión de patógenos en individuos tan cercanos filogenéticamente, es la presencia de distintos endosimbiontes bacterianos (Chiel et al., 2007). La endosimbiosis bacteriana es una

interacción imprescindible en las moscas blancas, y ha mostrado poseer un amplio impacto sobre la ecología de su hospedero (Baumann, 2005). Es posible encontrar dos o más endosimbiontes en un individuo, hoy se conoce, además, que la interacción de los endosimbiontes con las moscas blancas les provee aminoácidos esenciales y vitaminas del complejo B que son deficientes en el floema de la planta (Sloan & Moran, 2012; Rao et al., 2015). Los endosimbiontes de la mosca blanca se encuentran localizados con mayor frecuencia en células especializadas llamadas bacteriocitos, cuya composición bacteriana es heredada vía materna; sin embargo, pueden llegar a localizarse en uno o más tejidos como las gónadas, el intestino medio y los cuerpos grasos (Gottlieb et al., 2008; Ciancio, 2016).

Los huéspedes bacterianos de las moscas blancas pueden ser de tipo obligatorio (primarios) o facultativo (secundarios) (Moran & Baumann, 2000; Weinert, Araujo-Jnr, Ahmed & Welch, 2015). Los endosimbiontes primarios requieren del insecto para sobrevivir, así como el insecto de ellos ya que complementan su dieta (Moran & Baumann, 2000). Los endosimbiontes secundarios también son capaces de proveer nutrientes, pero muchas de sus otras funciones no se conocen a profundidad (Chiel et al., 2007). De igual forma, se pueden transmitir de manera vertical u horizontal, mientras que los primarios solo se transmiten de forma vertical (Weinert et al., 2015). Sin embargo, la principal diferencia entre ambas categorías es que los endosimbiontes secundarios participan en interacciones adicionales positivas, que pueden incrementar el valor adaptativo del hospedero, o negativas, que pueden poner en riesgo la supervivencia del individuo (Chu et al. 2011). Hasta la fecha en mosca blanca se ha descrito *Portiera aleyrodidarum* (Halomonadaceae) como endosimbionte primario, mientras que *Arsenophonus* spp. (Enterobacteriaceae), *Hamiltonella* spp. (Enterobacteriaceae), *Rickettsia* spp. (Rickettsiaceae), *Wolbachia* spp. (Rickettsiaceae), *Cardinium* spp. (Bacteriodaceae), *Fritschea* spp. (Simkaniaceae) y *Hemipteriphilus* spp. (Rickettsiaceae) son endosimbiontes secundarios (Bing, Ruan, Rao, Wang & Liu, 2012; Bing, Yang, Zchori-Fein, Wang & Liu, 2013).

Las endosimbiosis con *Hamiltonella* spp., *Rickettsia* spp. o *Wolbachia* spp., además de proveer nutrientes al insecto, confieren resistencia ante avispas parasíticas, patógenos virales/fúngicos y mejoran tolerancia al estrés térmico (Scarborough Ferrari & Godfray,

2005; Guay, Boudreault, Michaud & Cloutier, 2009; Łukasik, van Asch, Guo, Ferrari & Godfray, 2013). Los endosimbiontes *Arsenophonus* spp., *Rickettsia* spp. y *Wolbachia* spp. son capaces de alterar la reproducción de los insectos con el aparente efecto de difundirse en la población del hospedero, aunque se ha sugerido que esta capacidad requiere de la localización del simbiote en órganos reproductivos (Gottlieb et al., 2008; Engelstädter & Hurst, 2009). En particular, estudios sobre *Wolbachia* spp. indican que en artrópodos se comporta más como un parásito reproductivo, ya que puede llegar a forzar asexualidad, feminizar machos, inducir incompatibilidad citoplasmática y partenogénesis o reproducción de hembras sin fertilización (Werren, Baldo & Clark, 2008). Por este motivo, este endosimbionte se ha considerado una herramienta potencial para control biológico, siempre tomando en cuenta la cepa de la bacteria y la especie del insecto. Por ejemplo, en algunos insectos la inoculación con ciertas cepas de *Wolbachia* spp. genera un acortamiento de la esperanza de vida del hospedero, lo que podría interrumpir el tiempo requerido para el desarrollo y replicación de un patógeno en el caso de que el insecto sea vector. Además, liberaciones repetidas de machos citoplasmáticamente incompatibles puede conllevar a la disminución o eliminación de una población de insectos (Fry, Palmer & Rand, 2004; Brelsfoard & Dobson 2009; Hoffman et al., 2011; Mariño, Verle Rodrigues & Bayman, 2017; Nikolouli et al., 2017)

Los endosimbiontes bacterianos secundarios pueden participar en los patosistemas mosca blanca-virus. Por ejemplo, *Hamiltonella* spp. produce una proteína llamada GroEL, esta se caracteriza por ser una chaperona molecular que se secreta hacia la hemolinfa, en donde interactúa con proteínas de cubierta del TYLCV. Esta interacción protege al virus de degradación y como consecuencia facilita su transmisión (Gottlieb et al., 2010). Otro claro ejemplo es *Rickettsia* spp., que se encuentra con frecuencia fuera del bacteriocito y puede localizarse en la mayoría de cavidades corporales y alcanzar altas concentraciones en la mosca blanca. Este endosimbionte se correlacionó con un incremento en la eficiencia de transmisión del virus TYLCV. Estudios mostraron que la presencia de *Rickettsia* spp. en el intestino medio de la mosca blanca se relacionó inversamente con los niveles de TYLCV, lo que puede sugerir una competencia por el espacio entre el virus y la bacteria. De esta

manera, el endosimbionte acelera la traslocación del virus fuera del intestino medio hacia la hemolinfa y por ende hacia las glándulas salivales, aumentando la eficiencia de la transmisión viral (Kliot, Cilia, Czosnek & Ghanim, 2014; Czosnek, Hariton-Shalev, Sobol, Gorovits & Ghanim, 2017).

En adición al efecto individual que produce cada endosimbionte, su presencia en diferentes combinaciones puede afectar la susceptibilidad de las moscas blancas ante varios compuestos insecticidas (Chu et al., 2011). En *B. tabaci*, las infecciones con *Rickettsia* spp. la vuelven más susceptibles al pirixifeno (Kontsedalov et al., 2008). Por otra parte, si la infección mixta de *Rickettsia* spp. y *Arsenophonus* spp. ó *Arsenophonus* spp. y *Wolbachia* spp., los compuestos tiametoxam, imidacloprid, piriproxifeno y espiromesifeno causan mayor mortalidad (Ghanim & Kontsedalov, 2009).

La asociación entre determinados endosimbiontes bacterianos secundarios y las moscas blancas varía dependiendo de la localización geográfica, planta hospedera, especie y/o grupo genético de la mosca e incluso dentro de individuos de una misma población (Gueguen et al., 2010; Pan et al., 2012). También se propone que los patrones de los endosimbiontes en las moscas blancas pueden ser causados al menos parcialmente por la inercia de la población o por estocasticidad, además de la frecuencia de transmisión horizontal, la fidelidad de la transmisión vertical y el valor adaptativo de los simbioses de la mosca (Pan et al., 2012).

El impacto ecológico de los endosimbiontes sobre su hospedante, ha conllevado a su identificación en numerosas zonas de producción de hortalizas del mundo (Marubayashi et al., 2014), donde las metodologías de detección de endosimbiontes utilizan técnicas moleculares en amplia medida debido a la dificultad de establecer cultivos *in vitro* de estas bacterias. En la literatura se reportan pares de iniciadores específicos para la detección de los mismos, y tienen como objetivo la amplificación de la región del ADN ribosomal 16S y 23S (Skaljic, Zanic, Ban, Kontsedalov & Ghanim, 2010; Thierry et al., 2011; Park et al., 2012; Cass et al., 2014; Tajebe et al., 2015). En Costa Rica hasta el momento, no hay trabajos precedentes en la detección de los endosimbiontes que pueden portar las especies de mosca blanca presentes en el país.

## JUSTIFICACIÓN

El tomate es uno de los cultivos a nivel mundial más afectados por patógenos, sobre todo el daño que causa la mosca blanca al cultivo y los virus que puede transmitir (Polston & Anderson, 1997). En el país, es una de las hortalizas de mayor consumo (PIMA, 2016), la mayor producción se centra en seis regiones: Central Occidental (Alajuela y Heredia), Oriental (Cartago), Sur (Puriscal, Santa Ana y San Antonio de Belén), Brunca (Pérez Zeledón, Buenos Aires, San Vito), Pacífico Central (Orotina y Miramar) y Chorotega (Bagaces, Nicoya, Abangares, Liberia, La Cruz y Tilarán). Los sitios de mayor producción son las regiones Central Occidental, Central Oriental y Sur con 585 ha, 110 ha y 101 ha, respectivamente (Barrientos & López, 2010). El área de total de siembra abarca alrededor de 1,000 ha; mientras que la producción anual desde el 2013 al 2016 ronda las 60,000 Tm (<http://www.infoagro.go.cr/BEA/BEA27/superficieProduccion.html>) lo que genera más de 29,000 millones de colones al año (López, 2012). El Programa Nacional de Tomate (PITTA-tomate) estimó que la cantidad de empresas dedicadas a su producción y procesamiento es de alrededor de 1,292, las cuales registran 21,555 trabajadores en total (Chacón, 2008).

Dada la importancia del tomate a nivel global y en la dieta costarricense, es preciso identificar las principales especies de mosca blanca presentes en las regiones de producción, ya que son una constante amenaza al cultivo (Cardona et al., 2001). Además de poder informar a los agricultores las características biológicas del vector, los géneros o familias virales que pueden transmitir y la eficiencia de transmisión.

Entre las medidas a las que recurren algunos productores para la prevención de los daños ocasionados por la mosca blanca se encuentra la utilización excesiva de pesticidas, que conlleva implicaciones de contaminación ambiental y riesgos para la salud humana; lo que justifica la búsqueda por ampliar la visión sobre estrategias de manejo de esta plaga (Gilbertson, Rojas & Natwick, 2011). El estudio acerca de los endosimbiontes bacterianos secundarios ha mostrado ser un enfoque prometedor por su significativa influencia sobre la ecología de la mosca blanca, además que modifican drásticamente la eficiencia de

transmisión de patógenos y el valor adaptativo de las moscas blancas en los distintos sitios que coloniza (Baumann, 2005). Por lo anterior, es importante detectar e identificar las bacterias endosimbióticas asociadas a estos hemípteros en Costa Rica.

## **OBJETIVOS**

### **Objetivo general**

Determinar la distribución de las especies de mosca blanca y la frecuencia de sus endosimbiontes bacterianos secundarios en las principales zonas productoras de tomate de Costa Rica.

### **Objetivos específicos**

- i) Identificar las especies de mosca blanca presentes en las principales zonas de cultivos de tomate.
- ii) Analizar las secuencias del gen que codifica para el citocromo C oxidasa mitocondrial subunidad I (mtCOI) de moscas blancas recolectadas.
- iii) Estimar la frecuencia de los endosimbiontes bacterianos secundarios *Arsenophonus* spp., *Hamiltonella* spp., *Rickettsia* spp. y *Wolbachia* spp en los individuos recolectados.

## **METODOLOGÍA**

### **Recolección de mosca blanca**

Muestras de mosca blanca fueron recolectadas de plantaciones comerciales de tomate durante los años 2015 y 2016. Se visitaron total de 32 y 49 plantaciones, respectivamente (Fig. 1, Cuadro 1). La recolecta de los individuos se realizó de forma manual o mediante un aspirador, las moscas se colocaron en viales con alcohol al 70 % y se almacenaron a -20 °C para su posterior análisis en las instalaciones del Centro de Investigación en Biología Celular y Molecular (CIBCM), Universidad de Costa Rica. Todos los insectos recolectados por plantación constituyen una muestra, donde al menos cinco individuos por muestra fueron analizados, con pocas excepciones donde menos individuos fueron capturados.

### **Extracción de ADN de moscas blancas**

La extracción de ADN se realizó de forma individual mediante una modificación al método de Walsh et al. (1991) usando Chelex®. Cada individuo se maceró en seco en un tubo de 1,5 mL y luego se continuó con un añadido de 30 µL de agua destilada. Posteriormente a estos tubos se les agregó 30µL de Chelex® al 50% y se completó la homogenización. Se procedió a incubar las soluciones a 56 °C por 15 min y a 99 °C por 3 min. Inmediatamente después se centrifugó a 14 000 rpm durante 5 min. El ADN total se obtuvo extrayendo 30 µL del sobrenadante de cada tubo.

### **Identificación de la especie de mosca blanca mediante PCR-RFLP**

Se realizó una PCR para amplificar un fragmento del gen mtCOI, utilizando los iniciadores C1-J-2915 (Simon et al., 1994) y 801c (Frohlich, Torres-Jerez, Bedford, Markham & Brown, 1999) de aprox. 800 pb. La PCR incluyó DreamTaq™ PCR Master Mix (2X) (Thermo Fisher Scientific, EEUU) a concentración final de 1X, 3 µL de ácidos nucleicos y 0,3 µM de los iniciadores antes mencionados para una reacción de 25 µL. Se utilizó una optimización del perfil térmico descrito por Frohlich et al., 1999 que posee una

desnaturalización inicial de 95 °C por 5 min, seguido por 35 ciclos de 95 °C por 1 min, 37 °C por 45 s y 70 °C por 30 s y una extensión final de 72 °C por 5 min.

El producto de PCR fue digerido, por aparte, con las enzimas de restricción *Tru9I* (Promega, EEUU) y *TaqI* (Thermo Fisher Scientific, EEUU). Cada reacción estuvo conformada por 1 U de la enzima, la solución amortiguadora de la enzima correspondiente y agua para un volumen final de 15 µL. Posteriormente se incubó a 65 °C por 3 h. Los fragmentos de ADN fueron visualizados en un gel de agarosa al 2,5 % y teñidos con GelRed®. El patrón de bandas respectivo para cada especie fue identificado según lo descrito por Bosco et al. (2006), que permite diferenciar *B. tabaci* MEAM1, *B. tabaci* MED, *B. tabaci* Asia I, *B. tabaci* Sub-Sahara África 2, *B. tabaci* Italia y *T. vaporariorum*.

#### **Análisis de secuencias de la región parcial del gen mtCOI**

Se secuenció la región parcial del mtCOI (~800pb) de 89 individuos seleccionados (Cuadro 1) y el producto de PCR fue enviado a la empresa Macrogen Inc. (Corea). Las secuencias se ensamblaron utilizando la herramienta computacional Staden (Bonfield, Smith & Staden 1995) y se alinearon mediante el algoritmo MUSCLE del software Molecular Evolutionary Genetics Analysis, MEGA 7 (Kumar, Stecher & Tamura, 2016). La similaridad de cada secuencia fue comparada mediante la herramienta BlastN con secuencias disponibles en las bases de datos (Altschul, Gish, Miller, Myers & Lipman, 1990). El número de haplotipos para cada especie fue analizado utilizando el programa DnaSP vrsn 5.10.1; en donde se incluyeron 52 secuencias de *T. vaporariorum*, 29 de *B. tabaci* MED y una de *B. tabaci* MEAM1, obtenidas al secuenciar al menos un individuo por especie de cada cantón muestreado. Los haplotipos fueron comparados con los descritos por Barboza (2017) para América, mediante el análisis de fragmentos equivalentes de 532 pb para *T. vaporariorum* y de 657 pb para *B. tabaci* MED y *B. tabaci* MEAM1.

El análisis de haplotipos de la región del gen mtCOI de *B. tabaci* NW, tomó en cuenta las siete secuencias obtenidas en esta investigación; además de 21 accesiones de la especie disponibles en GenBank y reportadas para América (Cuadro S3). Una secuencia de cada haplotipo se utilizó para construir el árbol filogenético utilizando un modelo bayesiano. Se

utilizó Mr. Bayes 3.2.6 (Huelsenbeck, Ronquist, Nielsen & Bollback, 2001); considerando 10 millones de generaciones, ocho cadenas de Markov y muestreando cada 2 000 generaciones. Se empleó un método de sustitución nucleotídica mixto (Ronquist & Huelsenbeck, 2003) y se colocó a *B. tabaci* NW2 (JN689353) como grupo externo.

### **Detección de endosimbiontes bacterianos secundarios**

Cada individuo de mosca blanca fue tamizado para determinar la presencia de endosimbiontes bacterianos secundarios. Se realizaron cuatro PCR independientes que amplificaron los genes del ADNr 23S de *Arsenophonus* spp. y 16S de *Wolbachia* spp., *Hamiltonella* spp. y *Rickettsia* spp. (Cuadro S4). Cada reacción contuvo DreamTaq™ PCR Master Mix (2 X) (Thermo Fisher Scientific, EEUU) a una concentración final de 1 X, 2,5 µL de ADN, 0,3 µM de cada iniciador, para una reacción de 12,5 µL.

Para comprobar la especificidad de cada reacción de PCR, muestras al azar de cada endosimbionte fueron secuenciadas. La bacteria *Hamiltonella* spp. presentó una reacción cruzada con *Arsenophonus* spp. por lo que se probó un segundo par de iniciadores descritos por Zchori-Fein & Brown (2002), Ham-F/Ham-R y además se diseñó una nueva pareja de iniciadores complementaria a otra región conservada del 16S ADNr de *Hamiltonella* spp.; no obstante, no fue posible solucionar los resultados iniciales. Finalmente se realizó una prueba de  $\chi^2$  para evaluar la asociación entre la presencia de los tres endosimbiontes bacterianos secundarios en cuestión y las especies de mosca blanca identificadas. Los datos fueron analizados utilizando el paquete estadístico R, versión 3.4.2 (<http://cran.r-project.org>).

## **RESULTADOS**

### **Identificación de la especie de mosca blanca mediante PCR-RFLP**

Un total de 81 muestras fueron recolectadas en plantaciones comerciales de tomate, distribuidas en las principales zonas productoras del cultivo en Costa Rica. Los fragmentos del mtCOI de 628 individuos fueron analizados por PCR-RFLP. Se analizaron 178 y 450 individuos durante los dos periodos de muestreo del 2015 y 2016, respectivamente. Fue

posible identificar las especies de *T. vaporariorum*, *B. tabaci* MED, *B. tabaci* MEAM1 y *B. tabaci* NW. Es importante señalar que en ésta última se obtuvieron cuatro bandas características de 184 pb, 138 pb, 107 pb y 84 pb cuando se digirió con *Tru9I*, mientras que no se digirieron con *TaqI*; estos patrones no se encuentran descritos por Bosco et al. (2006). Las provincias con más sitios de muestreo y moscas blancas recolectadas son Alajuela, Heredia y Cartago, que forman parte de la Región Central de Costa Rica donde se localizan la mayor cantidad de hectáreas dedicadas a la producción de tomate. *T. vaporariorum* se encontró en mayor abundancia en cultivos de tomate durante los dos años de recolecta; se identificaron un total de 430 individuos (68.5 %), seguida por la presencia de 169 individuos de *B. tabaci* MED (26.9 %) y en menor abundancia con respecto a las dos primeras especies, *B. tabaci* NW y *B. tabaci* MEAM1 con 27 (4.3 %) y 2 (0.3 %) individuos identificados respectivamente.

En las plantaciones de muestreo del 2015, *T. vaporariorum* se encontró en Alajuela en un 11 % de abundancia vrs 10 % de *B. tabaci* MED; en Cartago estas mismas dos especies se presentaron en un 8 % y 13 % respectivamente, mientras que en Guanacaste únicamente se encontraron individuos de *B. tabaci* NW que representaron un 6 % de las especies identificadas durante ese periodo. En Heredia se detectaron sólo individuos de *T. vaporariorum* (11 %), entretanto en Puntarenas la abundancia de esta especie fue de un 28 % vrs un 1 % de *B. tabaci* MED y un 2 % de *B. tabaci* NW. En San José la abundancia de *T. vaporariorum* fue de 6 % vrs 5 % de *B. tabaci* MED.

Los muestreos realizados en el 2016 mostraron una abundancia de la mosca blanca de invernadero en Alajuela en un 18 % vrs 12 % de *B. tabaci* MED y un 0.4 % de *B. tabaci* NW. Además, es importante señalar que en esta provincia se encontraron los únicos individuos de *B. tabaci* MEAM1 del estudio, aunque en baja abundancia (0.4 %). En Cartago se presentó *T. vaporariorum* en un 33 % vrs 11 % de *B. tabaci* MED y 2 % de *B. tabaci* NW, mientras que en Heredia *T. vaporariorum* estuvo en un 7 % y *B. tabaci* MED en un 3 %. En Puntarenas se identificaron dos especies; *T. vaporariorum* y *B. tabaci* NW, con una abundancia del 11 % y 1%, respectivamente; en menor proporción en San José se encontró sólo 1 % de *T. vaporariorum* respecto al total de individuos muestreados ese año.

Cuadro 1. Resumen de la abundancia de individuos de mosca blanca identificados durante los años 2015 y 2016 en las zonas productoras de tomate de Costa Rica. Se indica el cantón y provincia donde fueron recolectados, así como el número de accesión del GenBank con el que se depositaron secuencias de un fragmento del gen citocromo C oxidasa I mitocondrial (mtCOI).

Año	Cantón (número de plantaciones)	Provincia	% especie de mosca blanca* (número de individuos)				Total No. individuos **	Secuencia del Genbank (número de secuencias)
			Tv <sup>†</sup>	MED <sup>‡</sup>	NW <sup>▪</sup>	MEAM1 <sup>••</sup>		
2015	Atenas (2), Naranjo (1), Zarcero (1)	Alajuela	11 (19)	10 (18)	0	0	37/178	
2016	Atenas (2), Naranjo (5), San Ramón (6), Alajuela (3)		18 (82)	12 (56)	0.4 (2)	0.4 (2)	142/450	MH510175 <sup>†</sup> (14), MH510176 <sup>‡</sup> (12), MH510178 <sup>▪</sup> (1), MH510177 <sup>••</sup> (1)
2015	Turrialba (3), Jiménez (1), Alvarado (1)	Cartago	8 (14)	13 (23)	0	0	37/178	
2016	Turrialba (6), Jiménez (4), Alvarado (1), Valverde Vega (4), Paraíso (5), El Guarco (1)		33 (147)	11 (49)	2 (8)	0	204/450	MH510175 <sup>†</sup> (25), MH510176 <sup>‡</sup> (13), MH510178 <sup>▪</sup> (3)
2015	Abangares (1), Tilarán (1), Bagaces (2), Nicoya (1)	Guanacaste	0	0	6 (10)	0	10/178	
2015	San Pablo (1), Santo Domingo (1)	Heredia	11 (20)	0	0	0	20/178	
2016	San Isidro (1), Santa Bárbara (4)		7 (32)	3 (12)	0	0	44/450	MH510175 <sup>†</sup> (4), MH510176 <sup>‡</sup> (2)
2015	Montes de Oro (1), Puntarenas (4), Coto Brus (8)	Puntarenas	28 (50)	1 (2)	2 (3)	0	55/178	MH510175 <sup>†</sup> (2), MH510176 <sup>‡</sup> (1), MH510178 <sup>▪</sup> (1)
2016	Puntarenas (6)		11 (50)	0	1 (4)	0	54/450	MH510175 <sup>†</sup> (5), MH510178 <sup>▪</sup> (2)
2015	Puriscal (3)	San José	6 (10)	5 (9)	0	0	19/178	MH510175 <sup>†</sup> (1), MH510176 <sup>‡</sup> (1)
2016	Moravia (1)		1 (6)	0	0	0	6/450	MH510175 <sup>†</sup> (1)
Total No. individuos			68.5 (430)	26.9 (169)	4.3 (27)	0.3 (2)	628	

\* Porcentaje calculado con respecto al total de individuos muestreados por año.

\*\* Total de individuos muestreados en la provincia/ total de individuos muestreados por año.

Tv<sup>†</sup> = *T. vaporariorum*, MED<sup>‡</sup> = *B. tabaci* MED, NW<sup>▪</sup> = *B. tabaci* NW, MEAM1<sup>••</sup> = *B. tabaci* MEAM1.

Fue posible encontrar plantaciones de tomate donde se detectó la presencia de dos o más especies de mosca blanca. En las plantaciones visitadas durante el 2015, *T. vaporariorum* y *B. tabaci* MED se encontraron coexistiendo en siete de las plantaciones de la Región Central, además de un sitio de muestreo en la provincia de Puntarenas ubicado en la frontera con Panamá. Cerca de este, también se pudo identificar de forma simpátrica a *T. vaporariorum* y *B. tabaci* NW; sin detección de la presencia de más de dos especies en un mismo sitio. En las restantes 16 plantaciones distribuidas por todo el país solo se identificó una especie, ya fuera *T. vaporariorum*, *B. tabaci* MED o *B. tabaci* NW (Fig. 1A). Para el año 2016 y considerando las 49 plantaciones muestreadas, la combinación de *T. vaporariorum* y *B. tabaci* MED se encontró en 21 de estas, siendo la más frecuente y distribuida por toda la región del Región Central. Es importante señalar la combinación de especies tales como *T. vaporariorum*, *B. tabaci* MED y *B. tabaci* NW que se detectó en la provincia de Cartago y Alajuela; también se encontraron muestras como por ejemplo en Alajuela, donde se detectó la combinación de *T. vaporariorum*, *B. tabaci* MED y *B. tabaci* MEAM1 o en Cartago donde se encontró coexistiendo a *T. vaporariorum* y *B. tabaci* NW. En un total de 18 muestras, solo fue posible identificar una especie: *T. vaporariorum*, *B. tabaci* MED o *B. tabaci* NW (Fig. 1B).

La altitud fue una de las variables a considerar en este estudio, la mayoría de las plantaciones de tomate analizadas se localizan entre los 800 y 1600 m s.n.m. En este rango fue posible encontrar todas las especies de mosca blanca identificadas. *B. tabaci* NW es la especie que se encuentra con mayor frecuencia en sitios ubicados por debajo de los 800 m s.n.m, mientras que *B. tabaci* MED se encuentra incluso a alturas superiores a los 1600 m s.n.m. Por otra parte, *T. vaporariorum* está distribuida en todos los cultivos de tomate y en todos los niveles de altitud y los dos únicos individuos de *B. tabaci* MEAM1 se reportan a aproximadamente 800 m s.n.m

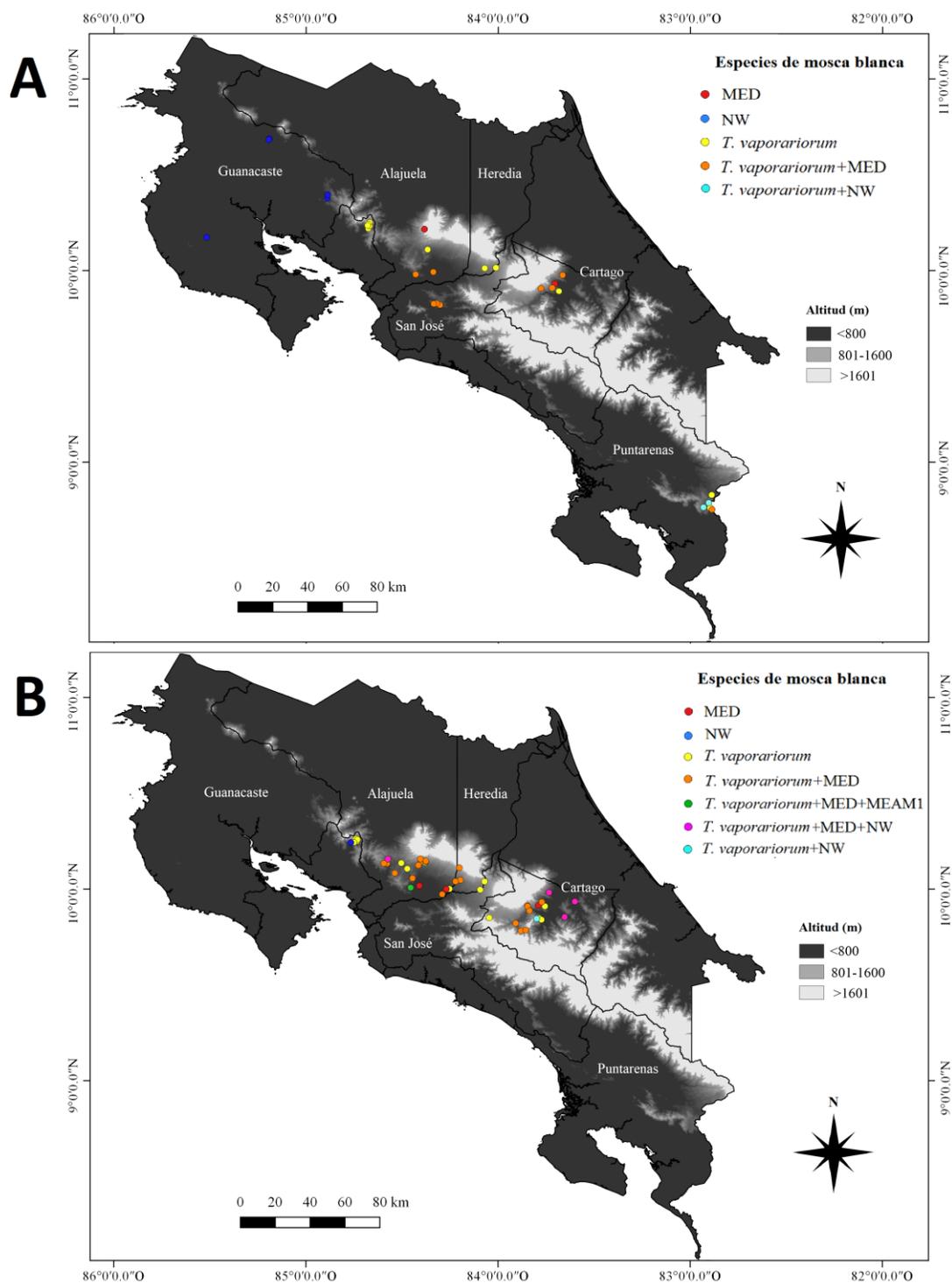


Fig. 1 Distribución de las especies de mosca blanca identificadas en las plantaciones de tomate visitadas durante el año 2015 (A) y 2016 (B).

### **Análisis de secuencias de la región parcial del gen mtCOI**

Se secuenció una región parcial del mtCOI de 89 individuos de mosca blanca (previamente identificados por PCR-RFLP). Se encontró la presencia de un único haplotipo de cada una de las cuatro especies de mosca blanca identificadas, depositadas con el número de accesión MH510175 (*T. vaporariorum*), MH510176 (*B. tabaci* MED), MH510178 (*B. tabaci* NW) y MH510177 (*B. tabaci* MEAM1); la distribución de los haplotipos en las zonas muestreadas se detalla en el cuadro 1. Los haplotipos encontrados en las secuencias de *T. vaporariorum*, *B. tabaci* MED y *B. tabaci* MEAM1 se denotaron como Tv-i, MED-i y MEAM1-i, según lo descrito por Barboza (2017). Es importante recordar que Tv-i concuerda con secuencias descritas previamente para Costa Rica en cultivos de tomate de la Región Central (GenBank no. KY441523), sin embargo, en este estudio también se encontró en muestras procedentes de regiones más alejadas como Puntarenas (Coto Brus). Este haplotipo se ha identificado en otros países como Francia (GenBank no. KJ475453) y España (GenBank no. AM179446). MED-i también se ha descrito anteriormente en este cultivo en Cartago y Alajuela (GenBank no. KY441492); además en Estados Unidos se identificó en yerberas y margaritas (GenBank no. EU427721), en Argentina se ha descrito para frijol común (GenBank no. KJ606633), mientras que en Chipre está presente en frijol común, pepino y hierbas (GenBank no. AM944347), en Siria hay reportes en papa (GenBank no. AB297895), entre otros. El haplotipo MEAM1-i se encontró en Alajuela (Atenas) en el 2016 y coincide con secuencias previamente reportadas en individuos de Cartago presentes en cultivos de chile dulce y frijol común (GenBank no. KY441488). Este haplotipo es frecuente en América y ha sido reportado en más de 20 países alrededor del mundo en distintos tipos de cultivos (Barboza, 2017). Por último, hay siete secuencias de *B. tabaci* NW en Costa Rica que comparten el haplotipo NW-xv. Éstas se encontraron presentes en diferentes sitios de producción de tomate, localizadas en Alajuela (San Ramón), Cartago (Turrialba, Jiménez) y Puntarenas (Puntarenas, Coto Brus). En América se encontraron 15 haplotipos de esta especie y se nombraron mediante números romanos (Fig. 2). El árbol filogenético muestra que el haplotipo NW-xv se agrupa con secuencias de América reportadas para esta especie y se encuentra más cercano filogenéticamente a los

individuos de mosca blanca descritos en Panamá (DQ130060, DQ130061), sin embargo, no coincide con ninguna secuencia previamente reportada para la especie en América.

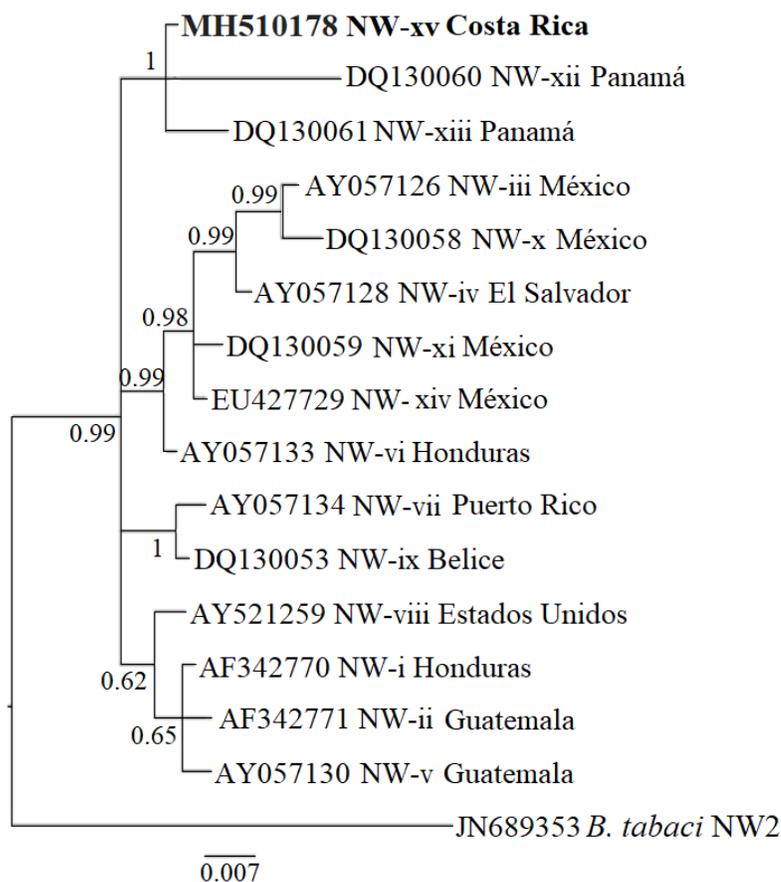


Fig. 2 Árbol filogenético de *B. tabaci* NW considerando 657 nucleótidos de las secuencias del gen citocromo C oxidasa mitocondrial I (mtCOI) reportadas en América y una secuencia de *B. tabaci* NW2 (GenBank no. JN689353) proveniente de Brasil como grupo externo. Las secuencias se alinearon utilizando MUSCLE y el árbol se estimó mediante inferencia Bayesiana. Los números cercanos a las ramas representan las probabilidades posteriores Bayesianas; la barra indica el número de sustituciones por sitio. Los haplotipos se encuentran citados según la numeración dada en el cuadro S3. El haplotipo identificado en este estudio se encuentra señalado en negrita.

### **Detección de endosimbiontes bacterianos secundarios**

El total de los 628 individuos de mosca blanca identificados se tamizaron para determinar la presencia de endosimbiontes bacterianos secundarios. Dos productos de PCR de cada endosimbionte fueron analizados mediante secuenciación y se utilizaron como control positivo durante las subsiguientes amplificaciones.

Se observó una asociación entre la especie de mosca blanca (*T. vaporariorum* y *B. tabaci* MED) y el género de los endosimbiontes evaluados (*Arsenophonus* spp., *Wolbachia* spp. y *Rickettsia* spp.), tanto en los sitios de muestreo del año 2015 ( $\chi^2=164$ , gl=2,  $p<0.001$ ) como los del año 2016 ( $\chi^2=364$ , gl=2,  $p<0.001$ ). La asociación de *B. tabaci* NW y *B. tabaci* MEAM1 no fue incluida en la prueba estadística debido al escaso número de individuos identificados de estas especies.

La frecuencia de *Arsenophonus* spp. en *T. vaporariorum* en los sitios de recolecta del 2015 y 2016 es de un 85 % (96 de 113 individuos) y 81.4 % (258 de 317 individuos), respectivamente. Mientras que *Rickettsia* spp. se encontró en *B. tabaci* MED en una frecuencia de 94.2 % (49 de 52 individuos) y 92.3 % (108 de 117 individuos). En *B. tabaci* MED fue posible encontrar también *Wolbachia* spp., con una frecuencia de 69.2 % (36 de 52 individuos) y 76 % (89 de 117 individuos).

Las combinaciones de endosimbiontes por especie de mosca blanca identificados en los cultivos visitados durante los años 2015 y 2016 se observan en la fig. 3. Los resultados de ambos muestreos son similares entre sí; se encontró una mayor cantidad de endosimbiontes en la especie *B. tabaci* MED en comparación con *T. vaporariorum* y *B. tabaci* NW, siendo la combinación de *Wolbachia* spp. y *Rickettsia* spp. la más frecuente en *B. tabaci* MED. En los individuos de *B. tabaci* NW recolectados durante el año 2015 no se detectaron endosimbiontes, sin embargo, el análisis de los individuos de esta especie identificados durante el 2016 muestra un 35.7 % (5 de 14 individuos) de simbiosis con *Rickettsia* spp. Resultados similares se encontraron en *B. tabaci* MEAM1 (figura no mostrada), ya que los dos individuos analizados presentaron simbiosis con esa misma bacteria.

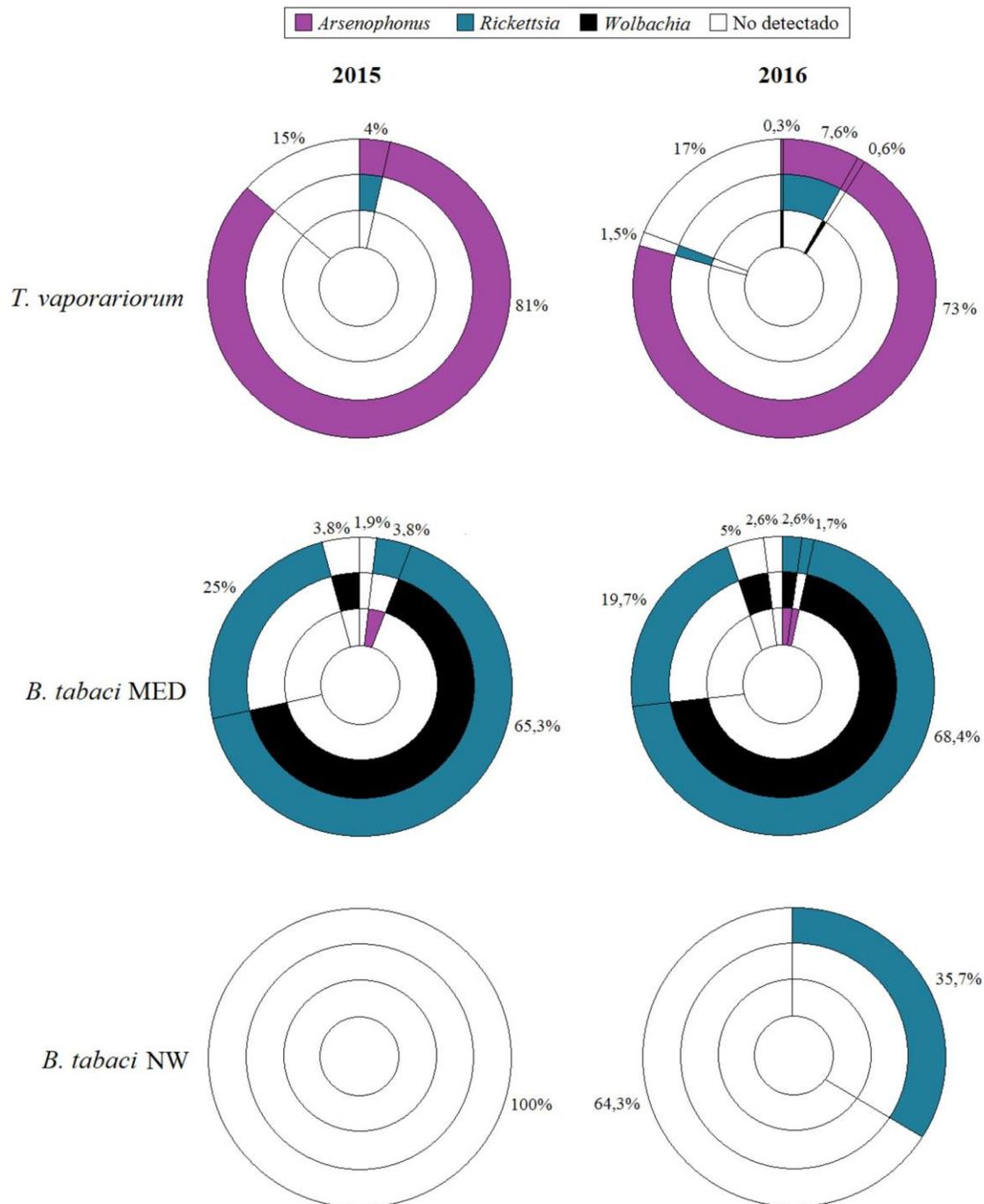


Fig. 3 Frecuencia de las combinaciones de endosimbiontes *Arsenophonus* spp., *Rickettsia* spp. y *Wolbachia* spp. presentes en las especies de mosca blanca *T. vaporariorum*, *B. tabaci* MED y *B. tabaci* NW identificados en los sitios de muestreo del 2015 y 2016.

La información acerca del número de endosimbiontes bacterianos detectados por especie, y provincia de recolecta se resume en el Cuadro 2, en donde es posible observar que la alta frecuencia de *Arsenophonus* spp. en *T. vaporariorum* y de *Wolbachia* spp. y *Rickettsia* spp. en *B. tabaci* MED se mantiene a través de las distintas provincias donde se realizó el muestreo. *Arsenophonus* spp. se encontró presente en la mayoría de los individuos de *T. vaporariorum* analizados en Alajuela, Cartago, Heredia y San José, y representó un 24 %, 36 %, 11.9 %, 23 % y 2.5 % respectivamente, del total de individuos que tuvieron endosimbiosis con esa bacteria. *Arsenophonus* spp. también mostró simbiosis con *B. tabaci* MED, sin embargo, se encontró en una baja abundancia en las muestras analizadas de Alajuela, Cartago, Heredia, Puntarenas y San José ( $\leq 1\%$ ). En estas provincias, *Rickettsia* spp. predominó en los individuos de *B. tabaci* MED, donde constituyó un 34 %, 33.8 %, 5.6 %, 1 % y 4.5 % respectivamente, del total de individuos con los que presentó endosimbiosis. De forma simultánea, *Rickettsia* spp. estuvo presente en individuos de *T. vaporariorum* en Alajuela, Cartago, Heredia y San José ( $\leq 8\%$ ).

La especie *B. tabaci* NW mostró simbiosis con *Rickettsia* spp. únicamente en los individuos muestreados en Alajuela (1 %) y Cartago (1.5 %). Llama la atención que a los 17 individuos de la especie *B. tabaci* NW recolectados en Guanacaste y Puntarenas no se les detectó ninguno de los tres endosimbiontes evaluados (Cuadro 2). Ambos sitios poseen en común que tienen baja o nula abundancia de *B. tabaci* MED, en cambio, algunos individuos de *B. tabaci* NW identificados en Alajuela y Cartago en donde hay mayor abundancia de *B. tabaci* MED, poseen la presencia de *Rickettsia* spp., endosimbionte con alta frecuencia en *B. tabaci* MED.

Por otra parte, *Wolbachia* spp. se detectó en *B. tabaci* MED de Alajuela (43 %), Cartago (45.3 %), Heredia (4.7 %), Puntarenas (1.6 %) y San José (3.1 %), mientras que estuvo presente en individuos de *T. vaporariorum* en Alajuela y Cartago en escasa abundancia ( $\leq 2\%$ ).

Cuadro 2. Resumen de la abundancia de individuos de mosca blanca identificados en las zonas productoras de tomate de Costa Rica a los que se les detectó la presencia de tres géneros de endosimbiontes bacterianos (*Arsenophonus* spp., *Rickettsia* spp., *Wolbachia* spp.). Se indica la provincia donde se recolectaron los individuos de mosca blanca.

Provincia	Especie de mosca blanca (número de individuos)	% endosimbionte* (número de individuos)		
		<i>Arsenophonus</i> spp.	<i>Rickettsia</i> spp.	<i>Wolbachia</i> spp.
Alajuela	<i>T. vaporariorum</i> (101)	24 (87)	4 (8)	1 (1)
	<i>B. tabaci</i> MED (74)	1 (3)	34 (67)	43 (55)
	<i>B. tabaci</i> NW (2)	0	1 (2)	0
	<i>B. tabaci</i> MEAM1 (2)	0	1 (2)	0
Cartago	<i>T. vaporariorum</i> (161)	36 (131)	8 (15)	2 (2)
	<i>B. tabaci</i> MED (72)	0.3 (1)	33.8 (67)	45.3 (58)
	<i>B. tabaci</i> NW (8)	0	1.5 (3)	0
Guanacaste	<i>B. tabaci</i> NW (10)	0	0	0
Heredia	<i>T. vaporariorum</i> (52)	11.9 (43)	5.6 (11)	0
	<i>B. tabaci</i> MED (12)	0.6 (2)	6.1 (12)	4.7 (6)
Puntarenas	<i>T. vaporariorum</i> (100)	23 (84)	0	0
	<i>B. tabaci</i> MED (2)	0	1 (2)	1.6 (2)
	<i>B. tabaci</i> NW (7)	0	0	0
San José	<i>T. vaporariorum</i> (16)	2.5 (9)	0	0
	<i>B. tabaci</i> MED (9)	0.3 (1)	4.5 (9)	3.1 (4)
	Total No. individuos	361	198	128

\* Porcentaje calculado con respecto al total de individuos que presentan el endosimbionte.

## DISCUSIÓN

En este estudio se muestrearon individuos de mosca blanca en un total de 81 plantaciones de tomate de Costa Rica, visitadas durante los años 2015 y 2016; la mayoría de los sitios se ubicaron en la Región Central, donde se concentra la mayor área de producción de esta hortaliza. *T. vaporariorum* fue la especie que se encontró en mayor abundancia. Reportes previos indican la presencia de esta mosca blanca en el país, en asociación con distintos cultivos, sobre todo el tomate (Morales, 2006b, Guevara-Coto et al., 2011; Vargas-Asencio et al., 2013). Estos resultados son similares a los reportados por Barboza (2017), ya que durante los años 2011 y 2012 se realizó un muestreo en cultivos de tomate y chile dulce, donde se encontró a *T. vaporariorum* como la especie predominante.

Además, se confirma la presencia de la especie invasiva *B. tabaci* MED en plantaciones de tomate en campo, con una amplia distribución en la Región Central. Estos resultados son importantes de señalar puesto que, durante el 2009, Guevara-Coto et al. (2011), reportan por primera vez la presencia de esta especie en invernadero en la región de Alfaro Ruiz, Zarcero. Muestreos posteriores, realizados por Barboza (2017) identifican a esta especie en campo e invernaderos en el país. En América, *B. tabaci* MED se reportó por primera vez en el 2005 en plantas ornamentales de Estados Unidos (Dennehy et al., 2005); también se reportó en cultivos ornamentales de México (Martinez-Carrillo & Brown, 2007) y Guatemala (Bethke, Byrne, Hodges, Mckenzie & Shatters Jr, 2009), seguido por la detección de su presencia en Argentina/Uruguay en chile y melón (Grille, Gauthier, Buenahora, Basso & Bonato, 2011), y en Brasil en chile y camote (Barbosa et al., 2015); todos estos en condiciones de invernadero. Sin embargo, reportes recientes llaman la atención sobre la presencia de la especie en cultivos en campo, tales como el frijol en Argentina (Alemandri et al., 2015) y en ornamentales de Estados Unidos (McKenzie & Osborne, 2017), además de Costa Rica.

Es importante mencionar que la escasa abundancia de *B. tabaci* MED en algunos sitios de recolecta del país como en los cantones de la provincia de Puntarenas (Cuadro 1) no debe ser tomada a la ligera, ya que una baja densidad de mosca blanca como vector viral en un

momento dado no siempre resulta o correlaciona en una baja incidencia de las enfermedades que transmiten debido al periodo que tardan en manifestarse (Njoroge, Kilalo, Miano & Mutisya, 2016). Por esta razón, las medidas de prevención por parte de los agricultores se deben direccionar tanto para *T. vaporariorum* como para *B. tabaci* MED, puesto que la presencia de ambas es el escenario más común en los cultivos de tomate evaluados.

Fue posible detectar *B. tabaci* NW (NW-xv), reportada en el país por última vez desde hace más de 10 años (Morales, 2006b). Es importante señalar que esta especie se creía ausente, debido a la presencia de las moscas blancas invasivas *B. tabaci* MED y *B. tabaci* MEAM1. En este trabajo se encontró en mayor abundancia al margen de la Región Central, en donde el cultivo de tomate, se encuentra en menor cantidad. Lo anterior podría mostrar que esta especie puede estar siendo desplazada por especies invasivas, sin embargo, aún es posible encontrar la presencia de *B. tabaci* NW, *B. tabaci* MED y *T. vaporariorum* de forma simpátrica en tomate. De forma similar, en Venezuela y Brasil luego de la invasión de *B. tabaci* MEAM1, los especímenes de *B. tabaci* NW fueron hallados en cultivos de tomate que son manejados con un régimen de agricultura sostenible, en contraste con los cultivos comerciales de tomate que son sometidos al uso masivo de pesticidas, en donde la especie invasiva desplazó casi por completo a las especies nativas (Romay, Geraud-Pouey, Chirinos & Demey, 2011; Marubayashi et al., 2013). Se podría sugerir que, en Costa Rica, *B. tabaci* MED está ocasionando un efecto equivalente, debido a que posee menor susceptibilidad a varios compuestos insecticidas, como repetidas aplicaciones de piriproxifeno o neonicotinoides (Horowitz & Ishaaya, 2014).

En contraste, *B. tabaci* MEAM1 se encontró en menor abundancia. Esta especie fue reportada hace cinco años ausente en áreas de producción de tomate y en baja abundancia en chile dulce y frijol (Barboza, 2017). Reportes para América han indicado que *B. tabaci* MEAM1 es la especie predominante del complejo de *B. tabaci* en la mayoría de las regiones agrícolas (Morales, 2006a; Marubayashi et al., 2012; McKenzie et al., 2012; Rodríguez, Bueno, Cardona & Morales, 2012; Romay et al., 2016), aunque Alemandri et al., 2015 reporta una frecuencia similar de *B. tabaci* MEAM1 que de *B. tabaci* NW2 en

cultivos de frijol de Argentina. Pese a su predominancia en América, estudios en ambientes controlados señalan que la aplicación de los compuestos insecticidas más comunes, causan una selección artificial de *B. tabaci* MED por sobre *B. tabaci* MEAM1 en cultivos de tomate (Sun et al., 2013); esta podría ser una de las razones por la cual se reporta escasa abundancia de *B. tabaci* MEAM1 en estos cultivos de Costa Rica.

*T. vaporariorum*, especie endémica de América al igual que *B. tabaci* NW, ha mostrado tener una baja diversidad genética (Wainaina et al., 2017). Se han reportado 22 haplotipos en América y en Costa Rica se han descrito 11 distribuidos en distintas plantaciones de tomate y chile dulce (Vargas-Asencio et al., 2013; Barboza, 2017). De estos, sólo se encontró el Tv-i en los sitios de muestreo del 2015 y 2016, no obstante, fue reportado en una abundancia predominante respecto a los demás haplotipos por Barboza (2017). En Costa Rica, se han encontrado dos haplotipos de *B. tabaci* MED (*B. tabaci* MED-i y MED-ii) de los seis reportados para América (Barboza, 2017). Sin embargo, en este trabajo solamente se identificó la presencia de *B. tabaci* MED-i, y no fue posible encontrar el haplotipo de *B. tabaci* MED-ii, previamente identificado en una baja abundancia en Alfaro Ruiz, Zarcero (Guevara-Coto et al., 2011; Barboza, 2017). El monitoreo de los haplotipos de especies invasivas en el país es importante, ya que por ejemplo, de Moraes et al. (2017) sugieren que la heterogeneidad genética de *B. tabaci* MED provee información acerca del posible número de introducciones de las poblaciones de esta especie en un determinado sitio y cultivo.

*B. tabaci* MEAM1, especie invasiva del continente americano al igual que *B. tabaci* MED, fue encontrada en escasa abundancia como MEAM1-i. Este haplotipo es muy común en América y se ha observado en cultivos de frijol en Argentina de forma simpátrica con *B. tabaci* NW2 y *B. tabaci* MED (Alemandri et al., 2015), de igual forma en Costa Rica con *T. vaporariorum* y *B. tabaci* MED en tomate (Barboza, 2017), como también se observó en la presente investigación. En contraste con esto, el haplotipo NW-xv no ha sido descrito previamente para América, siendo que es el único continente en donde se reportan secuencias de *B. tabaci* NW, a excepción de una secuencia en Sudán (Gueguen et al., 2010). La distribución de sus haplotipos se localiza principalmente en Estados Unidos y

Mesoamérica (Fig. 2); en Suramérica la especie NW2 se encuentra con mayor frecuencia que *B. tabaci* NW (Marubayashi et al., 2012; Alemandri et al., 2015).

Respecto al análisis de los endosimbiontes bacterianos, se consideró la presencia de tres endosimbiontes de mosca blanca presentes en plantaciones de tomate en las principales regiones productoras del país que dio como resultado una asociación entre las especies de endosimbiontes y la especie de mosca blanca identificada. *Arsenophonus* spp. se detectó en *T. vaporariorum* en más del 80 % de los individuos recolectados, mientras que otras combinaciones de endosimbiontes se observaron en baja frecuencia (Fig 3). Estos resultados coinciden con los de Kapantaidaki et al. (2014), que sugiere que debido a la poca variabilidad genética de *T. vaporariorum*, *Arsenophonus* spp. se encuentra fijado casi por completo en varias poblaciones de *T. vaporariorum* del mundo y describe la combinación con otros endosimbiontes como un evento esporádico.

En Israel, posible origen de la especie *B. tabaci* MED (Tsagkarakou, Tsigenopoulos, Gorman, Lagnel & Bedford, 2007), se reporta que estos individuos poseen una composición endosimbiótica principalmente de *Arsenophonus* spp. (87.0 %) *Rickettsia* spp. (74.0 %) y *Wolbachia* spp. (33.0 %) (Chiel et al., 2007). Sin embargo, en América Latina estos porcentajes varían entre los distintos países y en su mayoría *Arsenophonus* spp. se encuentra ausente de *B. tabaci* MED (Barbosa, 2014). En Costa Rica, la presencia de *Rickettsia* spp. en *B. tabaci* MED se encontró en más del 90 % de los individuos; este endosimbionte se caracteriza por encontrarse por lo general fuera del bacteriocito, sobre todo en la hemolinfa (Caspi-Fluger et al., 2011), lo que le permite interactuar con la mayoría de órganos a través de las cavidades corporales del insecto y con virus circulativos como el TYLCV (Kliot et al., 2014). También, se ha observado que la presencia de *Rickettsia* spp. en algunas poblaciones de *B. tabaci* MEAM1 incrementan el valor adaptativo de las moscas blancas de un mismo linaje genético tanto en condiciones de campo como de laboratorio (Himler et al., 2011). Por esta razón el estudio a mayor profundidad de este endosimbionte en las poblaciones de *B. tabaci* MED puede brindar más información sobre la ecología de esta especie en Costa Rica. También llama la atención que los individuos de *B. tabaci* NW presentes en la región Central mostraron la presencia de

*Rickettsia* spp., en contraste con los encontrados en la región Brunca (Coto Brus, Puntarenas) y Chorotega (Guanacaste). Este hecho podría ser reflejo de transmisión horizontal interespecífica (Chrostek, Pelz-Stelinski, Hurst & Hughes, 2017; Li et al., 2017a; Li et al., 2017b), ya que los individuos de la región Central se encontraron coexistiendo con una mayor abundancia de *B. tabaci* MED (Cuadro 2).

La asociación de *B. tabaci* MED con *Wolbachia* spp. también requiere atención, puesto que es un endosimbionte que se ha vinculado como un parásito reproductivo en ciertos insectos. El posterior estudio acerca de su localización dentro del insecto puede brindar información acerca de su función. Un ejemplo donde esto ocurre es en el caso de la chinche de cama *Cimex lectularius*, en donde la densidad bacteriana de *Wolbachia* spp. se restringe al bacteriocito y aunque la cepa que se estudió posee el tamaño del genoma equivalente al de cepas parasíticas de *Wolbachia* spp. en otros insectos, su función tendía a parecerse más a la de un endosimbionte primario debido a su ubicación dentro del insecto (Hosokawa, Koga, Kikuchi, Meng & Fukatsu, 2010).

Por último, es relevante mencionar que posible que los resultados obtenidos subestimen la frecuencia de los endosimbiontes debido a la técnica utilizada para su detección (PCR), ya que otras técnicas como el montaje de muestras con hibridación fluorescente *in situ* (FISH, por sus siglas en inglés) utilizando sondas con ácidos nucleicos bloqueados (LNA, por sus siglas en inglés) han mostrado ser más sensibles en la identificación de endosimbiontes bacterianos (Raina, Singh, Popli, Pandey & Rajagopal, 2015). Por ende, no se puede descartar la posibilidad de que tanto *Arsenophonus* spp. como *Rickettsia* spp. se encuentren fijados en la población de moscas blancas a la cual se asocian, a causa de falsos negativos. Además, autores como Marubayashi et al. (2014) complementan ambas técnicas (PCR y FISH) con el fin de obtener mayor información acerca de la localización y concentración de los endosimbiontes bacterianos, dada la importancia de esto para conocer la posible función que desempeña un endosimbionte bacteriano secundario en su hospedero. Por estas razones, se recomienda el uso de más de una técnica para su detección en análisis futuros.

## CONCLUSIONES

- En los cultivos de tomate del país se encontraron cuatro especies de mosca blanca y un solo haplotipo de cada una: *T. vaporariorum* (Tv-i), *B. tabaci* MED (MED-i), *B. tabaci* NW (NW-xv) y *B. tabaci* MEAM1 (MEAM1-i), citadas en orden de mayor a menor abundancia.
- La identificación de individuos de *B. tabaci* NW confirma que esta especie no ha sido desplazada por completo por las especies invasivas *B. tabaci* MED y *B. tabaci* MEAM1. Además, la secuenciación de la región parcial del gen mtCOI muestra que el haplotipo encontrado no coincide con ninguna otra secuencia reportada en América.
- Se observó asociación entre las especies de mosca blanca y los endosimbiontes bacterianos secundarios evaluados. *Arsenophonus* spp. se encuentra con mayor frecuencia en *T. vaporariorum* y los endosimbiontes *Wolbachia* spp. y *Rickettsia* spp. en *B. tabaci* MED; relación que se mantiene en los distintos sitios de muestreo. Se detectaron distintas combinaciones entre los endosimbiontes, no obstante, la endosimbiosis múltiple más frecuente es de *Wolbachia* spp. y *Rickettsia* spp. en *B. tabaci* MED.

## REFERENCIAS

- Alemandri, V., Vaghi Medina, C. G., Dumón, A. D., Argüello Caro, E. B., Mattio, M. F., Garcia Medina, S., ... & Truol, G. (2015). Three members of the *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae) cryptic species complex occur sympatrically in Argentine horticultural crops. *Journal of Economic Entomology*, *108*(2), 405-413.
- Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W. & Lipman, D. J. (1990). Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology*, *215*(3), 403-410.
- Barbosa, L. D. F. (2014). Diversidade de *Bemisia tabaci* na américa latina e detecção de seus endossimbiontes. (Tesis doctoral). Universida de Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”.
- Barbosa, L. D. F., Marubayashi, J. M., De Marchi, B. R., Yuki, V. A., Pavan, M. A., Moriones, E., ... & Krause-Sakate, R. (2014). Indigenous American species of the *Bemisia tabaci* complex are still widespread in the Americas. *Pest Management Science*, *70*(10), 1440-1445.
- Barbosa, L. D. F., Yuki, V. A., Marubayashi, J. M., De Marchi, B. R., Perini, F. L., Pavan, M. A., ... & Krause-Sakate, R. (2015). First report of *Bemisia tabaci* Mediterranean (Q biotype) species in Brazil. *Pest management science*, *71*(4), 501-504.
- Barboza, N. (2017). Diversidad genética de moscas blancas (Hemiptera:Aleyrodidae) y *Begomovirus* de sistemas de producción hortícola de tomate y chile dulce de Costa Rica y posibilidades de manejo mediante resistencia genética (Tesis doctoral). Universidad de Costa Rica.
- Barboza, N., Blanco-Meneses, M., Esker, P., Moriones, E. & Inoue-Nagata, A. K. (2017). Distribution and diversity of begomoviruses in tomato and sweet pepper plants in Costa Rica. *Annals of Applied Biology*, *172*(1), 20-32.
- Barboza, N., Blanco-Meneses, M., Hallwass, M., Moriones, E. & Inoue-Nagata, A. K. (2014). First report of *Tomato yellow leaf curl virus* in tomato in Costa Rica. *Plant Disease*, *98*(5), 699-699.

- Barrientos, O & López, L. (2010). Sector Agropecuario, Cadena Productiva de Tomate: Políticas y acciones. San José: MAG. Recuperado el 02/02/17 de [http://www.infoagro.go.cr/MarcoInstitucional/Documents/Politica\\_tomate%5B2%5D.pdf](http://www.infoagro.go.cr/MarcoInstitucional/Documents/Politica_tomate%5B2%5D.pdf)
- Baumann, P. (2005). Biology of bacteriocyte-associated endosymbionts of plant sap-sucking insects. *Annual Review of Microbiology*, 59, 155-189.
- Bethke, J. A., Byrne, F. J., Hodges, G. S., McKenzie, C. L. & Shatters Jr, R. G. (2009). First record of the Q biotype of the sweetpotato whitefly, *Bemisia tabaci*, in Guatemala. *Phytoparasitica*, 37(1), 61-64.
- Bing, X. L., Ruan, Y. M., Rao, Q., Wang, X. W. & Liu, S. S. (2012). Diversity of secondary endosymbionts among different putative species of the whitefly *Bemisia tabaci*. *Insect Science*, 20(2), 194-206.
- Bing, X. L., Yang, J., Zchori-Fein, E., Wang, X. W. & Liu, S. S. (2013). Characterization of a newly discovered symbiont of the whitefly *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae). *Applied and environmental microbiology*, 79(2), 569-575.
- Bonfield J.K., Smith K.F. & Staden R., (1995). A new DNA sequence assembly program. *Nucleic Acids Research*, 23, 4992-4999.
- Bosco, D., Loria, A., Sartor, C. & Cenis, J. L. (2006). PCR-RFLP identification of *Bemisia tabaci* biotypes in the mediterranean basin. *Phytoparasitica*, 34(3), 243.
- Boykin, L. M. (2014). *Bemisia tabaci* nomenclature: lessons learned. *Pest management science*, 70(10), 1454-1459.
- Boykin, L. M. & De Barro, P. J. (2014). A practical guide to identifying members of the *Bemisia tabaci* species complex: and other morphologically identical species. *Frontiers in Ecology and Evolution*, 2, 45.
- Boykin, L. M., Armstrong, K. F., Kubatko, L. & De Barro, P. (2012). Species delimitation and global biosecurity. *Evolutionary Bioinformatics*, 8, 1.
- Boykin, L.M., Savill A. & De Barro P., (2017). Updated mtCOI reference dataset for the *Bemisia tabaci* species complex. *F1000Research*, 6, 1835.

- Brelsfoard, C. L. & Dobson, S. L. (2009). *Wolbachia*-based strategies to control insect pests and disease vectors. *Asia Pacific Journal of Molecular Biology and Biotechnology*, 17(3), 55-63.
- Brown, J. K. (1994). Current status of *Bemisia tabaci* as a plant pest and virus vector in agroecosystems worldwide. *FAO Plant Protection Bulletin*, 42(1/2), 3-32.
- Brown, J. K. (2010). Phylogenetic biology of the *Bemisia tabaci* sibling species group. *Bemisia: Bionomics and Management of a Global Pest*, Dordrecht, Holanda:Springer.
- Brown, J. K. (2016). *Vector-mediated transmission of plant pathogens*, Minnesota, EEUU: American Phytopathological Society Press.
- Brown, J. K., Frohlich, D. R. & Rosell, R. C. (1995). The sweetpotato or silverleaf whiteflies: biotypes of *Bemisia tabaci* or a species complex?. *Annual review of entomology*, 40(1), 511-534.
- Cardona, C., Rendón, F., García, J., López, A., Bueno, J. M. & Ramírez, J. D. (2001). Resistencia a insecticidas en *Bemisia tabaci* y *Trialeurodes vaporariorum* (Homoptera: Aleyrodidae) en Colombia y Ecuador. *Revista Colombiana de Entomología*, 27, 33-38.
- Cardona, C., Rodriguez, I., Bueno, J. M. & Tapia, X. (2005). *Biología y manejo de la mosca blanca Trialeurodes vaporariorum en habichuela y frijol*, Cali, Colombia:CIAT.
- Caspi-Fluger, A., Inbar, M., Mozes-Daube, N., Mouton, L., Hunter, M. S. & Zchori-Fein, E. (2011). *Rickettsia* 'in' and 'out': two different localization patterns of a bacterial symbiont in the same insect species. *PLoS One*, 6(6), e21096.
- Cass, B. N., Mozes-Daube, N., Lasur-Kruh, L., Bondy, E. C., Kelly, S. E., Hunter, M. S. & Zchori-Fein, E. (2014). Bacterial endosymbionts in field-collected samples of *Trialeurodes* sp. nr. *abutiloneus* (Hemiptera: Aleyrodidae). *Research in Microbiology*, 165(2), 77-81.

- Castro, R. M., Hernández, E., Mora, F., Ramírez, P. & Hammond, R. W. (2009). First report of *Tomato chlorosis virus* in tomato in Costa Rica. *Plant Disease*, 93(9), 970-970.
- Chacón, C.A. (2008). Estudio de Mercado de tomate fresco y refrigerado de Costa Rica. (Programa de competitividad Pymes a través de la normalización técnica en Centroamérica, Panamá y República Dominicana). San José, Costa Rica: INTECO.
- Chiel, E., Gottlieb, Y., Zchori-Fein, E., Mozes-Daube, N., Katzir, N., Inbar, M. & Ghanim, M. (2007). Biotype-dependent secondary symbiont communities in sympatric populations of *Bemisia tabaci*. *Bulletin of Entomological Research*, 97(04), 407-413.
- Chrostek, E., Pelz-Stelinski, K., Hurst, G. D. & Hughes, G. L. (2017). Horizontal transmission of intracellular insect symbionts via plants. *Frontiers in microbiology*, 8.
- Chu, D., Gao, C. S., De Barro, P., Zhang, Y. J., Wan, F. H. & Khan, I. A. (2011). Further insights into the strange role of bacterial endosymbionts in whitefly, *Bemisia tabaci*: Comparison of secondary symbionts from biotypes B and Q in China. *Bulletin of entomological research*, 101(04), 477-486.
- Ciancio, A. (2016). *Invertebrate Bacteriology: Function, Evolution and Biological Ties*, Dordrecht, Holanda:Springer.
- Costa, H. S. & Brown, J. K. (1991). Variation in biological characteristics and esterase patterns among populations of *Bemisia tabaci*, and the association of one population with silverleaf symptom induction. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 61(3), 211-219.
- Czosnek, H., Hariton-Shalev, A., Sobol, I., Gorovits, R. & Ghanim, M. (2017). The Incredible journey of begomoviruses in their whitefly vector. *Viruses*, 9(10), 273.
- De Barro, P. J., Liu, S. S., Boykin, L. M. & Dinsdale, A. B. (2011). *Bemisia tabaci*: a statement of species status. *Annual Review of Entomology*, 56, 1-19.
- De Barro, P. J., Trueman, J. W. H. & Frohlich, D. R. (2005). *Bemisia argentifolii* is a race of *B. tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae): the molecular genetic differentiation of *B.*

- tabaci* populations around the world. *Bulletin of Entomological Research*, 95(03), 193-203.
- de Moraes, L. A., Marubayashi, J. M., Yuki, V. A., Ghanim, M., Bello, V. H., De Marchi, B. R., ... & Pavan, M. A. (2017). New invasion of *Bemisia tabaci* Mediterranean species in Brazil associated to ornamental plants. *Phytoparasitica*, 45(4), 517-525.
- Dennehy, T. J., DeGain, B. A., Harpold, V. S., Brown, J. K., Morin, S., Fabrick, J. A., ... & Nichols, R. L. (2005). New challenges to management of whitefly resistance to insecticides in Arizona. *Vegetable report*.
- Dinsdale, A., Cook, L., Riginos, C., Buckley, Y. M. & De Barro, P. (2010). Refined global analysis of *Bemisia tabaci* (Gennadius)(Hemiptera: Sternorrhyncha: Aleyroidea) mitochondrial CO1 to identify species level genetic boundaries. *Annals of the Entomological Society of America*, 103(2), 196-208.
- Engelstädter, J. & Hurst, G. D. (2009). The ecology and evolution of microbes that manipulate host reproduction. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, 40, 127-149.
- Faria, J. C., Gilbertson, R. L., Hanson, S. F., Morales, F. J., Ahlquist, P., Loniello, A. O. & Maxwell, D. P. (1994). Bean golden mosaic geminivirus type II isolates from the Dominican Republic and Guatemala: nucleotide sequences, infectious pseudorecombinants, and phylogenetic relationships. *Phytopathology*, 84, 321-329
- Firdaus, S., Vosman, B., Hidayati, N., Supena, J., Darmo, E., GF Visser, R. & van Heusden, A. W. (2013). The *Bemisia tabaci* species complex: additions from different parts of the world. *Insect Science*, 20(6), 723-733.
- Frohlich, D. R., Torres-Jerez, I., Bedford, I. D., Markham, P. G. & Brown, J. K. (1999). A phylogeographical analysis of the *Bemisia tabaci* species complex based on mitochondrial DNA markers. *Molecular Ecology*, 8(10), 1683-1691.
- Fry, A. J., Palmer, M. R. & Rand, D. M. (2004). Variable fitness effects of *Wolbachia* infection in *Drosophila melanogaster*. *Heredity*, 93(4), 379.

- Ghanim, M. & Kontsedalov, S. (2009). Susceptibility to insecticides in the Q biotype of *Bemisia tabaci* is correlated with bacterial symbiont densities. *Pest Management Science*, 65(9), 939-942.
- Gilbertson, R. L., Faria, J., Ahlquist, P. & Maxwell, D. (1993). Genetic diversity in geminiviruses causing bean golden mosaic disease: the nucleotide sequence of the infectious cloned DNA components of a brazilian isolate of bean golden mosaic geminivirus. *Phytopathology*, 83, 709-715.
- Gilbertson, R. L., Rojas, M. & Natwick, E. (2011). Development of integrated pest management (IPM) strategies for whitefly (*Bemisia tabaci*)-transmissible geminiviruses. In Winston MO. Ed. *The whitefly, Bemisia tabaci (Homoptera: Aleyrodidae) interaction with geminivirus-infected host plants* (pp. 323-356), Dordrecht, Holanda:Springer.
- Gill, R. J. & Brown, J. K. (2009). Systematics of *Bemisia* and *Bemisia* relatives: can molecular techniques solve the *Bemisia tabaci* complex conundrum—a taxonomist's viewpoint. In *Bemisia: bionomics and management of a global pest* (pp. 5-29), Dordrecht, Holanda:Springer.
- Gottlieb, Y., Ghanim, M., Chiel, E., Gerling, D., Portnoy, V., Steinberg, S., ... & Kontsedalov, S. (2006). Identification and localization of a *Rickettsia* sp. in *Bemisia tabaci* (Homoptera: Aleyrodidae). *Applied and Environmental Microbiology*, 72(5), 3646-3652.
- Gottlieb, Y., Ghanim, M., Gueguen, G., Kontsedalov, S., Vavre, F., Fleury, F. & Zchori-Fein, E. (2008). Inherited intracellular ecosystem: symbiotic bacteria share bacteriocytes in whiteflies. *The FASEB Journal*, 22(7), 2591-2599.
- Gottlieb, Y., Zchori-Fein, E., Mozes-Daube, N., Kontsedalov, S., Skaljic, M., Brumin, M. & Ghanim, M. (2010). The transmission efficiency of *Tomato yellow leaf curl virus* by the whitefly *Bemisia tabaci* is correlated with the presence of a specific symbiotic bacterium species. *Journal of Virology*, 84(18), 9310-9317.
- Grille, G., Gauthier, N., Buenahora, J., Basso, C. & Bonato, O. (2011). First report of the Q biotype of *Bemisia tabaci* in Argentina and Uruguay. *Phytoparasitica*, 39(3), 235.

- Guay, J. F., Boudreault, S., Michaud, D. & Cloutier, C. (2009). Impact of environmental stress on aphid clonal resistance to parasitoids: role of *Hamiltonella defensa* bacterial symbiosis in association with a new facultative symbiont of the pea aphid. *Journal of Insect Physiology*, 55(10), 919-926.
- Gueguen, G., Vavre, F., Gnankine, O., Peterschmitt, M., Charif, D., Chiel, E. & Fleury, F. (2010). Endosymbiont metacommunities, mtDNA diversity and the evolution of the *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae) species complex. *Molecular Ecology*, 19(19), 4365-4376.
- Guevara-Coto, J. A., Barboza-Vargas, N., Hernández-Jiménez, E., Hammond, R. W. & Ramirez-Fonseca, P. (2011). *Bemisia tabaci* Biotype Q is present in Costa Rica. *European Journal of Plant Pathology*, 131(2), 167.
- Hammond, R. W., Hernández, E., Mora, F., & Ramírez, P. (2005). First report of *Beet pseudo-yellows virus* on *Cucurbita moschata* and *C. pepo* in Costa Rica. *Plant disease*, 89(10), 1130-1130.
- Hanssen, I. M., Lapidot, M. & Thomma, B. P. (2010). Emerging viral diseases of tomato crops. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 23(5), 539-548.
- Heddi, A., Grenier, A. M., Khatchadourian, C., Charles, H. & Nardon, P. (1999). Four intracellular genomes direct weevil biology: nuclear, mitochondrial, principal endosymbiont, and *Wolbachia*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 96(12), 6814-6819.
- Hilje, L. (1996). *Metodologías para el estudio y manejo de moscas blancas y geminivirus*, Turrialba, Costa Rica: CATIE.
- Hilje, L. & Morales, F. J. (2008). Whitefly bioecology and management in Latin America. En *Encyclopedia of entomology*, Gainesville, EEUU: Springer Netherlands.
- Himler, A. G., Adachi-Hagimori, T., Bergen, J. E., Kozuch, A., Kelly, S. E., Tabashnik, B. E., ... & Hunter, M. S. (2011). Rapid spread of a bacterial symbiont in an invasive whitefly is driven by fitness benefits and female bias. *Science*, 332(6026), 254-256.

- Hoffmann, A. A., Montgomery, B. L., Popovici, J., Iturbe-Ormaetxe, I., Johnson, P. H., Muzzi, F., ... & Cook, H. (2011). Successful establishment of *Wolbachia* in *Aedes* populations to suppress dengue transmission. *Nature*, 476(7361), 454.
- Horowitz, A. R. & Ishaaya, I. (2014). Dynamics of biotypes B and Q of the whitefly *Bemisia tabaci* and its impact on insecticide resistance. *Pest Management Science*, 70(10), 1568-1572.
- Horowitz, A. R., Kontsedalov, S., Khasdan, V. & Ishaaya, I. (2005). Biotypes B and Q of *Bemisia tabaci* and their relevance to neonicotinoid and pyriproxyfen resistance. *Archives of insect biochemistry and physiology*, 58(4), 216-225.
- Hosokawa, T., Koga, R., Kikuchi, Y., Meng, X. Y. & Fukatsu, T. (2010). *Wolbachia* as a bacteriocyte-associated nutritional mutualist. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(2), 769-774.
- Huelsenbeck J.P., Ronquist F., Nielsen R. & Bollback J. (2001) Bayesian inference of phylogeny and its impact on evolutionary biology. *Science*, 294, 2310–2314.
- Hunter, M. S., Asiimwe, P., Himler, A. G. & Kelly, S. E. (2017). Host nuclear genotype influences phenotype of a conditional mutualist symbiont. *Journal of Evolutionary Biology*, 30(1), 141-149.
- Inoue-Nagata, A. K., Lima, M. F. & Gilbertson, R. L. (2016). A review of geminivirus diseases in vegetables and other crops in Brazil: current status and approaches for management. *Horticultura Brasileira*, 34(1), 8-18.
- Jones, D. R. (2003). Plant viruses transmitted by whiteflies. *European Journal of Plant Pathology*, 109(3), 195-219.
- Kapantaidaki, D. E., Ovčarenko, I., Fytrou, N., Knott, K. E., Bourtzis, K. & Tsagkarakou, A. (2014). Low levels of mitochondrial DNA and symbiont diversity in the worldwide agricultural pest, the greenhouse whitefly *Trialetrodes vaporariorum* (Hemiptera: Aleyrodidae). *Journal of Heredity*, 106(1), 80-92.
- Kliot, A., Cilia, M., Czosnek, H. & Ghanim, M. (2014). Implication of the bacterial endosymbiont *Rickettsia* spp. in interactions of the whitefly *Bemisia tabaci* with *Tomato yellow leaf curl virus*. *Journal of Virology*, 88(10), 5652-5660.

- Kontsedalov, S., Zchori-Fein, E., Chiel, E., Gottlieb, Y., Inbar, M. & Ghanim, M. (2008). The presence of *Rickettsia* is associated with increased susceptibility of *Bemisia tabaci* (Homoptera: Aleyrodidae) to insecticides. *Pest management science*, 64(8), 789-792
- Kumar, S., Stecher, G. & Tamura, K. (2016). MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets. *Molecular biology and evolution*, msw054.
- Lapidot, M., & Polston, J. E. (2010). Biology and epidemiology of *Bemisia*-vectored viruses. *Bemisia: bionomics and management of a global pest*, Amsterdam, Holanda: Springer.
- Lee, W., Park, J., Lee, G. S., Lee, S. & Akimoto, S. I. (2013). Taxonomic status of the *Bemisia tabaci* complex (Hemiptera: Aleyrodidae) and reassessment of the number of its constituent species. *PLoS One*, 8(5), e63817.
- Legg, J. P., French, R., Rogan, D., Okao-Okuja, G. & Brown, J. K. (2002). A distinct *Bemisia tabaci* (Gennadius)(Hemiptera: Sternorrhyncha: Aleyrodidae) genotype cluster is associated with the epidemic of severe cassava mosaic virus disease in Uganda. *Molecular Ecology*, 11(7), 1219-1229.
- Li, Q., Jia, W., XiaoLi, B. & ShuSheng, L. (2013). Identification of nine cryptic species of *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae) from China by using the mtCOI PCR-RFLP technique. *Acta Entomologica Sinica*, 56(2), 186-194.
- Li, S. J., Ahmed, M. Z., Lv, N., Shi, P. Q., Wang, X. M., Huang, J. L. & Qiu, B. L. (2017b). Plant-mediated horizontal transmission of *Wolbachia* between whiteflies. *The ISME journal*, 11(4), 1019.
- Li, Y. H., Ahmed, M. Z., Li, S. J., Lv, N., Shi, P. Q., Chen, X. S. & Qiu, B. L. (2017a). Plant-mediated horizontal transmission of *Rickettsia* endosymbiont between different whitefly species. *FEMS microbiology ecology*, 93(12), fix138.
- Liu, S. S., De Barro, P. J., Xu, J., Luan, J. B., Zang, L. S., Ruan, Y. M. & Wan, F. H. (2007). Asymmetric mating interactions drive widespread invasion and displacement in a whitefly. *Science*, 318(5857), 1769-1772.

- Liu, T. X., Stansly, P. A. & Gerling, D. (2015). Whitefly parasitoids: distribution, life history, bionomics, and utilization. *Annual review of entomology*, 60, 273-292.
- López, L.M. (2012). Actualidad de la agrocadena del cultivo de tomate (*Solanum lycopersicum*). (Segundo Congreso Nacional del Cultivo de Tomate). San José:Costa Rica. Recuperado el 02/02/17 de <http://www.mag.go.cr/bibliotecavirtual/a00310.pdf>
- Łukasik, P., van Asch, M., Guo, H., Ferrari, J. & Godfray, C. J. (2013). Unrelated facultative endosymbionts protect aphids against a fungal pathogen. *Ecology letters*, 16(2), 214-218.
- Ma, W. H., Li, X. C., Dennehy, T. J., Lei, C. L., Wang, M., Degain, B. A. & Nichols, R. L. (2009). Utility of MtCOI polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism in differentiating between Q and B whitefly *Bemisia tabaci* biotypes. *Insect Science*, 16(2), 107-114.
- Mariño, Y. A., Verle Rodrigues, J. C. & Bayman, P. (2017). *Wolbachia* affects reproduction and population dynamics of the coffee berry borer (*Hypothenemus hampei*): implications for biological control. *Insects*, 8(1), 8.
- Martinez-Carrillo, J. L. & Brown, J. K. (2007). Note: First report of the Q biotype of *Bemisia tabaci* in southern Sonora, Mexico. *Phytoparasitica*, 35(3), 282.
- Marubayashi, J. M., Kliot, A., Yuki, V. A., Rezende, J. A. M., Krause-Sakate, R., Pavan, M. A. & Ghanim, M. (2014). Diversity and localization of bacterial endosymbionts from whitefly species collected in Brazil. *PloS one*, 9(9), e108363.
- Marubayashi, J. M., Yuki, V. A., Rocha, K. C. G., Mituti, T., Pelegrinotti, F. M., Ferreira, F. Z., ... & Krause-Sakate, R. (2013). At least two indigenous species of the *Bemisia tabaci* complex are present in Brazil. *Journal of Applied Entomology*, 137(1-2), 113-121.
- McKenzie, C. L. & Osborne, L. S. (2017). *Bemisia tabaci* MED (Q biotype)(Hemiptera: Aleyrodidae) in Florida is on the move to residential landscapes and may impact open-field agriculture. *Florida Entomologist*, 100(2), 481-484.

- McKenzie, C. L., Bethke, J. A., Byrne, F. J., Chamberlin, J. R., Dennehy, T. J., Dickey, A. M., ... & Osborne, L. S. (2012). Distribution of *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae) biotypes in north America after the Q invasion. *Journal of Economic Entomology*, *105*(3), 753-766.
- Morales F.J., Hilje L., Vallejos J., Sibaja G., Araya C. & Araya R., (2005). *Whitefly and whitefly-borne viruses in the tropics: Building a knowledge base for global action* (pp. 217-221). Cali, Colombia:CIAT.
- Morales, F. J. (2006a). History and current distribution of begomoviruses in latin America. *Advances in virus research*, *67*, 127-162.
- Morales, F. J. (2006b). Tropical whitefly IPM project. *Advances in virus research*, *69*, 249-311.
- Morales, F. J. & Jones, P. G. (2004). The ecology and epidemiology of whitefly-transmitted viruses in latin America. *Virus Research*, *100*(1), 57-65.
- Moran, N. A. & Baumann, P. (2000). Bacterial endosymbionts in animals. *Current Opinion in Microbiology*, *3*(3), 270-275.
- Mound, L.A. & Halsey, S.H., (1978). *Whitefly of the World: a Systematic Catalogue of the Aleyrodidae (Homoptera) with Host Plant and Natural Enemy Data*, New York,EEUU: Wiley.
- Mugerwa, H., Seal, S., Wang, H. L., Patel, M. V., Kabaalu, R., Omongo, C. A., ... & Colvin, J. (2018). African ancestry of New World, *Bemisia tabaci*-whitefly species. *Scientific reports*, *8*(1), 2734.
- Nakhla, M. K., Sorensen, A., Mejía, L., Ramírez, P., Karkashian, J. P. & Maxwell, D. P. (2005). Molecular characterization of tomato-infecting begomoviruses in Central America and development of DNA-based detection methods. *Acta Horticulturae*, *695*, 277-288.
- Navas-Castillo, J., Fiallo-Olivé, E. & Sánchez-Campos, S. (2011). Emerging virus diseases transmitted by whiteflies. *Annual Review of Phytopathology*, *49*(1), 219-248.

- Navas-Castillo, J., López-Moya, J. J. & Aranda, M. A. (2014). Whitefly-transmitted RNA viruses that affect intensive vegetable production. *Annals of Applied Biology*, 165(2), 155-171.
- Nikolouli, K., Colinet, H., Renault, D., Enriquez, T., Mouton, L., Gibert, P., ... & Bourtzis, K. (2017). Sterile insect technique and *Wolbachia* symbiosis as potential tools for the control of the invasive species *Drosophila suzukii*. *Journal of Pest Science*, 1-15.
- Njoroge, M. K., Kilalo, D. C., Miano, D. W. & Mutisya, D. L. (2016). Whiteflies species distribution and abundance on cassava crop in different agro-ecological zones of Kenya. *Journal of Entomology and Zoology Studies*, 4(3), 258-62.
- Pan, H., Li, X., Ge, D., Wang, S., Wu, Q., Xie, W., ... & Zhang, Y. (2012). Factors affecting population dynamics of maternally transmitted endosymbionts in *Bemisia tabaci*. *PloS one*, 7(2), e30760.
- Park, J., Jahan, S. H., Song, W. G., Lee, H., Lee, Y. S., Choi, H. S. & Lee, K. Y. (2012). Identification of biotypes and secondary endosymbionts of *Bemisia tabaci* in Korea and relationships with the occurrence of TYLCV disease. *Journal of Asia-Pacific Entomology*, 15(1), 186-191.
- Perring, T. M., Cooper, A. D., Rodriguez, R. J., Farrar, C. A. & Bellows, T. S. (1993). Identification of a whitefly species by genomic and behavioral studies. *Science*, 259(5091), 74-77.
- PIMA (Programa Integral de Mercadeo Agropecuario), 2016. Análisis del consumo de frutas, hortalizas, pescado y mariscos en los hogares costarricenses. Recuperado el 03/06/2018 de <http://www.pima.go.cr/wp-content/uploads/2017/07/Analisis-Consumo.pdf>.
- Polston, J. E. & Anderson, P. K. (1997). The emergence of whitefly-transmitted geminiviruses in tomato in the western hemisphere. *Plant disease*, 81(12), 1358-1369.
- Pospieszny, H., Borodynko, N., Obrepalska-Stepłowska, A. & Hasiów, B. (2007). The first report of *Tomato torrado virus* in Poland. *Plant Disease*, 91(10), 1364-1364.

- Raina, H. S., Singh, A., Popli, S., Pandey, N. & Rajagopal, R. (2015). Infection of bacterial endosymbionts in insects: a comparative study of two techniques viz PCR and FISH for detection and localization of symbionts in whitefly, *Bemisia tabaci*. *PloS one*, *10*(8), e0136159.
- Rao, Q., Rollat-Farnier, P. A., Zhu, D. T., Santos-Garcia, D., Silva, F. J., Moya, A., ... & Liu, S. S. (2015). Genome reduction and potential metabolic complementation of the dual endosymbionts in the whitefly *Bemisia tabaci*. *BMC genomics*, *16*(1), 226.
- Rodríguez, I. V., Bueno, J. M., Cardona, C. M. & Morales, H. M. (2012). Biotipo B de *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae): plaga de pimentón en el Valle del Cauca, Colombia. *Revista Colombiana de Entomología*, *38*(1), 14.
- Romay, G., Geraud-Pouey, F., Chirinos, D. & Demey, J. (2016). *Bemisia tabaci* (Gennadius)(Hemiptera: Aleyrodidae): historia, situación actual y su rol como vector de enfermedades virales de plantas en Venezuela. *Entomotropica*, *31*, 276-293.
- Romay, G., Geraud-Pouey, F., Chirinos, D. T., Santana, M. A., Galindo-Castro, I. & Márquez, L. M. (2011). Microsatellites reveal widespread predominance of an invasive over an indigenous *Bemisia tabaci* in Venezuela. *Phytoparasitica*, *39*(5), 419.
- Ronquist, F. & Huelsenbeck, J. P. (2003). MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics*, *19*(12), 1572-1574.
- Russel, L. M. (1963). Hosts and distribution of live species of *Trialeurodes*. *Annals of the Entomological Society of America*, *56*, 149-153.
- Scarborough, C. L., Ferrari, J. & Godfray, H. C. J. (2005). Aphid protected from pathogen by endosymbiont. *Science*, *310*(5755), 1781-1781.
- Scotta, R. R. (2013). Mosca blanca de los invernaderos (*Trialeurodes vaporariorum*)(Westwood)(Hemiptera: Aleyrodidae): daño, factores que afectan la población y su manejo en el cultivo de tomate. (Tesis Doctoral). Universidad Nacional del Litoral.

- Simon, C., Frati, F., Beckenbach, A., Crespi, B., Liu, H. & Flook, P. (1994). Evolution, weighting, and phylogenetic utility of mitochondrial gene sequences and a compilation of conserved polymerase chain reaction primers. *Annals of the entomological Society of America*, 87(6), 651-701
- Skaljac, M., Zanic, K., Ban, S. G., Kontsedalov, S. & Ghanim, M. (2010). Co-infection and localization of secondary symbionts in two whitefly species. *BMC Microbiology*, 10(1), 142.
- Sloan, D. B. & Moran, N. A. (2012). Endosymbiotic bacteria as a source of carotenoids in whiteflies. *Biology Letters*, 8(6), 986-989.
- Solórzano-Morales, A., Barboza, N., Hernández, E., Mora-Umaña, F., Ramírez, P. & Hammond, R. W. (2011). Newly discovered natural hosts of *Tomato chlorosis virus* in Costa Rica. *Plant Disease*, 95(4), 497.
- Sun, D. B., Liu, Y. Q., Qin, L., Xu, J., Li, F. F. & Liu, S. S. (2013). Competitive displacement between two invasive whiteflies: insecticide application and host plant effects. *Bulletin of entomological research*, 103(3), 344-353.
- Tajebe, L. S., Guastella, D., Cavalieri, V., Kelly, S. E., Hunter, M. S., Lund, O. S. & Rapisarda, C. (2015). Diversity of symbiotic bacteria associated with *Bemisia tabaci* (Homoptera: Aleyrodidae) in Cassava mosaic disease pandemic areas of Tanzania. *Annals of Applied Biology*, 166(2), 297-310.
- Thao, M. L. & Baumann, P. (2004). Evidence for multiple acquisition of *Arsenophonus* by whitefly species (Sternorrhyncha: Aleyrodidae). *Current microbiology*, 48(2), 140-144.
- Tsagkarakou, A., Tsigenopoulos, C. S., Gorman, K., Lagnel, J. & Bedford, I. D. (2007). Biotype status and genetic polymorphism of the whitefly *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae) in Greece: mitochondrial DNA and microsatellites. *Bulletin of Entomological Research*, 97(1), 29-40.
- Thierry, M., Becker, N., Hajri, A., Reynaud, B., Lett, J. M. & Delatte, H. (2011). Symbiont diversity and non-random hybridization among indigenous (Ms) and invasive (B) biotypes of *Bemisia tabaci*. *Molecular Ecology*, 20(10), 2172-2187.

- Valverde, R. & Moreira, M. (2004). Identificación de virus en el cultivo de camote (*Ipomea batatas* L.) en Costa Rica. *Agronomía Mesoamericana*, 15, 1-7.
- Vargas, J. A., Hernández, E., Barboza, N., Mora, F. & Ramírez, P. (2011). First report of *Tomato chlorosis virus* infecting sweet pepper in Costa Rica. *Plant Disease*, 95(11), 1482.
- Vargas-Asencio, J. A., Hernández, E., Barboza, N., Hammond, R., Mora, F. & Ramírez, P. (2013). Detection of tomato chlorosis virus and its vector *Trialeurodes vaporariorum* in greenhouse-grown tomato and sweet pepper in the Cartago province, Costa Rica. *Journal of Plant Pathology*, 3, 627-630.
- Varma, A. & Malathi, V. G. (2003). Emerging geminivirus problems: a serious threat to crop production. *Annals of Applied Biology*, 142(2), 145-164.
- Wainaina, J. M., De Barro, P., Kubatko, L., Kehoe, M. A., Harvey, J., Karanja, D. & Boykin, L. M. (2017). Global phylogenetic relationships, population structure and gene flow estimation of *Trialeurodes vaporariorum* (Greenhouse whitefly). *Bulletin of Entomological Research*, 1-9.
- Walsh, P. S., Metzger, D. A. & Higuchi, R. (1991). Chelex 100 as a medium for simple extraction of DNA for PCR-based typing from forensic material. *Biotechniques*, 10(4), 506-513.
- Weinert, L. A., Araujo-Jnr, E. V., Ahmed, M. Z. & Welch, J. J. (2015). The incidence of bacterial endosymbionts in terrestrial arthropods. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, 282(1807), 20150249.
- Werren, J. H., Baldo, L. & Clark, M. E. (2008). *Wolbachia*: master manipulators of invertebrate biology. *Nature Reviews Microbiology*, 6(10), 741-751.
- Wintermantel, W. M. & Wisler, G. C. (2006). Vector specificity, host range, and genetic diversity of *Tomato chlorosis virus*. *Plant Disease*, 90(6), 814-819.
- Xu, J., De Barro, P. J. & Liu, S. S. (2010). Reproductive incompatibility among genetic groups of *Bemisia tabaci* supports the proposition that the whitefly is a cryptic species complex. *Bulletin of entomological research*, 100(3), 359-366.

- Zchori-Fein, E. & Brown, J. K. (2002). Diversity of prokaryotes associated with *Bemisia tabaci* (Gennadius)(Hemiptera: Aleyrodidae). *Annals of the Entomological Society of America*, 95(6), 711-718.
- Zerbini, F., Briddon, R.W., Idris, A., Martin, D. P., Moriones, E., Navas-Castillo, J.,... Varsani, A. (2017). ICTV Virus taxonomy profile: Geminiviridae. *Journal of General Virology*, 98(2), 131-133.
- Zhou, X., Liu, Y., Robinson, D. J. & Harrison, B. D. (1998). Four DNA-A variants among Pakistani isolates of cotton leaf curl virus and their affinities to DNA-A of geminivirus isolates from okra. *Journal of General Virology*, 79(4), 915-923.

## ANEXOS

Cuadro S1 Secuencias obtenidas de GenBank de la región mtCOI de *B. tabaci* NW correspondientes a América que fueron consideradas para este estudio y su respectivo haplotipo. El haplotipo nombrado como NW-xv pertenece a la secuencia identificada en este estudio.

Especie-haplotipo (número de secuencias)	No. de accesión de GenBank	País	Referencia
NW-i (1)	AF342770	Honduras	Brown & Idris 2005
NW-i (1)	AY057129	Guatemala	Brown (sin publicar)
NW-i (2)	AY057131, AY057132	Guatemala	Brown, 2001
NW-ii (1)	AF342771	Guatemala	Brown, 2001
NW-iii (1)	AY057126	México	Brown (sin publicar)
NW-iv (1)	AY057128	El Salvador	Brown (sin publicar)
NW-v (1)	AY057130	Guatemala	Brown, 2001
NW-vi (1)	AY057133	Honduras	Brown (sin publicar)
NW-vii (1)	AY057134	Puerto Rico	Brown (sin publicar)
NW-viii (1)	AY521259	Estados Unidos	Thao et al. 2004
NW-viii (2)	DQ133371, DQ133376	Estados Unidos	Brown, 2005
NW-viii (1)	DQ174542	Estados Unidos	Hsieh et al. 2006
NW-ix (1)	DQ130053	Belice	Brown & Idris 2005
NW-ix (1)	FN821786	Guadalupe	Muñiz et al.
NW-x (1)	DQ130058	México	Brown & Idris 2005
NW-xi (1)	DQ130059	México	Brown & Idris 2005
NW-xii (1)	DQ130060	Panamá	Brown & Idris 2005
NW-xiii (1)	DQ130061	Panamá	Brown & Idris 2005
NW-xiv (1)	EU427729	México	Shatters et al. 2009
<b>NW-xv (7)</b>	<b>MH510178</b>	<b>Costa Rica</b>	<b>Este estudio</b>

Cuadro S2 Perfiles térmicos para la amplificación del gen 23S ADNr de *Arsenophonus* spp. y 16S ADNr de *Wolbachia* spp., *Hamiltonella* spp. y *Rickettsia* spp.

Nombre	Iniciador		Perfil térmico*			Ciclos
	Secuencia (5'→3')					
Ars 23S-1	CGTTTGATGAATTCATAGTCAAA	94°C	55°C	70°C	30	
Ars 23S-2	GGTCCTCCAGTTAGTGTTACCCAAC	(30 s)	(2 min)	(5 min)		
Wol 16S-F	CGGGGGAAAAATTTATTGCT	94°C	50°C	72°C	30	
Wol 16S-R	AGCTGTAATACAGAAAGTAAA	(30 s)	(30 s)	(45 s)		
Hb-F	TGAGTAAAGTCTGGAATCTGG	94°C	58°C	74°C	30	
Hb-R	AGTTCAAGACCGCAACCTC	(1 min)	(1 min)	(1 min)		
Rb-F	GCTCAGAACGAACGCTATC	92 °C	58	72°C	30	
Rb-R	GAAGGAAAGCATCTCTGC	(30 s)	(30 s)	(30 s)		

\* Thao & Baumann, 2004; Heddi et al., 1999; Zchori-Fein & Brown, 2002; Gottlieb, 2006.