

DETECCIÓN DE PATÓGENOS POTENCIALES EN LARVAS DE *SPODOPTERA FRUGIPERDA* MANTENIDAS BAJO CONDICIONES DE LABORATORIO

DETECTION OF POTENTIAL PATHOGENS IN *SPODOPTERA FRUGIPERDA* LARVAE MAINTAINED UNDER LABORATORY CONDITIONS

Francisco Javier Flores Gallardo¹
José Luis Hernández Flores²
Miguel Ángel Ramos López¹
José Alberto Rodríguez Morales¹
Erika Álvarez Hidalgo¹
Jorge Núñez Ramírez¹
Juan Campos Guillén^{1*}

¹Universidad Autónoma de Querétaro

²Instituto Politécnico Nacional

*juan.campos@uaq.mx



Abstract

Spodoptera frugiperda is one of the main pests in agriculture worldwide. Its microbiome plays a vital role for the larvae, since the interaction of microorganisms gives rise to functions related to the homeostasis of the host organism: immune defense and nutrient assimilation, among others. However, diet, pesticides, antibiotic supply, climatic conditions, sex and age of the larvae are variables that interfere in the composition of the larval microbiota, causing dysbiosis. This metagenomic analysis of healthy and dead larvae with symptoms of infection found the main bacterial genera and virus species present in the samples; as for the predominant bacterial genera, *Enterococcus* spp. were recorded, with relative abundance of 78.4% and 100% in healthy larvae, and 89.5% to 100% in dead larvae. The presence of *Pseudomonas* sp. was also detected, with a relative abundance of 21.6% in

Resumen

Spodoptera frugiperda es considerada una de las principales plagas en la agricultura a nivel mundial. Su microbioma desempeña un papel vital para las larvas, ya que la interacción de los microorganismos da lugar a funciones relacionadas con la homeostasis del organismo hospedero: la defensa inmunitaria y la asimilación de nutrientes, entre otras. Sin embargo, la dieta, los plaguicidas, los antibióticos, las condiciones climáticas, el sexo y la edad de las larvas son variables que interfieren en la composición de la microbiota larval, provocando disbiosis. El presente análisis metagenómico de larvas sanas y muertas con síntomas de infección identificó los principales géneros bacterianos y especies de virus; en cuanto a los géneros de bacterias predominantes, se registraron *Enterococcus* spp., con abundancia relativa del 78.4 % y 100 % en larvas sanas, y de 89.5 % a 100 % en larvas muertas. También se detectó la presencia de *Pseudomonas* sp., con una abundancia relativa del 21.6 % en larvas sanas y 1 % en larvas muertas. En menor medida se encontró *Acetobacter* sp., con una abundancia relativa en larvas muertas del 9.3 %. Por otro lado, las lecturas correspondientes a virus fueron de 0.004 % en larvas sanas y 1.48 % en muertas; las secuencias de mayor abundancia relativa se relacionaron con familias de baculovirus y nudivirus.

Palabras clave: biosistemas, diagnóstico molecular, gusano cogolero del maíz, maíz, microbioma.



healthy larvae and 1% in dead larvae. To a lesser extent, *Acetobacter* sp. was found, with a relative abundance in dead larvae of 9.3%. On the other hand, the readings corresponding to viruses were 0.004% in healthy larvae and 1.48% in dead larvae; the sequences with the highest relative abundance were related to baculovirus and nudivirus families.

Keywords: biosystems, molecular diagnostics, corn budworm, corn, microbiome.

Introducción

Spodoptera frugiperda (Lepidoptera: Noctuidae) es una de las plagas más perjudiciales a nivel mundial, cuya amplia dispersión y actividad polífaga presentan una amenaza a la seguridad alimentaria y causando pérdidas económicas considerables [1]. En consecuencia, resulta indispensable establecer un pie de cría para evaluar los requerimientos nutricionales, los cambios en el microbioma asociado y la resistencia a insecticidas utilizando parámetros controlados de dieta, humedad, temperatura y fotoperiodos [2]. El procedimiento comienza con la colecta de larvas de *S. frugiperda* de algunos cultivos para que, tras varios ciclos de vida, se pueda disponer de larvas para utilizarlas en los bioensayos [3-5]. No obstante, existe una gran variedad de microorganismos patógenos que pueden afectar la supervivencia de las larvas, formar parte de su microbiota y perdurar a lo largo de varias generaciones. Actualmente, los más relevantes son los virus de la familia *baculoviridae* y algunas bacterias del género *Bacillus*, entre las que destaca *Bacillus thuringiensis* debido a su eficiencia como método de control biológico [6], [7]. En 2021, los análisis de diversidad bacteriana efectuados por Higuera Palacio y colaboradores encontraron *Bacillus pumilus* y *B. subtilis*, así como varias especies de *Enterococcus* y *Klebsiella* dentro del intestino de larvas de *S. frugiperda* [8]. En un estudio similar, Ugwu y colegas encontraron en 2020 que los filos de bacterias predominantes fueron *Proteobacteria*, *Firmicutes* y *Bacteroidetes* con





58.32 %, 35.87 % y 4.02 % de abundancia relativa respectivamente [9]. La interacción de estas comunidades microbianas con el sistema endocrino larval interviene en el desarrollo de las larvas y se asocia a numerosas funciones fisiológicas; entre ellas se listan el procesamiento de nutrientes, la defensa contra agentes externos, la degradación de patógenos y la desaceleración de enfermedades causadas por los mismos [10-12].

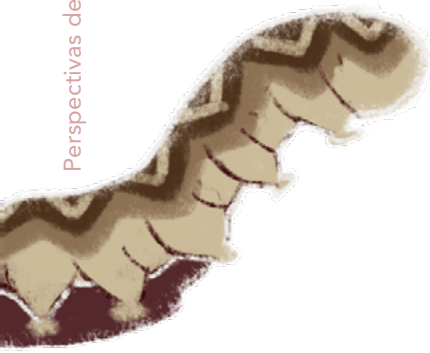
Spodoptera frugiperda (Lepidoptera: Noctuidae) es una de las plagas más perjudiciales a nivel mundial, cuya dispersión y actividad polífaga amenazan a la seguridad alimentaria y económica. En el presente análisis metagenómico de larvas sanas y muertas con síntomas de infección, se expondrán los principales géneros bacterianos y especies de virus.

La microbiota de las larvas de *S. frugiperda* depende en gran medida de la edad y el sexo de los especímenes; a pesar de ello, cambios en los regímenes alimenticios y estilo de vida, la introducción de plaguicidas y el suministro de antibióticos pueden provocar una disbiosis al alterar su composición y funciones [13-15]. Una de las alternativas para comprender la variación composicional del microbioma y su impacto en los organismos es la metagenómica [16]. La disciplina implementa métodos analíticos para determinar la abundancia de las comunidades de organismos presentes en una muestra de manera precisa, rápida y económica, sin la necesidad de recurrir al aislamiento [17]. El presente estudio pretende identificar, con ayuda de análisis metagenómicos, la composición fundamental de patógenos potenciales en larvas de *S. frugiperda* criadas bajo condiciones de laboratorio.

Materiales y métodos

Colecta y reproducción de *Spodoptera frugiperda*

Las larvas de *S. frugiperda* se recolectaron de dos campos de maíz localizados en el municipio de Huimilpan, en el estado de Querétaro: 20° 28'30" N, 100°19'37" O y 20°33'23" N, 100°23'12" O. Los especímenes se pusieron en confinamiento individual en recipientes plásticos marca Primo del #0, en condiciones estériles durante 21 días, y se les suministró la dieta artificial reportada previamente [18]. Una vez que las larvas alcanzaron la fase pupal, fueron transferidas a un recipiente plástico de 1 litro durante 9 días para facilitar la eclosión de los adultos; las polillas emergidas se introdujeron en bolsas de papel Kraft para que copularan, posteriormente se extrajeron las masillas de huevos depositados en las paredes interiores. El material extraído se traspasó a recipientes plásticos de 0.5 litros, preparados con la dieta artificial para alimentar a las larvas neonatas hasta que alcanzaran





el segundo instar larval. Las larvas del segundo instar fueron separadas individualmente en recipientes plásticos marca Primo del #0 para evitar el canibalismo. Las condiciones de cría fueron controladas mediante una cámara bioclimática, manteniendo una temperatura de 27 ± 2 °C, humedad relativa de 70 ± 5 % y un fotoperiodo 14:10 (luz:oscuridad).

Extracción del ADN de las larvas

Para la obtención del ADN, dada la naturaleza exploratoria del análisis y el número limitado de larvas, se definió realizar un muestreo por conveniencia. Se homogeneizaron dos larvas vivas y sanas de tercer instar mediante la trituración con un mortero de porcelana, posteriormente las partículas se filtraron por medio de gasas; estas integraron las muestras LS1 y LS2 (Larvas Sanas 1 y 2). Asimismo, se repitió el procedimiento para dos larvas necróticas cuyas características fisiológicas denotaban muerte por virus o bacterias entomopatógenas (LM1 y LM2, Larvas Muertas 1 y 2). Las muestras LM se conformaron de especímenes de tercer instar reproducidos en laboratorio, ya que en esta etapa es improbable que la muerte esté asociada a la adaptación al medio.

Para la extracción del ADN de las muestras homogeneizadas se utilizó el kit ZymoBIOMICS® ADN Miniprep Kit (Zymo Research, Irvine, CA). Mientras que el análisis metagenómico del gADN (ADN genómico) se efectuó mediante la técnica de Illumina NGS (secuenciación de nueva generación) con el servicio de la empresa Macrogen. A su vez, el análisis bioinformático para el metagenoma se llevó a cabo en la plataforma del Centro de Recursos de Bioinformática Bacteriana y Viral (BV-BRC) de la Universidad de Chicago [19], y se refinó mediante la herramienta Trim Galore [20].

La diversidad taxonómica en las muestras metagenómicas se determinó en el instrumento *Taxonomic Classification* de la plataforma BV-BRC, con el fin de identificar la composición microbiana utilizando la clasificación Kraken 2 [21]. Dicho sistema consulta bases de datos en busca de coincidencias exactas de *k-mers* (subsecuencias de longitud *k*), en lugar de alineaciones inexactas de secuencias. Posteriormente, las secuencias se clasificaron según la base de datos para cada *k-mer*; por último, se etiquetaron tomando como guía el conjunto resultante de taxones del ancestro común más bajo.





Resultados y discusión

El análisis metagenómico de las larvas sanas halló dos géneros distintos en la muestra LS1: *Enterococcus* y *Pseudomonas*; las especies encontradas fueron *E. casseliflavus*, *E. flavescens* y *E. gallinarum*, con una abundancia relativa del 85.5 %; otras especies de *Enterococcus* mostraron una abundancia del 14.5 %. En la muestra LS2, se detectó *E. casseliflavus*, *E. flavescens* y *E. gallinarum* al 72.4 % y *E. mundtii* con una baja abundancia relativa (6 %), además de *Pseudomonas putida* al 21.6 %.

Por otro lado, en las muestras LM1 y LM2 se observó una abundancia relativa de *E. casseliflavus*, *E. flavescens* y *E. gallinarum* del 20.4 y 100 % respectivamente; en particular, en LM1 se encontró *E. mundtii* al 69.1 %, *Acetobacter persici* al 9.3 % y *P. putida* al 1 % (Figura 1).

De acuerdo con [22], *Enterococcus* es uno de los géneros bacterianos predominantes dentro del microbioma de los seres vivos y, debido a su inocuidad, podría fungir como indicador de la presencia de materia fecal en las muestras de agua. Asimismo, aunque a menudo se encuentran los géneros *Pseudomonas*, *Staphylococcus*, *Enterobacter* y *Enterococcus* en distintas etapas de desarrollo de lepidópteros, ninguna enfermedad en las larvas se ha asociado a su presencia [23].

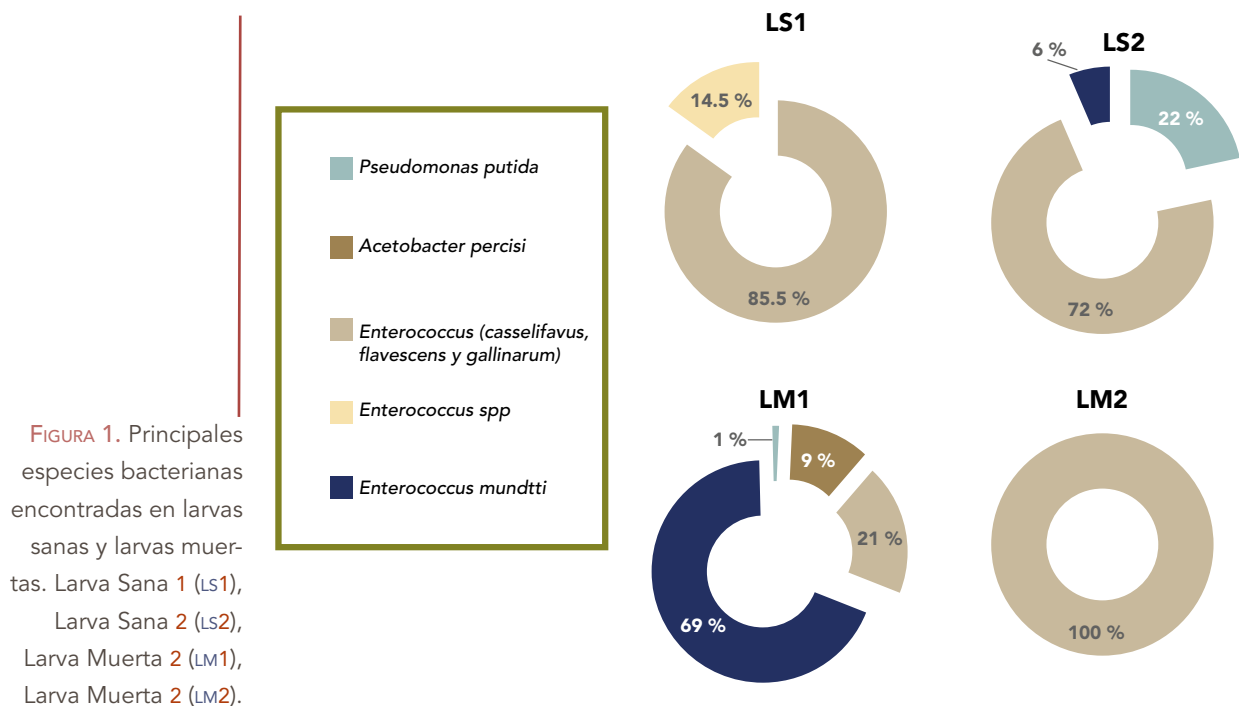


FIGURA 1. Principales especies bacterianas encontradas en larvas sanas y larvas muertas. Larva Sana 1 (LS1), Larva Sana 2 (LS2), Larva Muerta 1 (LM1), Larva Muerta 2 (LM2).



De modo similar, el análisis de diversidad bacteriana mediante la técnica del *16S RNA* ejecutado en [24] detectó mayormente organismos del género *Enterococcus* y, en menor medida, algunas especies de *Pseudomonas*. [8] estudió el cambio composicional del microbioma intestinal de larvas de *S. frugiperda* en función de la temporada de recolección; el género bacteriano principal fue *Enterococcus*, con una abundancia relativa entre 85 y 90 %. En el mismo sentido, en [9] se halló que el microbioma de larvas de *S. frugiperda* recolectadas en maizales abunda en el género *Klebsiella*, seguido por *Enterococcus*, *Acinetobacter*, *Enterobacter* y *Myroides*; adicionalmente se midieron rastros menores a 1 % correspondientes al género *Pseudomonas*.

Durante el análisis metagenómico se apreciaron varias familias de virus; concretamente, en las larvas muertas se alcanzó un porcentaje del 1.48 % mientras que en las sanas alcanzó apenas el 0.004 %. Las lecturas en LM1 y LM2 corresponden a fragmentos de *S. frugiperda* nucleopoliedrovirus (77 % abundancia relativa), *Catopsilia Pomona* nucleopoliedrovirus y de *Hemileuca* sp. nucleopoliedrovirus (0.7 % cada una). La familia *Baculoviridae* está conformada por virus circulares de doble cadena de 80 a 180 kilobases; estos patógenos infectan larvas de algunos lepidópteros de importancia agrícola [25]. [26] divide a esta familia en cuatro géneros:

- Alfabaculovirus: nucleopoliedrovirus que infectan principalmente a lepidópteros.
- Betabaculovirus: granulovirus que infectan lepidópteros.
- Gammabaculovirus: nucleopoliedrovirus que infectan himenópteros.
- Deltabaculovirus: nucleopoliedrovirus que infectan dípteros.

Debido a su alta especificidad e inocuidad para el ambiente y la salud humana, [27] afirman que los baculovirus representan una excelente alternativa al uso de insecticidas químico-sintéticos; además, registraron lecturas del virus del enrollamiento foliar del tomate de Laos, así como del nudivirus *Heliothis zea* con abundancia relativa del 0.5 %. Por su parte, [28] clasifica los iridovirus, densovirus y nudivirus dentro de los virus de ADN que aquejan a distintas especies de lepidópteros.

Dentro de los virus aprovechables como método de control biológico destaca el *Oryctes rhinoceros* nudivirus (OrNV), que se implementa para el control del escarabajo rinoceronte [29], [30]. En la Figura 2, se grafica la abundancia relativa de fragmentos virales descubiertos en larvas muertas.

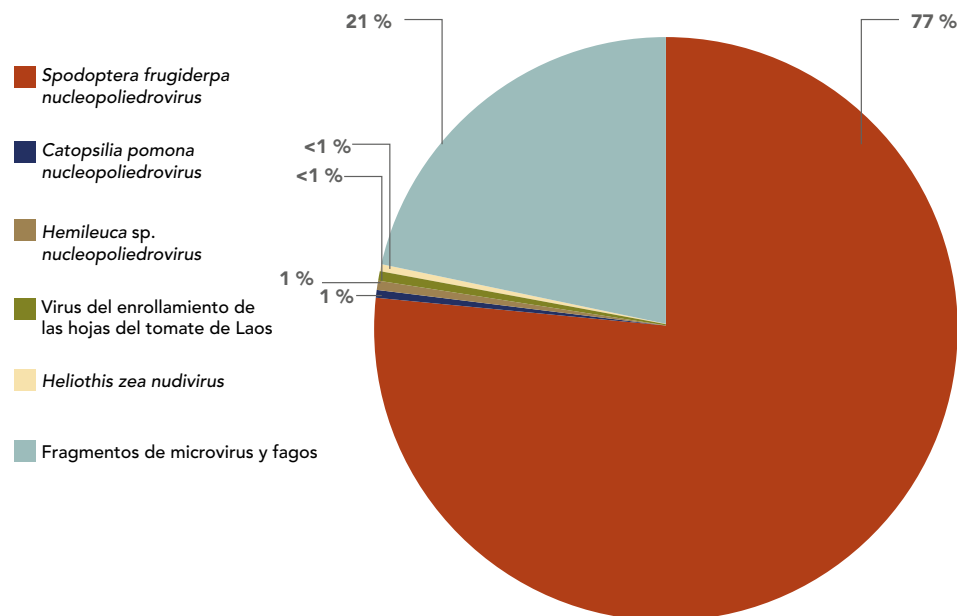


FIGURA 2. Principales especies de virus encontrados en larvas muertas.

En contraste, en las larvas sanas la abundancia relativa de secuencias relacionadas a *Adoxophyes orana* nucleopoliedrovirus, *Spodoptera littoralis* nucleopoliedrovirus, *Clostera anachoreta* granulovirus y *Tipula oleracea* nudivirus resultó baja. El resto de las lecturas atañe fragmentos de microvirus y fagos con una abundancia relativa del 20.6 % en larvas muertas y 85 % en sanas. Tras examinar el transcriptoma y metagenoma de larvas de *S. frugiperda* y *S. litura*, [31] encontraron que los géneros dominantes en las muestras fueron *Enterococcus*, *Alphabaculovirus* y *Corynebacterium*.

Conclusiones

El análisis metagenómico desarrollado en este trabajo mostró que, en condiciones de laboratorio, los géneros bacterianos predominantes en larvas sanas y muertas de *S. frugiperda* fueron *Enterococcus* y, en menor medida, *Pseudomonas* y *Acinetobacter*. Por otro lado, la presencia de baculovirus con mayor abundancia en larvas muertas sugiere una relación con el fenotipo necrótico; empero, es necesario llevar a cabo el aislamiento y ensayos de infección para comprobar o desmentir esa propuesta. Finalmente, el diagnóstico molecular para la detección de patógenos potenciales durante la crianza de *S. frugiperda* es valioso y puede adoptarse como modelo de estudio para evaluar los efectos en su desarrollo.



Agradecimientos

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por la beca de posgrado, así como a la Universidad Autónoma de Querétaro por el apoyo brindado para el desarrollo de este trabajo.

Fuentes de financiamiento

Universidad Autónoma de Querétaro, proyecto FONDEC 2022.

Referencias

- [1] W. T. Tay, R. L. Meagher, C. Czepak y A. T. Groot, "Spodoptera frugiperda: Ecology, Evolution, and Management Options of an Invasive Species", *Annu Rev Entomol*, vol. 68, no. 1, pp. 299-317, Jan. 2023. DOI: 10.1146/annurev-ento-120220-102548.
- [2] J. R. L. Pinto, A. F. Torres, C. C. Truzi, N. F. Vieira, A. M. Vacari y S. A. De Bortoli, "Artificial Corn-Based Diet for Rearing *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae)", *Journal of Insect Science*, vol. 19, no. 4, Jul. 2019. DOI: 10.1093/jisesa/iez052.
- [3] S. Cruz-Esteban, N. M. Mérida Torres, K. P. Álvarez Morales, C. J. López Flores y E. A. Malo, "Effect of the Diet in the Biological Cycle and in the Components of its Sexual Pheromone of *Spodoptera frugiperda*", *Southwestern Entomologist*, vol. 45, no. 1, pp. 227-239, Mar. 2020. DOI: 10.3958/059.045.0124.
- [4] D. D. Li, J. Y. Li, Z. Q. Hu, T. X. Liu y S. Z. Zhang, "Fall Armyworm Gut Bacterial Diversity Associated with Different Developmental Stages, Environmental Habitats, and Diets", *Insects*, vol. 13, no. 9, p. 762, Aug. 2022. DOI: 10.3390/insects13090762.
- [5] Sharanabasappa, C. M. Kallleshwaraswamy, M. S. Maruthi y H. B. Pavithra, "Biology of invasive fall army worm *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) on maize", *Indian Journal of Entomology*, vol. 80, no. 3, p. 540, 2018. DOI: 10.5958/0974-8172.2018.00238.9.
- [6] L. Villamizar, P. Cuartas, J. Gómez, G. P. Barrera, C. Espinel y M. Lopez Ferber, "Virus entomopatógenos en el control biológico de insectos" *Hal Open Science*, 2018.

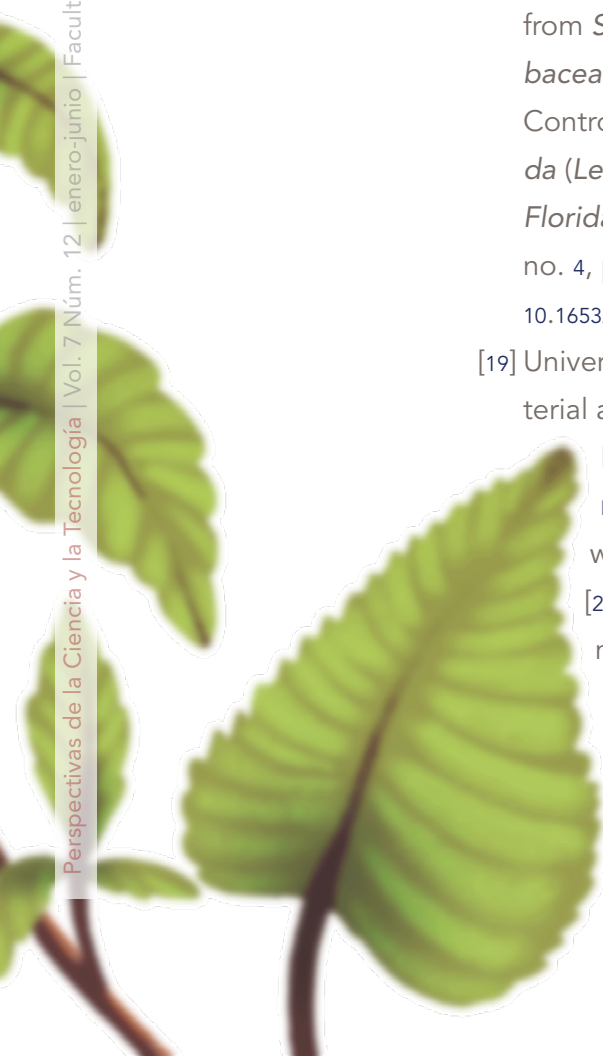


- [7] A. Bravo, S. Likitvivanavong, S. S. Gill y M. Soberón, "Bacillus thuringiensis: A story of a successful bioinsecticide", *Insect Biochem Mol Biol*, vol. 41, no. 7, pp. 423-431, Jul. 2011. DOI: 10.1016/J.IBMB.2011.02.006
- [8] M. F. Higueta Palacio et al., "Dry and Rainy Seasons Significantly Alter the Gut Microbiome Composition and Reveal a Key *Enterococcus* sp. (*Lactobacillales: Enterococcaceae*) Core Component in *Spodoptera frugiperda* (*Lepidoptera: Noctuidae*) Corn Strain From Northwestern Colombia", *Journal of Insect Science*, vol. 21, no. 6, Nov. 2021. DOI: 10.1093/jisesa/ieab076
- [9] J. A. Ugwu, M. Liu, H. Sun y F. O. Asiegbu, "Microbiome of the larvae of *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (*Lepidoptera: Noctuidae*) from maize plants", *Journal of Applied Entomology*, vol. 144, no. 9, pp. 764-776, Nov. 2020. DOI: 10.1111/JEN.12821
- [10] W. Su, J. Liu, P. Bai, B. Ma y W. Liu, "Pathogenic fungi-induced susceptibility is mitigated by mutual *Lactobacillus plantarum* in the *Drosophila melanogaster* model", *BMC Microbiol*, vol. 19, no. 1, pp. 1-12, 2019.
- [11] C. M. Cirimotich, J. L. Ramirez y G. Dimopoulos, "Native microbiota shape insect vector competence for human pathogens", *Cell Host Microbe*, vol. 10, no. 4, pp. 307-310, 2011.
- [12] A. Thong-On, K. Suzuki, S. Noda, J. Inoue, S. Kajiwara y M. Ohkuma, "Isolation and characterization of anaerobic bacteria for symbiotic recycling of uric acid nitrogen in the gut of various termites", *Microbes Environ*, vol. 27, no. 2, pp. 186-192, 2012.
- [13] Y. Chen, H. Zhou, Y. Lai, Q. Chen, X. Q. Yu y X. Wang, "Gut Microbiota Dysbiosis Influences Metabolic Homeostasis in *Spodoptera frugiperda*", *Front Microbiol*, vol. 12, Sep. 2021. DOI: 10.3389/fmicb.2021.727434
- [14] R. Zheng et al., "Comparative Analysis of Gut Microbiota and immune genes of wild and Captive *Spodoptera frugiperda* to reveal the response of the immune system to eld environment in Jianghuai region, China", 2022. DOI: 10.21203/rs.3.rs-1744028/v1
- [15] L. Yuning, L. Luyang, C. Xue-ming, Y. Xianmei, L. Jintian y S. Benshui, "The bacterial and fungal communities of the



larval midgut of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) varied by feeding on two cruciferous vegetables", *Scientific Reports*, vol. 12, p. 13063, 2022. DOI: 10.1038/s41598-022-17278-w

- [16] J. Galloway Peña y B. Hanson, "Tools for Analysis of the Microbiome", *Digestive Diseases and Sciences*, vol. 65, no. 3. Springer, pp. 674-685, Mar. 01, 2020. DOI: 10.1007/s10620-020-06091-y
- [17] J. C. Wooley, A. Godzik y I. Friedberg, "A Primer on Metagenomics", *PLOS Comput Biol*, vol. 6, pp. 1-13, 2010. DOI: 10.1371/journal
- [18] M. Á. Zavala Sánchez *et al.*, "Bioactivity of 1-octacosanol from *Senna crotalarioides* (Fabaceae: Caesalpinioideae) to Control *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae)", *Florida Entomologist*, vol. 102, no. 4, pp. 731-737, Jan. 2020. DOI: 10.1653/024.102.0410
- [19] University of Chicago, "Bacterial and Viral Bioinformatics Resource Center (BV-BRC)". BV-BRC.ORG. <https://www.bv-brc.org/>
- [20] S. J. Bush, "Read trimming has minimal effect on bacterial SNP-calling accuracy", 2020. DOI: 10.1099/mgen.0.000434
- [21] J. Lu y S. L. Salzberg, "Ultrafast and accurate 16S rRNA microbial community analysis using Kraken 2", *Microbiome*, vol. 8, no. 1, pp. 1-11, 2020.
- [22] C. Torres, C. A. Alonso, L. Ruiz Ripa, R. León Sampedro, R. del Campo y T. M. Coque, "Antimicrobial Resistance in *Enterococcus* spp. of animal origin", *Antimicrobial Resistance in Bacteria from Livestock and Companion Animals*, pp. 185-227, Aug. 2018. DOI: 10.1128/9781555819804.CH9
- [23] G. Rozadilla, N. A. Cabrera, E. G. Virla, N. M. Greco y C. B. McCarthy, "Gut microbiota of *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) larvae as revealed by metatranscriptomic analysis", *Journal of Applied Entomology*, vol. 144, no. 5, pp. 351-363, Jun. 2020. DOI: 10.1111/JEN.12742
- [24] Y. P. Chen *et al.*, "Effects of Host Plants on Bacterial Community Structure in Larvae Midgut of *Spodoptera frugiperda*", *Insects*, vol. 13, no. 4, Apr. 2022. DOI: 10.3390/insects13040373
- [25] V. I. D. Ros, "Baculoviruses: General Features (Baculoviridae)", in *Encyclopedia of Virology*, Elsevier, 2021, pp. 739-746.
- [26] G. Rohrmann, "Introduction to the baculoviruses and their taxonomy", *Baculovirus Molecular Biology; National Center*





for *Biotechnology Information: Bethesda, MD, USA*, 2011.

- [27] B. Szewczyk, L. Rabalski, E. Krol, W. Sihler y M. L. de Souza, "Baculovirus biopesticides-safe alternative to chemical protection of plants", 2009.
- [28] A. G. Hussain, J. T. Wennmann, G. Goergen, A. Bryon y V. I. D. Ros, "Viruses of the fall armyworm *spodoptera frugiperda*: A review with prospects for biological control", *Viruses*, vol. 13, no. 11. MDPI, Nov. 01, 2021. DOI: 10.3390/v13112220
- [29] G. O. Bedford, "Biology and management of palm dynastid beetles: recent advances", *Annu Rev Entomol*, vol. 58, pp. 353-372, 2013.
- [30] V. Prasad y S. Srivastava, "Insect viruses", en *Ecofriendly pest management for food security*, Elsevier, 2016, pp. 411-442.
- [31] R. Tang et al., "Transcriptomics and metagenomics of common cutworm (*Spodoptera litura*) and fall armyworm (*Spodoptera frugiperda*) demonstrate differences in detoxification and development", *BMC Genomics*, vol. 23, no. 1, Dec. 2022. DOI: 10.1186/s12864-022-08613-6

