



UNIVERSIDAD
NACIONAL
DE COLOMBIA

Análisis de la Diversidad Microbiana Asociada al Tracto Intestinal de Poblaciones Silvestres de *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) en Antioquia – Colombia.

Marlon Felipe Higueta Palacio

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Ciencias
Medellín, Colombia
2019

Análisis de la Diversidad Microbiana Asociada al Tracto Intestinal de Poblaciones Silvestres de *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) en Antioquia – Colombia.

Marlon Felipe Higueta Palacio

Trabajo de investigación presentado como requisito parcial para optar al título de:
Magister en Ciencias - Biotecnología

Directora:

(Ph.D.) Claudia X. Moreno Herrera

Codirectoras:

(Ph.D.) Gloria E. Cadavid Restrepo

(Ms.C) Olga I. Montoya Campuzano

Línea de Investigación:

Ecología Microbiana

Grupo de Investigación:

Microbiodiversidad y Bioprospección

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Ciencias

Medellín, Colombia

2019

Dedicatoria

A mis maestras, a mis madres.

“En la vida no existe nada que temer, solo cosas que comprender”.

Marie Curie

Agradecimientos

Quiera empezar agradeciendo a mi querida Universidad Nacional, a la cual le debo mi formación profesional y gran parte de mi formación personal, a todo el personal administrativo que realiza un gran trabajo para que muchos estudiantes logren alcanzar importantes metas, en especial al posgrado en Biotecnología por apoyar y creen en este proyecto de investigación, permitiendo que presentar este estudio en un congreso internacional fuera posible.

Nada de esto hubiese sido posible sin el acompañamiento de mi directora y codirectoras de tesis, mujeres con un invaluable talento y conocimiento académico, y quizás en mi caso personal, con extrema paciencia y comprensión en muchas adversidades por las que tuve que transitar. Agradezco enormemente a la Dra. Claudia Ximena Moreno, quien me brindó todo el apoyo académico necesario y en muchas ocasiones palabras de aliento y consejos invaluable para mi vida; a la Dra. Gloria Ester Cadavid, quien fue más que un apoyo a lo largo de este camino, y de quien siempre tuve aliento y consejos en los momentos de mayor presión y angustia; a la profesora Olga Montoya, quien fue más que mi profesora, fue mi maestra de vida. También debo mencionar a todos mis compañeros del grupo de investigación MICROBIOP, personas de las cuales siempre me sentí apoyado; al laboratorio de Microbiología y Aguas y a todo su personal por hacer mi tránsito por allí mucho más que ameno; al laboratorio de Biología Molecular y Celular y a todas las personas que dé el hacen parte, porque gracias a su acompañamiento fueron posibles todos los resultados que en este trabajo se presentan. Quisiera mencionar también a la Dra. Clara Saldamando, quien fue un apoyo constante y de quien aprendí enormemente. A la vida gracias por hacerme coincidir con personas tan valiosas.

Por ultimo agradezco a quienes han sido el motor de mi vida, mi Familia, el apoyo que he recibido sobrepasa lo que mis méritos logran compensar. A ellas mis tres madres les digo que nunca podré pagarles todo lo que han hecho por mí.

Financiamiento

Este proyecto fue ejecutado gracias a recursos brindados por la Universidad Nacional de Colombia dentro de la “CONVOCATORIA NACIONAL DE PROYECTOS PARA EL FORTALECIMIENTO DE LA INVESTIGACIÓN, CREACIÓN E INNOVACIÓN DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA. 2016-2018” adjudicado al proyecto marco: “Diversidad microbiana asociada a insectos plaga de cultivos de interés agrícola en Colombia” del cual este estudio hace parte.

Resumen

Spodoptera frugiperda (J.E. Smith) reconocida plaga polífaga de diversos cultivos de interés agrario ha divergido en dos biotipos morfológicamente idénticos en estado de larva, pero diferenciados genéticamente y asociados a alimentos diferentes, planteando un problema respecto a su control en las plantaciones de todo el continente americano y recientemente en el continente africano, siendo la microbiota asociada al insecto uno de los temas menos estudiados. Las comunidades bacterianas presentes en el intestino de los insectos cumplen funciones vitales durante todo el ciclo de vida: reproducción, defensa contra patógenos, degradación de compuestos tóxicos, asimilación de nutrientes son algunas de ellas, además que dichas comunidades son modeladas por el ambiente externo y por el alimento que consume el insecto. El objetivo de este estudio fue determinar la composición y estructuración de la comunidad bacteriana asociada al intestino de larvas correspondientes al biotipo maíz de *S. frugiperda*. A partir de la morfotipificación y posterior secuenciación del DNAr 16S de 72 aislamientos mediante métodos de microbiología convencional dependientes de cultivo se lograron identificar 22 especies de bacterias relacionadas con los géneros *Enterococcus*, *Klebsiella*, *Enterobacter* y *Bacillus*. El uso de estrategias independiente de cultivo como la Electroforesis en Gel de Gradiente de Temperatura (TTGE) fue congruente con la previa identificación bacteriana; en la secuenciación masiva de nueva generación (NGS) por IlluminaMiseq se analizaron 391.087 reads que resultaron en la asignación por similitud de 7093 OTUs. Se aprecia una baja diversidad y riqueza bacteriana dados los índices de diversidad SHANON, CHAO1, Simpson; y se sugiere un core dominado por los géneros previamente descritos. Se encontraron diferencias respecto a la abundancia relativa en la microbiota del biotipo maíz asociado a la temporada de colecta (altas y bajas precipitaciones). De forma general la microbiota de *S. frugiperda* en el biotipo maíz es similar a la reportada para otras especies del género *Spodoptera*. Este estudio reporta la composición bacteriana dentro del intestino de *S. frugiperda* biotipo maíz, para el futuro planteamiento de estrategias de control biológico donde se puede interferir el ciclo de vida de las larvas manipulando su comunidad bacteriana.

Palabras clave: *Spodoptera frugiperda*, biotipo Maíz, Microbiota, Diversidad, DNAr 16S, TTGE, NGS.

Abstract

Spodoptera frugiperda (J.E. Smith), a polyphagous pest of various crops of agricultural interest, has diverged into two morphologically identical biotypes in the larval stage, but genetically differentiated and associated with different foods, posing a problem with respect to its control in plantations throughout the Americas and recently on the African continent, with the microbiota associated with the insect being one of the least studied subjects. The bacterial communities present in the intestine of insects perform vital functions throughout the life cycle: reproduction, defense against pathogens, degradation of toxic compounds, assimilation of nutrients are some of them, in addition that these communities are modeled by the external environment and by the food consumed by the insect. The objective of this study was to determine the composition and structure of the bacterial communities associated with the intestine of larvae corresponding to the maize biotype of *S. frugiperda*. From the morphotypification and subsequent sequencing of DNAr 16S from 72 isolates by means of conventional culture-dependent microbiology methods, 22 species of bacteria related to the genera *Enterococcus*, *Klebsiella*, *Enterobacter* and *Bacillus* were identified. The use of independent culture strategies such as Temperature Gradient Gel Electrophoresis (TTGE) was congruent with previous bacterial identification; in the new generation mass sequencing (NGS) by IlluminaMiseq 391,087 reads were analyzed resulting in the similarity assignment of 7093 OTUs. The diversity indexes SHANON, CHAO1, Simpson show a low bacterial diversity and richness, and a core dominated by the previously described genera is suggested. Differences were found between the microbiota of the maize biotype associated with the harvest season (high and low rainfall). In general, the microbiota of *S. frugiperda* in the maize biotype is similar to that reported for other species of the genus *Spodoptera*. This study reports the bacterial composition inside the intestine of *S. frugiperda* maize biotype, for the future proposal of biological control strategies where it is possible to interfere the life cycle of the larvae manipulating their bacterial community.

Keywords: *Spodoptera frugiperda*, biotype Corn, Microbiota, Diversity, DNAr 16S, TTGE, NGS.

Contenido

	Pág.
Agradecimientos	VII
Financiamiento	IX
Resumen	1
Abstract	2
Contenido	3
Lista de figuras	5
Lista de tablas	6
1. Introducción	7
2. Marco Teórico	9
2.1 Biología de <i>Spodoptera frugiperda</i>	9
2.1.1 Taxonomía	9
2.1.2 Ciclo de vida y descripción	9
2.1.3 Biotipos	11
2.2 Cultivos de interés económico afectados por <i>S. frugiperda</i>	13
2.3 Control Biológico asociado a <i>S. frugiperda</i>	14
2.4 Microbiota asociada a insectos	15
3. Hipótesis	19
3.1 Hipótesis 1	19
3.2 Hipótesis 2.....	19
4. Objetivos	21
4.1 Objetivo general.....	21
4.2 Objetivos específicos	21
5. Materiales y métodos	23
5.1 Colecta de larvas de <i>S. frugiperda</i>	23
5.2 Extracción del tracto intestinal	25
5.3 Extracción de DNA total.....	26
5.4 Identificación de Biotipos de <i>S. frugiperda</i>	26
5.4.1 PCR-RFLP de la región COI del DNA mitocondrial	26
5.5 Técnicas microbiológicas cultivo dependiente	27
5.5.1 Cultivos bacterianos.....	27
5.5.2 Amplificación de la región intergenica del DNAr 16S – 23S (ITS).....	27
5.5.3 Identificación taxonómica de aislamientos bacterianos mediante la amplificación del DNAr 16S	28
5.6 Técnicas microbiológicas cultivo independiente.....	29
5.6.1 Electroforesis en Gel con gradiente de Temperatura (TTGE).....	29

5.6.2	Secuenciación masiva de nueva generación (NGS) de fracción de DNA total del tracto intestinal	30
6.	Resultados	33
6.1	Identificación de biotipos de <i>S. frugiperda</i>	33
6.2	Análisis cultivo dependientes.....	34
6.2.1	Caracterización microbiológica de aislamientos bacterianos.....	35
6.2.2	Caracterización molecular de aislamientos bacterianos.....	36
6.3	Análisis cultivo independiente.....	38
6.3.1	Análisis de los perfiles de Electroforesis en gel de gradiente de temperatura (TTGE).....	39
6.3.2	Análisis de secuenciación masiva del DNAr 16S mediante Illumina-MiSeq 41	
7.	Discusión.....	45
8.	Conclusiones y recomendaciones	53
8.1	Conclusiones.....	53
8.2	Recomendaciones.....	53
Anexos.....		55
A.	Anexo: Número de unidades formadoras de colonia por temporada de colecta	55
B.	Anexo: Caracterización macro y microscópica de los aislamientos obtenidos	57
C.	Anexo: Dendrograma - análisis de ITS de los aislamientos bacterianos.....	59
D.	Anexo: Dendrograma - análisis de ITS del DNA total.....	61
E.	Anexo: Dendrograma - TTGE.....	63
F.	Anexo: Presentación de resultados en eventos científicos.....	65
Bibliografía		67

Lista de figuras

	Pág.
Figura 2-1: Ciclo de vida de <i>Spodoptera frugiperda</i> (Ortega Corona, 1987).....	11
Figura 2-2: Planta hospedera de maíz de <i>S.frugiperda</i>	13
Figura 5-1: Ubicación de la zona de colecta y almacenamiento de las larvas.	24
Figura 5-2: Disección y extracción del tracto intestinal de larvas de <i>S. frugiperda</i> ...	25
Figura 6-1: Electroforesis en gel de Agarosa de PCR-RFLP de la región COI.....	33
Figura 6-2: Electroforesis en gel de Agarosa de amplicones de la muestra 'A205' ..	34
Figura 6-3: Filogenia de aislamientos bacterianos secuenciados.....	37
Figura 6-4: Electroforesis en gel de gradiente de temperatura (TTGE)	39
Figura 6-5: Filogenia de secuencias re-amplificadas de TTGE	40
Figura 6-6: Curvas de rarefacción.....	41
Figura 6-7: Histograma de Phylum bacteriano	42
Figura 6-8: Histograma de Genero bacteriano	43
Figura 6-9: Índices de alfa diversidad	44
Figura 6-10: Análisis de coordenadas principales PcoA y CAP	44

Lista de tablas

	Pág.
Tabla 5-1: Numero de larvas colectadas y procesadas.....	23
Tabla 5-2: Factores ambientales en la zona de colecta.	24
Tabla 5-3: Primers usados en los experimentos de PCR convencional.	28
Tabla 6-1: Características gravimétricas de las larvas	34
Tabla 6-2: Características micro y macroscópicas de aislamientos representativos. ...	35
Tabla 6-3: Identificación taxonómica de bacterias aisladas del intestino de <i>S. frugiperda</i> biotipo maíz por medio de la secuenciación del DNAr 16S	38

1. Introducción

Spodoptera frugiperda (J.E. Smith, 1797) (Lepidoptera, Noctuidae), también llamado “gusano cogollero del maíz” es reconocido como una plaga polífaga primaria en todo el continente americano de los cultivos de maíz (*Zea mays*) y arroz (*Oryza sativa*); en Colombia se considera una plaga secundaria de diversos tipos de pastos, sorgo (*Sorghum* spp.), algodón (*Gossypium hirsutum*), alfalfa (*Medicago sativa*), caña de azúcar (*Saccharum officinarum*) (Gómez Valderrama, Guevara Agudelo, Barrera Cubillos, Cotes Prado, & Villamizar Rivero, 2010). Los efectos nocivos en las plantaciones por parte de *S. frugiperda* producen pérdidas de hasta el 35% del cultivo de maíz (Torres & Cotes Alba, 2005)(Figura 1-2) siendo esta plaga difícil de controlar en campo, ya que esta polilla ha divergido en dos biotipos que morfológicamente son idénticos en estado de larva, pero que se han diferenciado molecularmente gracias al uso de marcadores moleculares mitocondriales y nucleares (Vélez Arango, Arango I, Villanueva, Aguilera G, & Saldamando B, 2008). Estos biotipos se denominaron con base en la asociación al alimento que consumen: biotipos de maíz y arroz, ya que el biotipo de maíz se encuentra asociado a los cultivos del maíz, algodón, sorgo y caña de azúcar y el biotipo de arroz al arroz y pasto en los departamentos de Córdoba, Meta, Valle del Cauca y Tolima (Cano-Calle, Arango-Isaza, & Saldamando-Benjumea, 2015). Adicionalmente, los adultos de estos biotipos se han diferenciado con el uso de la morfometría geométrica alar en cuanto a la forma y tamaño del ala por lo que a nivel de adultos ambos son identificables, siendo el biotipo de maíz de mayor tamaño que el biotipo de arroz (Cañas-Hoyos, Márquez, & Saldamando-Benjumea, 2014).

Debido a que *S. frugiperda* se ha diferenciado en dos biotipos que presentan diferencias genéticas, aislamiento reproductivo pre-comportamental (Cañas-Hoyos, Marquez & Saldamando-Benjumea, 2014), químico (Cañas-Hoyos, Lobo-Echeverri, & Saldamando-Benjumea, 2017), ecológico (Vélez Arango et al., 2008; Cano-Calle et al., 2015) y postcigótico (Velasquez-Velez et al., 2011), diferencias en la resistencia a insecticidas y a las endotoxinas del *Bacillus thuringiensis* (Cry 1ac y Cry 1ab) debido a que el biotipo de arroz es más resistente que el biotipo de maíz en cuanto a los insecticidas (Ríos-Díez & Saldamando-Benjumea, 2011) y el biotipo de maíz es más resistente a las endotoxinas de 'Bt' comparado con el biotipo de arroz (Ríos-Díez, Siegfried, & Saldamando-Benjumea, 2012), es posible que ambas poblaciones se encuentren en proceso de sub-especiación (Saldamando & Vélez-Arango, 2010a).

Actualmente se considera que los insectos están fuertemente influenciados por su microbiota intestinal, la cual participa en defensa a microorganismos invasores, degradación de compuestos tóxicos, degradación de nutrientes, entre otras (Engel & Moran, 2013); planteando así la necesidad de conocer los microorganismos que están asociados al insecto.

Este estudio se propuso realizar un análisis de la diversidad bacteriana encontrada en el tracto intestinal de larvas silvestres de *S. frugiperda* obtenidas de un cultivo de maíz del departamento de Antioquia (Estación Agraria Cotove – Universidad Nacional de Colombia sede Medellín (6°31'54.0"N 75°49'33.8"W)) durante dos temporadas del año 2017, ya que se buscaba explorar la relación entre las condiciones ambientales y la posible variación de la abundancia relativa de las comunidades bacterianas dentro del intestino de las larvas de *S. frugiperda* biotipo maíz. La microbiota encontrada fue identificada con el uso de métodos de microbiología molecular, con técnicas de microbiología convencional y secuenciación de nueva generación.

2. Marco Teórico

2.1 Biología de *Spodoptera frugiperda*

2.1.1 Taxonomía

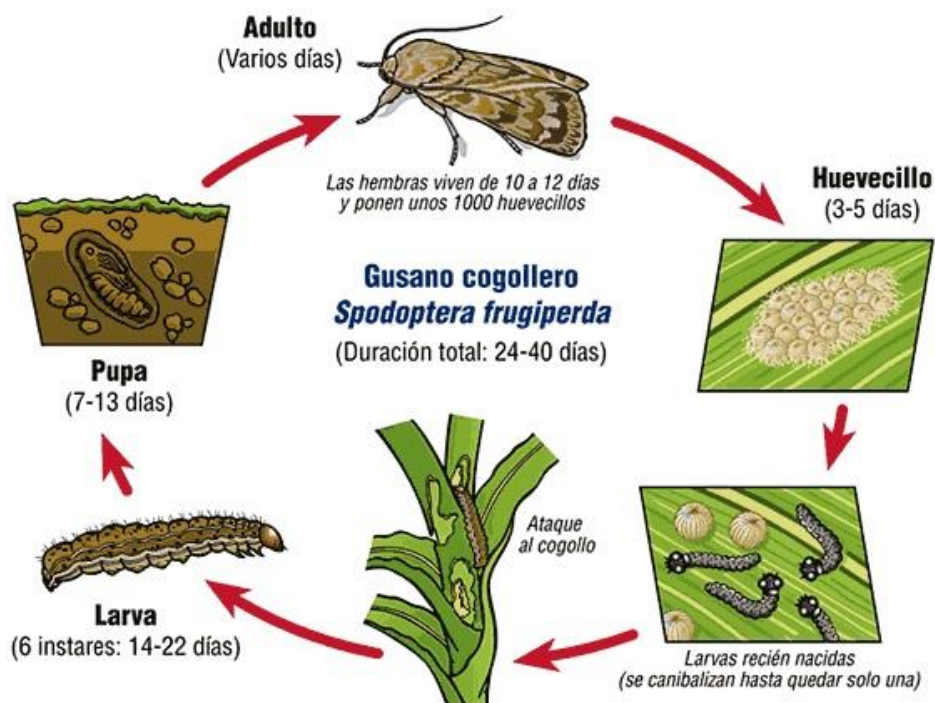
Spodoptera frugiperda pertenece al Reino Animalia, Phylum Arthropoda, Clase Insecta, orden Lepidoptera, suborden Glossata; Infraorden Heteroneura, familia Noctuidae, Género *Spodoptera* y a la especie *Spodoptera frugiperda*; coloquialmente es conocido como “gusano cogollero” y fue descrito por primera vez en 1797 por el botánico y zoólogo Ingles James Edward Smith.

2.1.2 Ciclo de vida y descripción

S. frugiperda tiene un ciclo de vida de aproximadamente 30 días, tiempo en el cual una sola hembra es capaz ovipositar alrededor de 1000 huevos en grupos de a 100 en promedio, esto se da durante las primeras horas de la noche; el desarrollo de la larva se da en 6 instares larvales y un estado de pupa que ocurre en el suelo (Capinera, 2014); las oviposiciones ocurren tanto en el haz como en el envés de la primera hoja cotiledonal del maíz y la eclosión se da luego de tres días aproximadamente (ICA, 2003).

Según se va desarrollando la larva, esta va descendiendo al cogollo de la planta, que es la parte más tierna y con mayor valor proteico, cabe aclarar que las larvas de *S. frugiperda* se concentran en la acumulación de la mayor cantidad de energía, la cual se usara para todos los procesos de metamorfosis del insecto (Vélez, 1997). El tamaño aproximado es de 1,5 mm en el momento de su eclosión, caracterizándose por ser de color blanco-beige con puntos pubescentes negros.

El primer alimento que recibe la larva recién eclosionada proviene de la raspadura del follaje, las cuales dejan manchas claras en las hojas de la planta hospedera y según sea la ingesta de alimento alcanzan el máximo desarrollo entre 15 y 24 días de actividad llegando a medir de 33 a 44 mm de longitud; en este punto el color de la larva es marrón o verde oscuro, con una línea media longitudinal de color café situada entre las dos líneas laterales de color marrón en igual sentido (ICA, 2003). El estado de pupa se da luego de que la larva ha obtenido la cantidad de energía suficiente para continuar su desarrollo, ésta busca el suelo donde preparará una 'cámara pupal' en el cual se mantendrá inmóvil durante 10 días aproximadamente; la característica morfológica más relevante es la presencia en el extremo abdominal de dos espinas que forman una especie de gancho. Al terminar este proceso emergerá un adulto con un color gris oscuro; los machos poseen cierto tipo de figuras amorfas llamativas en las alas delanteras, mientras que las hembras presentan un color blancuzco en las alas traseras; poseen una envergadura de 35 mm aproximadamente, así como una longitud de 25mm (ICA, 2003; Vélez, 1997). La polilla adulta es de hábitos nocturnos, momentos en los cuales se alimenta, aparea y oviposita, siempre alrededor de la planta hospedera; cuando trascurren 48 horas en estado adulto se inicia la copula, las hembras liberan feromonas que atraen a los machos, dándose así el proceso que se mantendrá en repetidas ocasiones y que luego de tres días sucederá la ovoposición (Sparks, 1979); las polillas en el día permanecen ocultas entre la vegetación circundante, mientras que en la noche son capaces de desplazarse hasta 3 km si existen vientos favorables, siendo este un factor importante en la proliferación de la plaga (ICA, 2003) (Figura 2-1).

Figura 2-1: Ciclo de vida de *Spodoptera frugiperda* (Ortega Corona, 1987)

2.1.3 Biotipos

El género *Spodoptera* tiene reconocidas alrededor de 12 especies, siendo *S. frugiperda* una de las más estudiadas, dado la gran afectación a cultivos de interés agrícola (ICA, 2003; Pashley, 1988). Esta especie tiene identificados dos “biotipos” que son morfológicamente idénticos en estado larval y que han sido reconocidos según la asociación con la planta hospedera: maíz y arroz (Cano-Calle et al., 2015; Lobo Hernandez, 2011; Rod N Nagoshi & Meagher, 2004b; Prowell, McMichael, & Silvain, 2004).

Los primeros estudios realizados respecto a la biotipificación de *S. frugiperda* mostraron que el biotipo de arroz estaba mejor adaptado fisiológicamente hablando que el biotipo de maíz, debido a que las evaluaciones en el desarrollo de las larvas y de las pupas mostraron que la ganancia de peso de las larvas del biotipo de maíz era mayor comparado con el biotipo de arroz alimentándose de las mismas plantas hospederas (Pashley, 1988). Posteriormente se buscó comparar la preferencia de la oviposición, el desarrollo larval y la manera de alimentación en ambos biotipos usando diversas plantas hospederas; los resultados indicaron que las larvas del

biotipo de maíz tenían una fuerte preferencia por el cultivo de maíz, en contraste con el biotipo de arroz que era más flexible al momento de consumir un alimento diferente al arroz (Pashley, Hardy, & Hammond, 1995), además que los individuos del biotipo de maíz presentaban mayor peso y el desarrollo era más acelerado; en cambio, la supervivencia fue similar en ambos biotipos (Robert L. Meagher & Nagoshi, 2004).

Respecto al apareamiento se puede inferir luego de tener varios estudios al respecto (Pashley & Martin, 1987; Quisenberry, 1991; Whitford, Quisenberry, Riley, & Lee, 1988), que las larvas silvestres presentan un comportamiento diferente al de las larvas cultivadas bajo condiciones de laboratorio; en el caso de poblaciones silvestres, las hembras del biotipo arroz se cruzan satisfactoriamente con los machos del biotipo maíz, pero el cruce alterno no se produce (Pashley & Martin, 1987); mientras que en poblaciones de colonia los cruces biliterales de ambos biotipos fueron exitosos (Quisenberry, 1991; Saldamando & Vélez-Arango, 2010; Velasquez-Velez et al., 2011; Whitford et al., 1988). Ya que se conoce que la liberación de feromonas por parte de las hembras es el interruptor de activación para que se dé el apareamiento (Sparks, 1979), se mostró que la composición de dichas feromonas era significativamente diferente entre ambos biotipos (Groot et al., 2008), proponiendo una idea enfocada a que la especiación de *S. frugiperda* está influenciada por este tipo de selección química (Lobo Hernandez, 2011). Estudios recientes han demostrado que los biotipos producen 27 compuestos volátiles que pueden ejercer un papel importante en su sistema de comunicación, siendo 11 de ellos encontrados en el biotipo de arroz, 8 en el biotipo de maíz y 9 compartidos entre ellos (Cañas-Hoyos et al., 2017). Dentro de estos compuestos se hallaron las feromonas previamente reportadas (Groot et al., 2008), pero se encontraron otros compuestos que fueron identificados por primera vez en la especie.

2.2 Cultivos de interés económico afectados por *S. frugiperda*

En el año 2003 el Instituto Colombiano Agropecuario ICA publicó que *S. frugiperda* podía afectar diversos tipos de plantas: *Beta vulgaris* var. *saccharifera* (Remolacha), *Capsicum annuum* (Pimentón), *Dianthus caryophyllus* (Clavel), *Glycine max* (Soya), *Gossypium* (Algodón), *Hevea brasiliensis* (Caucho), *Ipomoea batatas* (Batata), *Lycopersicon esculentum* (Tomate), *Medicago sativa* (Alfalfa), *Musa* (Banano), *Nicotiana tabacum* (Tabaco), *Oryza sativa* (Arroz), *Pelargonium* (Geranio), *Phaseolus* (Fríjol), *Phaseolus vulgaris* (Fríjol), *Pisum sativum* (Arveja), *Poaceae* (Pastos), *Saccharum officinarum* (Caña de azúcar), *Solanum melongena* (Berenjena), *Solanum tuberosum* (Papa), *Sorghum* (Sorgo), *Spinacia oleracea* (Espinaca), *Trifolium* (Tréboles), *Zea mays* (Maíz) (Figura 2-2), *Zingiber officinale* (Jengibre), todas ellas de importancia agrícola en el país. Se muestra así como la gran cantidad de hospederos para esta plaga y su amplia distribución territorial genera una constante en las poblaciones de la polilla (García, Mosquera, Vargas, & Rojas, 2002; ICA, 2003; Torres & Cotes Alba, 2005), provocando un impacto negativo para toda la industria agraria.

Figura 2-2: Planta hospedera de maíz de *S. frugiperda*¹



¹A: planta de maíz sin afectación de la plaga. B: planta de maíz afectada por la plaga.

2.3 Control Biológico asociado a *S. frugiperda*

Desde que *S. frugiperda* se identificó como plaga se ha estudiado ampliamente, abarcando diferentes hipótesis que buscaban desde el conocimiento general del insecto hasta llegar a tener un control óptimo de la polilla en las plantaciones de interés agrícola; como el control biológico ha sido la alternativa menos perjudicial ecológicamente, la gran mayoría de los estudios están enfocados en este punto. Se debe partir del hecho que esta plaga es endémica del continente americano, por lo tanto, los estudios están enfocados en la situación que viven los países de la región, como es el caso de Estados Unidos y de Brasil, donde se han obtenidos los mayores aportes, como también lo resultados más relevantes en las investigaciones colombianas.

En 1995 se empezó el desarrollo de compuestos insecticidas derivados de plantas de la familia Annonaceae que naturalmente y como mecanismo de defensa producen acetogeninas (Feras Q. Alali, Xiao-Xi Liu, & McLaughlin*, 1999), las pruebas realizadas sobre *S. frugiperda* mostraron casi una efectividad del 80% de mortandad en larvas, allí se suministraba el complejo enzimático como alimento, y esto presento un inconveniente en la implementación de esta alternativa de control para la plaga (Álvarez Colom, Neske, Popich, & Bardón, 2007; Di Toto Blessing, Álvarez Colom, Popich, Neske, & Bardón, 2010). Sin embargo, los esfuerzos en obtener un control biológico de la plaga siguieron, y los nuevos estudios proponían analizar el efecto de un tipo de maíz genéticamente modificado que contenía la proteína Cry 1F aislada de *Bacillus thuringiensis* (Bt), se observó un efecto negativo sobre las larvas, llevando a que una poca cantidad de individuos sobrevivieran luego de 14 días de exposición, indicando así algún tipo de resistencia a la proteína Cry 1F por parte de las larvas sobrevivientes (Di Toto Blessing et al., 2010). Los controles para la plaga han mostrado una efectividad alta, pero por diversas razones no se acentúa un método que aparte de eficaz sea eficiente y amigable con el medio ambiente al mismo tiempo (Guerrero, Malo, Coll, & Quero, 2014). En el año 2016 se planteó evaluar la actividad insecticida de aceites esenciales de *Eucalypto staigeriana*, *Gratissimum Ocimum*, y *Foeniculum vulgare*, donde el aceite de *O. gratissimum* mostró los mejores resultados, además, este tipo de control

biológico mostraba una implementación en campo no tan tediosa como los otros métodos antes expuestos (Cruz et al., 2016). En otro estudio llevado a cabo en Brasil buscó analizar la resistencia de *S. frugiperda* en maíz modificados 'MON 89034 x NK603 x TC1507' con la capacidad de expresar proteínas Cry 1A.105, Cry 1F de Bt, mostrando unos porcentajes bajos de mortandad de las larvas, llevando a proponer zonas protegidas para realizar los cultivos de maíz (Cruz et al., 2016). En Colombia, los aportes a esta problemática se enfocan al mismo objetivo: implementar un control biológico de la plaga. Se analizó por ejemplo el efecto insecticida de diversas cepas de *Bacillus thuringiensis*, arrojando resultados prometedores (Arango, Romero, & Orduz, 2002). Luego el uso del hongo entomopatógeno *Nomuraea rileyi*, mostro una efectividad del 100% sobre las larvas tratadas, aunque no se tuvo en cuenta la discriminación por biotipos de la plaga, siendo este un factor importante para obtener un análisis más preciso (Torres & Cotes Alba, 2005). En la misma línea, la implementación de nucleopoliedrovirus de la familia *Baculoviridae* se evaluó sobre la plaga, mostrando resultados de infección de solo el 2% de las larvas sometidas a las pruebas, abriendo una ventana a posteriores estudios que optimicen la implementación de esta alternativa (Gómez Valderrama et al., 2010).

Un estudio reciente abordó un tema casi inexplorado respecto a lo que se conoce de *S. frugiperda*, donde la microbiota intestinal de la larva juega un papel crucial en sus características de resistencia a insecticidas; se pretendía entonces evaluar si la microbiota bacteriana presenta un potencial degradador de los insecticidas, se pudo concluir que algunos de los aislamientos bacterianos (*E. casseliflavus*, y *E. mundtii*) pueden influir en la metabolización de los insecticidas por parte del insecto (Almeida et al., 2017a).

2.4 Microbiota asociada a insectos

Procesos naturales tales como la digestión del alimento, la reproducción, la producción de feromonas, defensa ante patógenos, entre otras, en los insectos están mediadas por organismos endosimbiontes (Gil, Latorre, & Moya, 2004; Wernegreen, 2002); además, dichos microorganismos están directamente

involucrados con el desarrollo y el mantenimiento del sistema inmune del hospedero (Tang et al., 2012), así como la interacción que tiene el insecto con el alimento, que en muchos casos son organismos vegetales con un sistema de defensa bioquímico (Spiteller, Dettner, & Boland, 2005). Partiendo de esta base, podemos dilucidar la importancia de conocer la microbiota asociada al organismo huésped.

Spodoptera littoralis, que de forma análoga a *S. frugiperda* es considerado plaga polífaga en el continente asiático, tiene reportes de microbiota asociada al intestino de las larvas, mostrando la presencia de varios tipos de especies bacterianas del género *Enterococcus* y del género *Clostridium* como las más predominantes, y no menos importantes bacterias del género *Pseudomonas*, *Klebsiella*, *Microbacterium*, *Xanthomonas* y *Pantoea* (Tang et al., 2012); recientemente se ha evidenciado la actividad bacteriolítica por parte de *Enterococcus mundtii* gracias a la bacteriocina 'mundticin KS' en algunas bacterias invasoras al tracto gastrointestinal de la larva (Shao et al., 2017b).

La identificación de la microbiota intestinal asociada a diversos tipos de insectos basada en métodos de cultivo bajo condiciones de laboratorio ha brindado una luz al respecto, más no una visión global de los microorganismos que allí se encuentran, ya que solo alrededor de un 5% de las bacterias presentes son viables para cultivo (Dillon & Dillon, 2004; Tang et al., 2012), pero si es de importancia para la implementación de ensayos que permitan analizar la actividad enzimática y metabólica de las bacterias cultivables. Se plantea entonces la implementación de técnicas que si permitan tener una aproximación más amplia en la identificación de la microbiota asociada al intestino de insectos, siendo el uso de técnicas independientes de cultivo propicias para obtener resultados más concluyentes (Brinkmann, Martens, & Tebbe, 2008; Broderick, Raffa, Goodman, & Handelsman, 2004; Shao et al., 2017b; Vivero, Cadavid-Restrepo, Moreno-Herrera, & Soto Uribe, 2017).

El problema que plantea *S. frugiperda* se sustenta en las grandes pérdidas económicas que genera a la industria agrícola, alcanzando un 35% en los cultivos de maíz y porcentajes similares en el resto de cultivos que afecta en Colombia (ICA,

2003), aumentando los costos de producción agrícola hasta en un 10% (Torres & Cotes Alba, 2005; Zenner et al., 2009). Los estudios realizados en busca de mitigar esta problemática no han sido lo suficientemente efectivos, ya sea porque son perjudiciales para el ecosistema o por que la efectividad sobre la plaga no es contundente.

Conocer la diversidad microbiana asociada a *S. frugiperda* puede ser clave tanto para abundar en el conocimiento de la plaga como para plantear ideas en mira de solucionar la afectación en los cultivos; el estudio de las plagas debe asociarse con su ecología ya que existe una interacción natural entre la diversidad microbiana y el organismo huésped, la cual afecta directamente su ciclo de vida, de tal manera las plagas pueden ser controladas interfiriendo en este tipo de asociaciones. Atacar esta problemática requiere comprender muy bien la dinámica molecular y biológica de los insectos, siendo necesario recurrir a las herramientas que hacen uso de técnicas de microbiología convencional, técnicas moleculares y métodos de secuenciación masiva; estas últimas han desempeñado un papel importante en el avance de los métodos de identificación de las diversas especies de microorganismos por medio de marcadores moleculares y métodos de secuenciación de última generación, mostrando una muy buena especificidad, sensibilidad y rapidez, además pueden ser automatizadas; los métodos tradicionales basados en morfología de la microbiota asociada, si bien requieren un tiempo considerable para la identificación (J. Yu, Saiardi, Greenwood, & Bewley, 2014), son necesarios para la obtención de aislamientos bacterianos y la caracterización de las actividades metabólicas y enzimáticas con potencial biológico. Las técnicas moleculares se sustentan en la extracción de la microbiota proveniente del intestino de las larvas de ambos biotipos de *S. frugiperda*, para posteriormente obtener DNA bacteriano e identificarlo molecularmente (Vivero et al., 2017). Estos análisis han permitido relacionar el hábitat del insecto con los microorganismos encontrados, por lo cual se plantea que la microbiota de los biotipos de *S. frugiperda* puede variar por hospedero y por biotipo.

Según los estudios realizados en Colombia por el grupo de investigación de Biotecnología vegetal UNLAMEDCIB en la línea de ecología y evolución de

insectos (categoría A ante Colciencias) y las investigaciones realizadas por el grupo de Microbiodiversidad y Bioprospección de UNALMED (categoría A ante Colciencias), sobre la microbiota asociada a los insectos, a los moluscos y al suelo; se propone entonces en este proyecto realizar la identificación y la caracterización de las comunidades bacterianas asociadas al tracto gastro-intestinal de las larvas de *S. frugiperda* colectadas en cultivos de maíz en el departamento de Antioquía, usando análisis de microbiología convencional y análisis moleculares independientes de cultivo. El estudio de la diversidad bacteriana asociada a poblaciones silvestres de *S. frugiperda* permitirá generar nueva información necesaria para permitir el desarrollo biotecnológico de estrategias de control de la plaga en Colombia.

3. Hipótesis

3.1 Hipótesis 1

Ha: Existe una diversidad bacteriana amplia de bacterias asociadas al intestino de *S. frugiperda*.

Ho: No existe una diversidad bacteriana amplia de bacterias asociadas al intestino de *S. frugiperda*.

3.2 Hipótesis 2

Ha: Existen una influencia directa del aumento o disminución de las precipitaciones en la zona de colecta sobre la comunidad bacteriana asociada al intestino de *S. frugiperda*.

Ho: No existen una influencia directa del aumento o disminución de las precipitaciones en la zona de colecta sobre la comunidad bacteriana asociada al intestino de *S. frugiperda*.

4. Objetivos

4.1 Objetivo general

Estudiar las comunidades bacterianas asociadas al tracto gastro intestinal en poblaciones silvestres de *Spodoptera frugiperda* (Lep. Noctuidae) provenientes de cultivos de maíz en Antioquia – Colombia.

4.2 Objetivos específicos

- Caracterizar la microbiota asociada al tracto gastro intestinal presente en las poblaciones silvestres de *S. frugiperda* usando las técnicas dependientes de cultivo.
- Identificar las comunidades bacterianas presentes en poblaciones silvestres de *S. frugiperda* usando técnicas independientes de cultivo.
- Correlacionar las comunidades bacterianas encontradas con análisis dependientes e independientes de cultivo presentes en el tracto gastrointestinal de *S. frugiperda*.

5. Materiales y métodos

5.1 Colecta de larvas de *S. frugiperda*

Larvas silvestres de *S. frugiperda* se colectaron al azar en cultivos de maíz en el departamento de Antioquia – Santa Fe de Antioquia (Estación Agraria ‘Cotove’ - Universidad Nacional de Colombia - sede Medellín ((6°31'54.0"N 75°49'33.8"W) (Figura 5-1A)) durante los meses de marzo y octubre de 2017 (Tabla 5-1).

Tabla 5-1: Numero de larvas colectadas y procesadas.

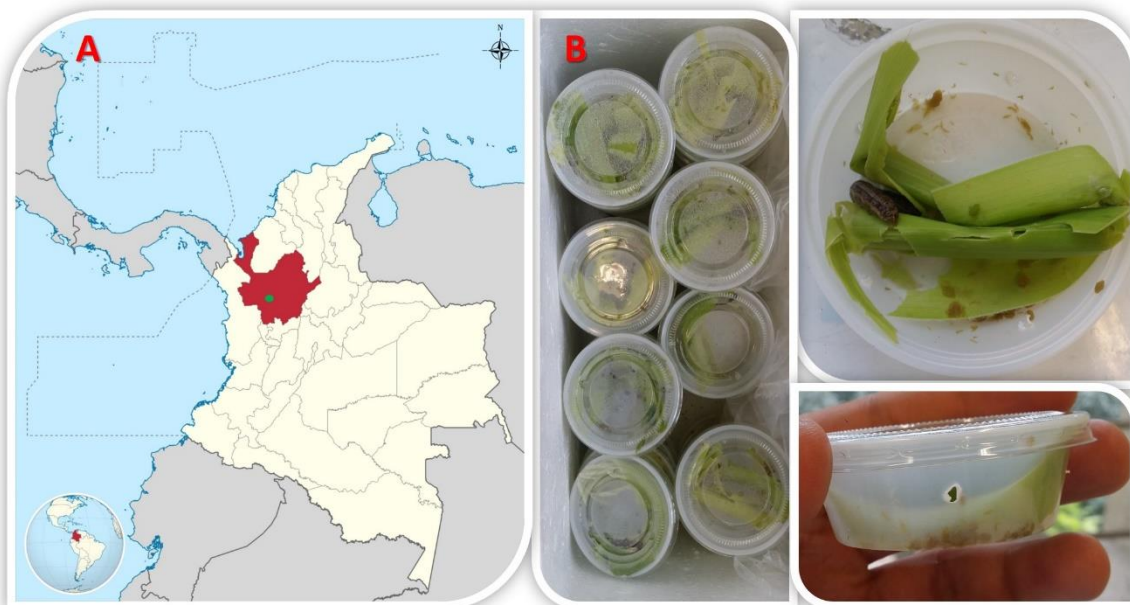
Temporada	Fecha	# larvas colectadas	# larvas procesadas
Season 1	marzo 2017	100	14
Season 2	octubre 2017	50	15

Las temporadas de colecta fueron establecidas teniendo como base los cambios en las precipitaciones y en la temperatura promedio de ambos meses en el municipio de Santa Fe de Antioquia – Antioquia – Colombia; mientras que las lluvias aumentan sustancialmente del mes de marzo al mes de octubre, la temperatura promedio desciende en 1.8°C. (Climate-Data 2017) (Tabla 5-2).

Tabla 5-2: Factores ambientales en la zona de colecta².

	Enero	Febrero	Marzo	Abril	Mayo	Junio	Julio	Agosto	Septiembre	Octubre	Noviembre	Diciembre
Temperatura media (°C)	25.9	26.2	26.7	25.9	25.3	25.2	25.5	25.7	25	24.9	25	25.2
Precipitación (mm)	20	37	50	122	168	126	124	129	139	184	112	55

Las larvas fueron almacenadas individualmente para evitar el canibalismo, en recipientes plásticos tapados de 5cm de diámetro adecuados para el ingreso de aire y en presencia de material vegetal (cogollos de maíz) como alimento. Las larvas fueron alimentadas hasta su procesamiento (Figura 5-1).

Figura 5-1: Ubicación de la zona de colecta y almacenamiento de las larvas³.

²Temperatura media (°C) y Precipitaciones (mm) durante el año 2017 en Santa Fe de Antioquia – Antioquia – Colombia. (Climate-Data 2017)

³**A:** ubicación de cultivo de maíz en el departamento de Antioquia – Santa Fe de Antioquia (Estación Agraria ‘Cotove’ - Universidad Nacional de Colombia - sede Medellín (6°31'54.0"N 75°49'33.8"W).

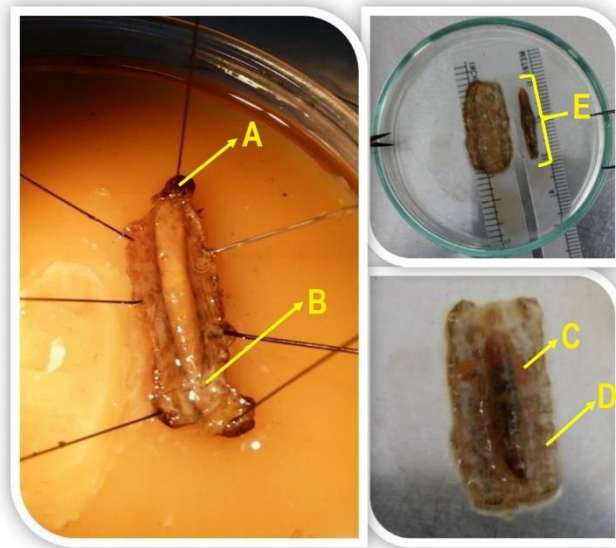
B: almacenamiento de las larvas durante la colecta

5.2 Extracción del tracto intestinal

La extracción intestinal se llevó a cabo en larvas del último instar colectado, las cuales fueron sometidas a -20°C durante 10 minutos, para así disminuir sus funciones vitales; posteriormente se hizo un lavado corporal de la larva alternando entre etanol 70% y una solución de PBS+Twin20 1% con el fin de remover los microorganismos externos (Vivero Gómez, 2016); adicionalmente se tomaron datos gravimétricos de cada larva procesada.

La disección de la larva se realizó con fórceps estériles y embebida en buffer PBS 1X (Phosphate buffered saline) (Figura 5-2); se extrajo todo el tracto gastrointestinal, el cual se pesó y se midió, éste fue colocado en un tubo ependorff con 300 μL de PBS 1X estéril; con ayuda de un pistilo de acrílico estéril se realizó un macerado del tejido, para posteriormente ser procesado (análisis cultivo dependientes) y/o almacenado a -20°C (análisis cultivo independiente) (Yun et al., 2014) según los requerimientos experimentales.

Figura 5-2: Disección y extracción del tracto intestinal de larvas de *S. frugiperda*⁴



⁴ Morfología interna de la larva: **A: Cabeza. B: Túbulos de Malpighi. C: Gónada. D: Tegumento. E: Tracto intestinal, (2 cm).**

5.3 Extracción de DNA total

La extracción de DNA genómico se hizo a partir de las 29 muestras de tejido intestinal usando el kit de extracción 'FastDNA™ SPIN Kit' siguiendo las instrucciones del fabricante. La concentración del DNA se determinó usando Nanodrop 2000 Espectrofotómetro (ThermoScientific©) y la integridad del DNA extraído se evaluó en geles de agarosa al 1% p/v, visualizados con EZ-VISION® (Amresco, U.S.A) como colorante.

5.4 Identificación de Biotipos de *S. frugiperda*

5.4.1 PCR-RFLP de la región COI del DNA mitocondrial

El DNA genómico total fue usado en la amplificación mediante PCR convencional en 20µl de mezcla de reacción que contenía 2µl de buffer de Taq polimerasa (10X) (Fermentas, California USA), con (NH₄)₂ SO₄, 1.2µl de MgCl₂ 25mM (Fermentas), 0.4µl de dNTPs (10mM) (Invitrogen, California USA), 0.8µl de primer JM76, 0.8µl de primer JM77 (Tabla 3), 0.4µl (5U/ml) de Taq DNA polimerasa (Fermentas), 13µl de H₂O y 1.0µl de ADN (50- 100ng). Para la PCR se realizó un ciclo inicial de 94°C por 3 minutos, seguido de 30 ciclos a 94°C por 1 minuto, 62°C por 1 minuto y 72°C por 1 minuto, y un ciclo de extensión final de 72°C por 10 minutos. Posteriormente se hizo una digestión con la enzima de restricción MspI, para esto se adicionó en un nuevo tubo 300 ng de mezcla de PCR, 2µl de Buffer Tango 10X (Fermentas, California U.S.A) y 0.5µl de la enzima MspI (10U/µl), esto se completó con 9.5µl de H₂O, y se incubó a 37°C por 2h. Las muestras se analizaron en un gel de agarosa al 2% teñidas con EzVision® y se visualizaron en un transluminador UV (Cano-Calle et al., 2015).

La identificación de los biotipos será determinada por la digestión de los productos de PCR por parte de la enzima MSPI, siendo que, si presenta la restricción en el fragmento, se estará hablando del biotipo maíz al generarse dos fragmentos (497pb y 72pb) (Levy, Garcia-Maruniak, & Maruniak, 2002; R L Meagher & Gallo-Meagher, 2003); por lo contrario la ausencia en dicha restricción sugiere la implementación de una nueva amplificación, esta vez de la región nuclear FR, para determinar si

se trata de un individuo perteneciente al biotipo arroz o de un híbrido entre ambos biotipos (Cano Calle, 2015): las especies pertenecientes al biotipo de arroz mostrarán una escalera de fragmentos en la región FR de alto peso molecular (mayores a 500pb), si los fragmentos visualizados son de bajo peso molecular estaremos hablando entonces de un individuo híbrido entre ambos biotipos (Rod N Nagoshi & Meagher, 2004b; Vélez Arango et al., 2008).

5.5 Técnicas microbiológicas cultivo dependiente

5.5.1 Cultivos bacterianos

Inmediatamente el tejido intestinal fue macerado (16 muestras), se procedió a realizar diluciones seriadas (hasta 10^6), esto para conservar la viabilidad de las células bacterianas presentes en el tejido intestinal; se inocularon 100 μ L de cada dilución (10^3 , 10^4 , 10^5 , 10^6) en los medios de cultivo Agar Nutritivo y Agar McConkey; los cultivos fueron incubados a 37°C durante 24h bajo condiciones aerobias. Los recuentos de unidades formadoras de colonia (UFC) en aquellos cultivos se hicieron para los que obtuvieron entre 30 a 300 UFC/g, es decir, que fueran contables, se calcularon las unidades formadoras de colonia (UFC) expresando los resultados como \log_{10} de las unidades formadoras de colonias por gramo de muestra (UFC/g); el recuento para cada muestra fue realizado por duplicado. Las colonias obtenidas fueron aisladas, purificadas y caracterizadas macro y microscópicamente, obteniendo características de elevación, borde, color y forma de la colonia, además de una coloración de Gram. Las colonias caracterizadas fueron conservadas en glicerol 20% v/v a -20°C para su posterior análisis molecular (Vivero Gómez, 2016).

5.5.2 Amplificación de la región intergenica del DNAr 16S – 23S (ITS)

Se hizo una PCR (Polymerase chain reaction) de colonia de los cultivos bacterianos puros previamente caracterizados, en busca de establecer según el patrón de bandeo obtenido, las diferencias que puedan existir con base en el análisis de ITS

(Internal transcribed spacer); estos ensayos se realizaron con los primers L1 y G1 (Tabla 5-3), de acuerdo a (P. R. Jensen & Fenical, 1994). Los productos de PCR fueron visualizados en geles de poliacrilamida al 8% p/v, teñidos con nitrato de plata y analizados con en el software Gelcompar II (Applied Maths Biosystems, Belgium). Una vez alineados los carriles representantes de cada muestra de DNA, se realizó un análisis de agrupamiento mediante el coeficiente de Dice y el promedio aritmético no ponderado (UPGMA).

Tabla 5-3: Primers usados en los experimentos de PCR convencional.

INDICADOR	SECUENCIA 5'-3'	DNA BLANCO	Referencia
G1	GAAGTCGTAACAAGG	region intergenica 16S-23S DNAr - bacteria	(M. A. Jensen, Webster, & Straus, 1993)
L1	CAAGGCATCCACCGT	region intergenica 16S-23S DNAr - bacteria	(M. A. Jensen et al., 1993)
1492R	GGTTACCTTGTTACGACTT	16S DNAr - bacteria	(Espejo, Feijóo, Romero, & Vásquez, 1998)
27F	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG	16S DNAr - bacteria	(Espejo et al., 1998)
338R	GCTGCCTCCCGTAGGAGT	16S DNAr - bacteria	(Camarinha-Silva et al., 2014)
907R	CCCCGTCAATTCATTTGAGTTT	16S DNAr - bacteria	(Z. Yu & Morrison, 2004)
341F-GC	CCTACGGGAGGCAGCAG	16S DNAr - bacteria	(Muyzer, de Waal, & Uitterlinden, 1993)
JM76F	GAGCTGAATTAGG(G/A)ACTCCAGG	Citocromo oxidasa I - Insecta	(Rod N. Nagoshi & Meagher, 2004a)(R N Nagoshi & Meagher, 2003)
JM77R	ATCACCTCC(A/T)CCTGCAGGATC	Citocromo oxidasa I - Insecta	(R N Nagoshi & Meagher, 2003)
FR a	TTTTACACCGGTCAACGA	Citocromo oxidasa I - Insecta	(R N Nagoshi & Meagher, 2003)
FR 2	GACATAGAAGAG- CACGTTT	Citocromo oxidasa I - Insecta	(R N Nagoshi & Meagher, 2003)

5.5.3 Identificación taxonómica de aislamientos bacterianos mediante la amplificación del DNAr 16S

Se empleó una lisis térmica de los aislamientos seleccionados después de la caracterización molecular mediante el análisis de ITS para la amplificación por PCR convencional del DNAr 16S usando los primers 27F y 1492R (Tabla 5-3) (Espejo et al., 1998; Moreno, Moy, Daniels, Godfrey, & Cabello, 2006). Los productos de PCR se evaluaron en geles de agarosa al 1% teñidos con EZ-VISION® (Amresco,

U.S.A) según las recomendaciones del fabricante, para posteriormente ser enviados a secuenciar en MacroGen© (Korea); los resultados fueron analizados usando BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) (Altschul et al., 1997) y el proyecto de base de datos ribosomal (RDP). Los Alineamientos obtenidos fueron realizados usando la herramienta Clustal W del programa Bioedit y los arboles filogenéticos construidos usando el programa (MEGA 7.0) (Tamura et al., 2011; Tamura, Dudley, Nei, & Kumar, 2007).

5.6 Técnicas microbiológicas cultivo independiente

Luego de obtener el DNA total de cada muestra analizada, se procedió a hacer una amplificación de la región intergénica del DNAr 16S – 23S (ITS) y una amplificación del DNAr 16S, siguiendo los pasos descritos anteriormente en los apartados 5.5.2 y 5.5.3.

5.6.1 Electroforesis en Gel con gradiente de Temperatura (TTGE)

Las muestras de DNA total fueron empleadas en la amplificación del DNAr 16S entre las regiones V3 - V6 utilizando los primers 341F-(GC) y 907R (Tabla 5-3), depurando una sola muestra debido a la baja concentración de DNA que esta presentó; obteniéndose fragmentos de 586 bp. La electroforesis fue llevada a cabo utilizando el 'DCode Universal Mutation Detection System' (BioRad, U.S.A) siguiendo las instrucciones del fabricante. El gel de poliacrilamida se preparó al 6% V/V y Urea 6M donde se cargaron aproximadamente 1000ng/ul de producto de PCR mezclado en una relación 1:1 V/V con el buffer de carga DNAloding 1X. El buffer de corrida (TAE 1.25X) fue preparado usando Tris base 2M, Ácido acético glacial 1M y EDTA 50mM pH 8.0 en un volumen total de 7000ml. Las condiciones de la electroforesis fueron 55V durante 900 minutos con una temperatura inicial de 66°C, una temperatura final de 69°C y una rampa de temperatura (Ramp R/R) de 0.2°C. El gel fue teñido usando una mezcla de buffer de corrido y GelGreen™ 0.66X. Los controles experimentales usados corresponden a dos cepas bacterianas de referencia (*E. coli* y *B. cereus*).

Luego de la revelación de los geles, se procedió a hacer un conteo y rotulación de las bandas observadas para luego ser cortadas y separadas individualmente con el fin de eluir el amplicon en 20µL de H₂O de ultra pura. Dicha elución fue usada para una reamplificación de la región V3 - V6 del DNAr 16S utilizando los primers 341F y 907R (Tabla 5-3). Los productos de PCR fueron purificados y enviados a secuenciar en MacroGen© (Korea); los resultados obtenidos fueron analizados tal como se describe en el apartado 5.5.3 de este estudio.

5.6.2 Secuenciación masiva de nueva generación (NGS) de fracción de DNA total del tracto intestinal

La calidad y concentración del DNA obtenido fue previamente evaluada como condición para la secuenciación masiva de alto rendimiento, las muestras fueron enviadas a un Centro de secuenciación Genómica donde se realizó un secuenciamiento de la región hipervariable V1-V2 del DNAr 16S usando la plataforma MiSeq Illumina con los primers 27F y 338R (Tabla 5-3) y las librerías de secuenciación se construyeron utilizando la tecnología “paired-end”. El análisis fue realizado de acuerdo al flujo de trabajo propuesto en el paquete Qiime versión 1.9.1 (Caporaso et al., 2010). Las secuencias quiméricas fueron identificadas y extraídas de los datos, utilizando el programa ‘Usearch 6.1’ (R. Edgar, Haas, Clemente, Quince, & Knight, 2011). La asignación taxonómica se realizó a través de la opción “Open-reference OTU picking” utilizando el algoritmo ‘UCLUST’ (R. C. Edgar, 2010). Las secuencias con más del 97% de similitud fueron agrupadas en unidades taxonómicas operativas (OTUs). Las secuencias centroides representativas de cada OTU fueron utilizadas para hacer el alineamiento contra la base de datos SILVA 132 (version 132, liberada el 13 de diciembre de 2017) usando el clasificador: Ribosomal Data Project (RDP) (R. C. Edgar, 2010).

Para estimar la riqueza y diversidad de especies en las comunidades, se utilizó e implementó un análisis basado en OTUs utilizando tanto el paquete de software QIIME como el paquete Phyloseq R (Caporaso et al., 2010). Basado en la asignación OTU, este script de flujo de trabajo QIIME calculó mediciones de diversidad alfa y generó gráficos de rarefacción. El envase de Phyloseq R se utilizó

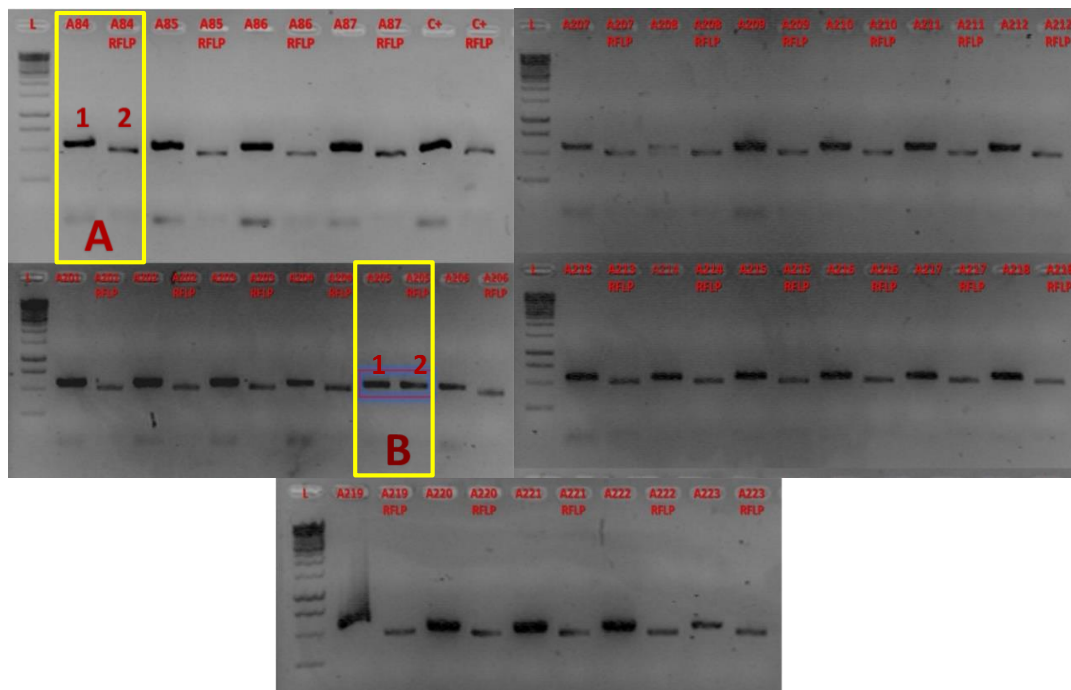
para producir gráficos que representaban la abundancia, la diversidad (incluyendo el índice de diversidad de Shannon, las especies observadas, chao1 y Simpson). Se analizó la diversidad entre todas las comunidades (diversidad beta) mediante la generación de cálculos Unifrac tanto en la versión ponderada como en la no ponderada. Este parámetro, además de medir las diferencias entre dos colecciones de secuencias como la cantidad de historia evolutiva única de cada una de ellas, explica las diferencias en las abundancias relativas (Caporaso et al., 2010). Utilizando Phyloseq, se produjeron dendrogramas adicionales a partir de estos cálculos. Estas parcelas también permitieron comparar las diferencias y similitudes entre las comunidades entre todas las muestras. Todas las OTUs clasificadas como atribuidas a secuencias ribosomales de Archaea o de mitocondrias eucariotas o plásticas presentes y amplificadas en el ADN metagenómico fueron eliminadas y no se utilizaron en análisis posteriores, ya que el propósito de este estudio fue centrarse en la composición del microbioma eubacteriano.

6. Resultados

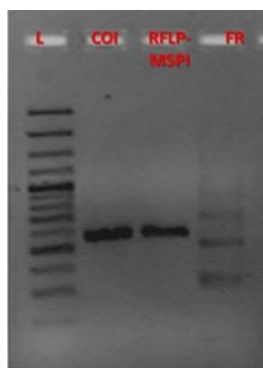
6.1 Identificación de biotipos de *S. frugiperda*

La amplificación de la región COI del DNA mitocondrial y su posterior digestión con la enzima MSPI, permitió observar que, de las 28 larvas analizadas en este estudio, 27 pertenecen al biotipo maíz (figura 6-1) y solo una se determinó como híbrido entre ambos biotipos (muestra A205) (Figura 6-2) confirmado gracias a la amplificación de la región nuclear FR.

Figura 6-1: Electroforesis en gel de Agarosa de PCR-RFLP de la región COI⁵



⁵ Amplificación del gen COI (1) y su tratamiento con la enzima de restricción MSPI (2) a partir del DNA total obtenido de las larvas de *S. frugiperda*. A: Biotipo Maiz. B: Híbrido entre ambos biotipos.

Figura 6-2: Electroforesis en gel de Agarosa de amplicones de la muestra 'A205'⁶

6.2 Análisis cultivo dependientes

Un total de 14 muestras intestinales con un peso promedio de 0.11g fueron empleadas para la obtención de cultivos bacterianos y su subsiguiente caracterización macro y microscópica (Tabla 6-1).

Tabla 6-1: Características gravimétricas de las larvas⁷

Muestra	peso larva (g)	longitud larva (cm)	longitud intestino (cm)	peso intestino (g)	Temporada de muestreo
AM001	0.39	3.2	2.4	0.08	Season 1
AM002	0.31	2.6	2	0.08	Season 1
AM003	0.24	3.4	1.4	0.05	Season 1
AM201	0.33	3.1	2.1	0.12	Season 2
AM202	0.42	3	2	0.08	Season 2
AM203	0.46	3.2	2.5	0.18	Season 2
AM204	0.50	3.6	2.7	0.18	Season 2
AM205	0.35	3.1	2.1	0.1	Season 2
AM206	0.44	3.5	2.7	0.11	Season 2
AM207	0.54	3.3	2.5	0.11	Season 2
AM208	0.37	3	2.4	0.09	Season 2
AM209	0.43	1.49	2.1	0.15	Season 2
AM210	0.28	1.45	2	0.1	Season 2
AM213	0.48	1.46	2.2	0.13	Season 2

⁶L: Ladder 1Kb. **COI:** Amplificación del gen COI. **RFLP-MSPI:** tratamiento por parte de la enzima de restricción MSPI en la amplificación del gen COI. **FR:** Amplificación de la región nuclear FR a partir del DNA total de la muestra "A205"

⁷Características gravimétricas de las larvas procesadas para los análisis cultivo dependientes. La temporada 1 (Season 1) corresponde a la primera recolecta (marzo de 2017); la temporada 2 (season 2) corresponde a la segunda recolecta (octubre de 2017).

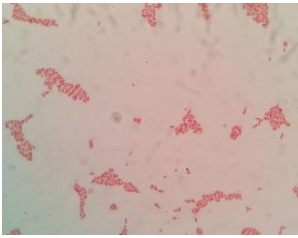


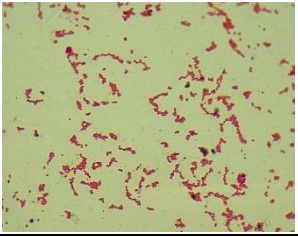

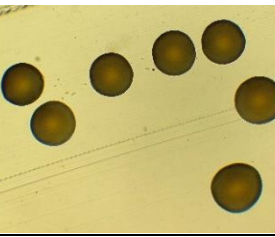
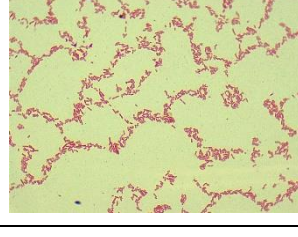

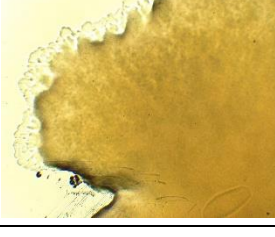
6.2.1 Caracterización microbiológica de aislamientos bacterianos

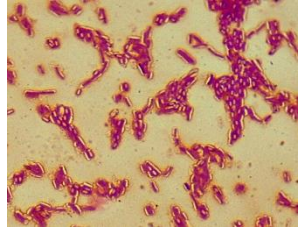


Los recuentos de bacterias aisladas del intestino de *S. frugiperda* variaron entre 6.4×10^8 (UFC/g) (Agar McConkey) y 7.4×10^8 (UFC/g) (Agar Nutritivo) en la primera temporada de colecta, mientras que para la segunda temporada los conteos de UFC aumentaron, con valores de 6×10^8 (UFC/g) (Agar McConkey) y 2.7×10^9 (UFC/g) (Agar Nutritivo) (Anexo A).

Un total de 72 aislamientos fueron purificados a partir de los dos medios de cultivo empleados en este estudio, donde se lograron apreciar diferencias de acuerdo a parámetros como tinción de Gram y morfología en placa luego de realizar una caracterización macro y microscópica de cada aislado (Tabla 6-2).

El 57% de los aislamientos corresponde a bacterias Gram+, mientras que el 39% son bacterias Gram-, solo el 4% restante no tuvo una característica de Gram concluyente (Anexo B).

Tabla 6-2: Características micro y macroscópicas de aislamientos representativos.

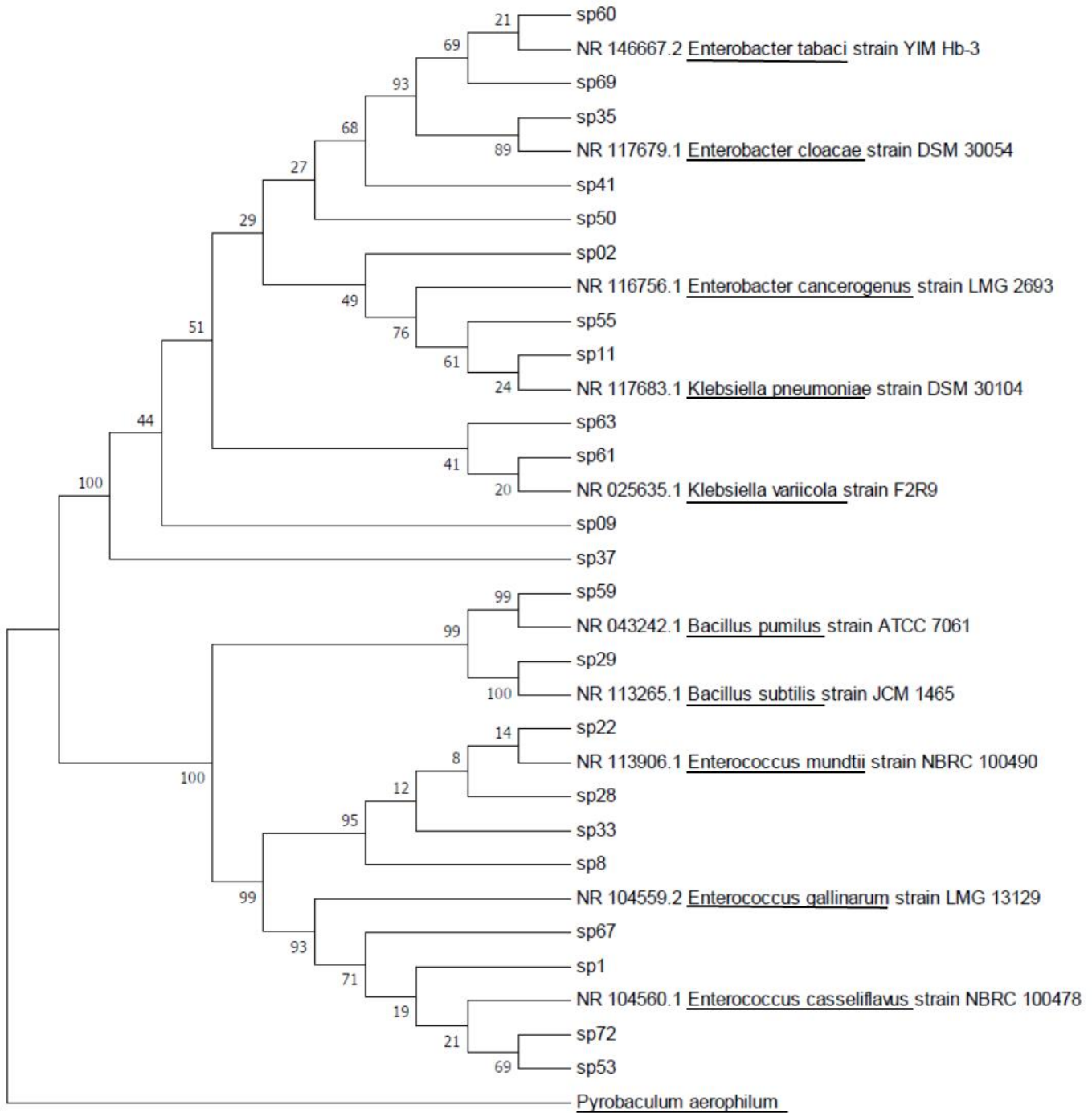
Aislado (Codigo GenBank)	Identidad NCBI-GenBank (organismo relacionado)	Tinción Gram (100X)	Colonia (4X)	Borde (4X)
Sp11 (MK786686)	NR 117683.1 (<i>Klebsiella pneumoniae</i>)			
Sp28 (MK786684)	NR 113906.1 (<i>Enterococcus mundtii</i>)			
Sp35 (MK786681)	NR 117679 (<i>Enterobacter cloacae</i>)			

<p>Sp59 (MK786675)</p>	<p>NR 043242.1 (<i>Bacillus pumilus</i>)</p>			
-----------------------------------	--	---	--	---

6.2.2 Caracterización molecular de aislamientos bacterianos

Después de tener la caracterización morfológica de los aislamientos bacterianos se procedió a hacer un análisis de ITS que se obtuvo al usar el software Gelcompare II®, logrando diferenciar los patrones de bandas generados en geles de poliacrilamida luego de la amplificación de la región espaciadora Intergenica Ribosomal (ITS) comprendida entre el DNAr 16S y DNAr 23S para cada aislado seleccionado. Se generó así un dendrograma que estableció 12 clústeres con un porcentaje de similitud del 75% (Anexo C), se seleccionaron 25 aislamientos representativos de cada clúster para la secuenciación del DNAr 16S.

De las 25 secuencias totales obtenidas, 22 fueron adecuadas para los posteriores análisis ya que presentaban resoluciones (%HQ) mayores al 60%; posteriormente se construyó una filogenia usando el algoritmo Neighbor-Joining con 1000 repeticiones, mediante el software Mega 7.0 (Figura 6-3). Los porcentajes de similitud de las secuencias de referencia estaban entre 98% y 100% respecto al tamaño del fragmento secuenciado y curado que en promedio tenían 1000bp. Se logró relacionar los aislamientos secuenciados con los géneros *Enterococcus*, *Klebsiella*, *Enterobacter* y *Bacillus*, donde se observó la predominancia del Phylum Firmicutes (Tabla 6-3).

Figura 6-3: Filogenia de aislamientos bacterianos secuenciados⁸

⁸Filogenia basada en las secuencias del DNAr 16S de los aislamientos bacterianos y secuencias de referencia. Se usó el algoritmo de Neighbor-Joining con 1000 repeticiones en el software Mega 7.0. La secuencia del DNAr 16S de la archaea *Pyrobaculum aerophilum* fue usada como outgroup para mejorar la topología de la filogenia.

Tabla 6-3: Identificación taxonómica de bacterias aisladas del intestino de *S. frugiperda* biotipo maíz por medio de la secuenciación del DNAr 16S

Origen	Nombre aislado	Identidad Número de acceso -GenBank	Identidad NCBI-GenBank (organismo relacionado) (% Similitud)	Afilación filogenética		
				Phylum	Género	
AM207	Sp59	MK786675	NR 043242.1 (<i>Bacillus pumilus</i>) (100%)	Firmicutes	<i>Bacillus</i> sp	
AM201	Sp29	MK786683	NR 113265.1 (<i>Bacillus subtilis</i>) (100%)		<i>Bacillus</i> sp	
AM001	Sp1	MK786690	NR 104560.1 (<i>Enterococcus casseliflavus</i>) (99%)		<i>Enterococcus</i> sp	
AM001	Sp8	MK786688	NR 113906.1 (<i>Enterococcus mundtii</i>) (99%)		<i>Enterococcus</i> sp	
AM003	Sp22	MK786685	NR 113906.1 (<i>Enterococcus mundtii</i>) (99%)		<i>Enterococcus</i> sp	
AM201	Sp28	MK786684	NR 113906.1 (<i>Enterococcus mundtii</i>) (99%)		<i>Enterococcus</i> sp	
AM201	Sp33	MK786682	NR 113906.1 (<i>Enterococcus mundtii</i>) (99%)		<i>Enterococcus</i> sp	
AM205	Sp53	MK786677	NR 104560.1 (<i>Enterococcus casseliflavus</i>) (99%)		<i>Enterococcus</i> sp	
AM210	Sp67	MK786671	NR 104559.2 (<i>Enterococcus gallinarum</i>) (99%)		<i>Enterococcus</i> sp	
AM213	Sp72	MK786669	NR 104560.1 (<i>Enterococcus casseliflavus</i>) (99%)		<i>Enterococcus</i> sp	
AM202	Sp35	MK786681	NR 117679 (<i>Enterobacter cloacae</i>) (100%)		Proteobacteria	<i>Enterobacter</i> sp
AM203	Sp41	MK786679	NR 117679 (<i>Enterobacter cloacae</i>) (98%)			<i>Enterobacter</i> sp
AM205	Sp50	MK786678	NR 117679 (<i>Enterobacter cloacae</i>) (98%)	<i>Enterobacter</i> sp		
AM210	Sp69	MK786670	NR 156667.2 (<i>Enterobacter tabaci</i>) (99%)	<i>Enterobacter</i> sp		
AM002	Sp9	MK786687	NR 117679 (<i>Enterobacter cloacae</i>) (98%)	<i>Enterobacter</i> sp		
AM207	Sp60	MK786674	NR 156667.2 (<i>Enterobacter tabaci</i>) (100%)	<i>Enterobacter</i> sp		
AM002	Sp11	MK786686	NR 117683.1 (<i>Klebsiella pneumoniae</i>) (99%)	<i>Klebsiella</i> sp		
AM001	Sp2	MK786689	NR 117683.1 (<i>Klebsiella pneumoniae</i>) (99%)	<i>Klebsiella</i> sp		
AM202	Sp37	MK786680	NR 025635.1 (<i>Klebsiella variicola</i>) (99%)	<i>Klebsiella</i> sp		
AM206	Sp55	MK786676	NR 117683.1 (<i>Klebsiella pneumoniae</i>) (99%)	<i>Klebsiella</i> sp		
AM209	Sp63	MK786672	NR 025635.1 (<i>Klebsiella variicola</i>) (99%)	<i>Klebsiella</i> sp		
AM208	Sp61	MK786673	NR 025635.1 (<i>Klebsiella variicola</i>) (99%)	<i>Klebsiella</i> sp		

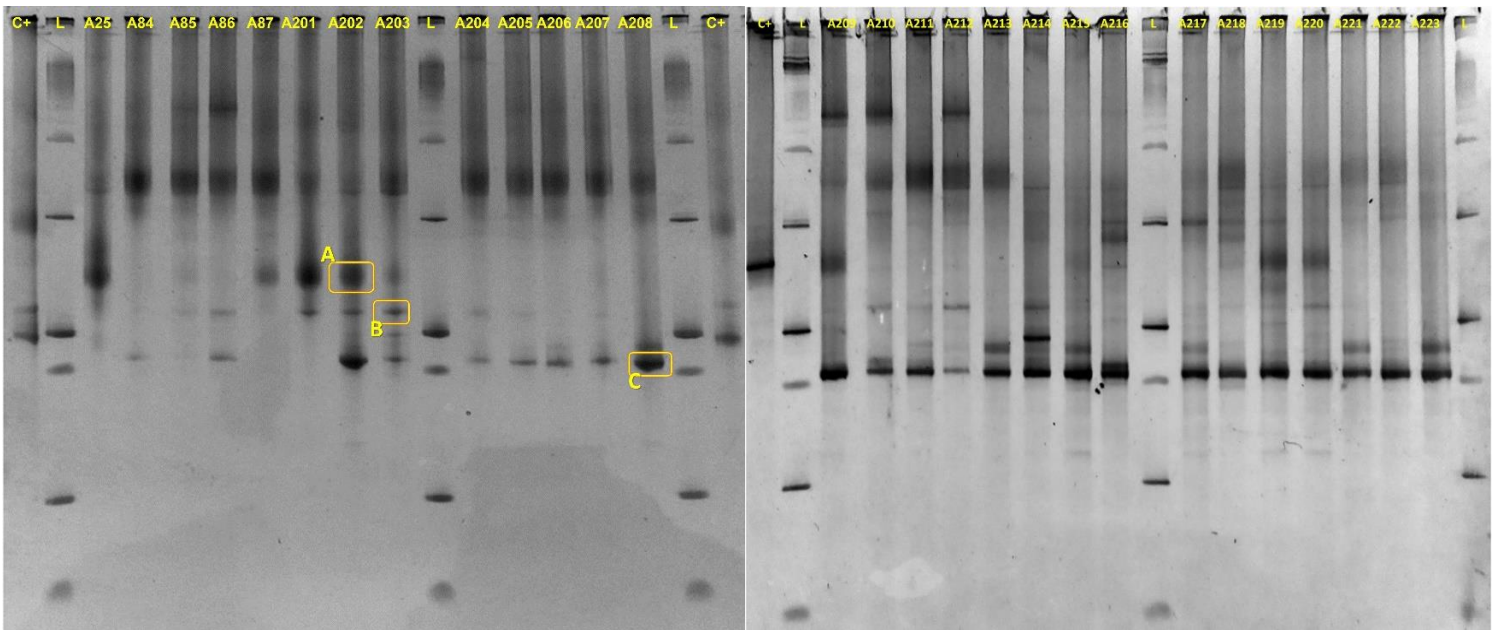
6.3 Análisis cultivo independiente

Un total de 28 muestras intestinales (incluyendo las 14 muestras intestinales analizadas por los métodos cultivo dependientes) fueron sometidas a una extracción de DNA total y se procedió a realizar un análisis de “huella genética” mediante la amplificación de la región ITS. El dendrograma generado (Anexo D) mostro una similitud alta (~80%) entre las muestras.

6.3.1 Análisis de los perfiles de Electroforesis en gel de gradiente de temperatura (TTGE)

La evaluación de la diversidad de las poblaciones bacterianas asociadas a las muestras intestinales de las larvas de *S. frugiperda* biotipo maíz, se llevó a cabo inicialmente mediante la técnica TTGE, la cual permitió separar los fragmentos del DNAr 16S de un tamaño equivalente a 585bp (Figura 6-4). Los perfiles de bandeo fueron evaluados a través del software GelcomparII (Applied Maths TX, USA) observándose pocas diferencias en los patrones de bandeo entre las 28 muestras.

Figura 6-4: Electroforesis en gel de gradiente de temperatura (TTGE)⁹

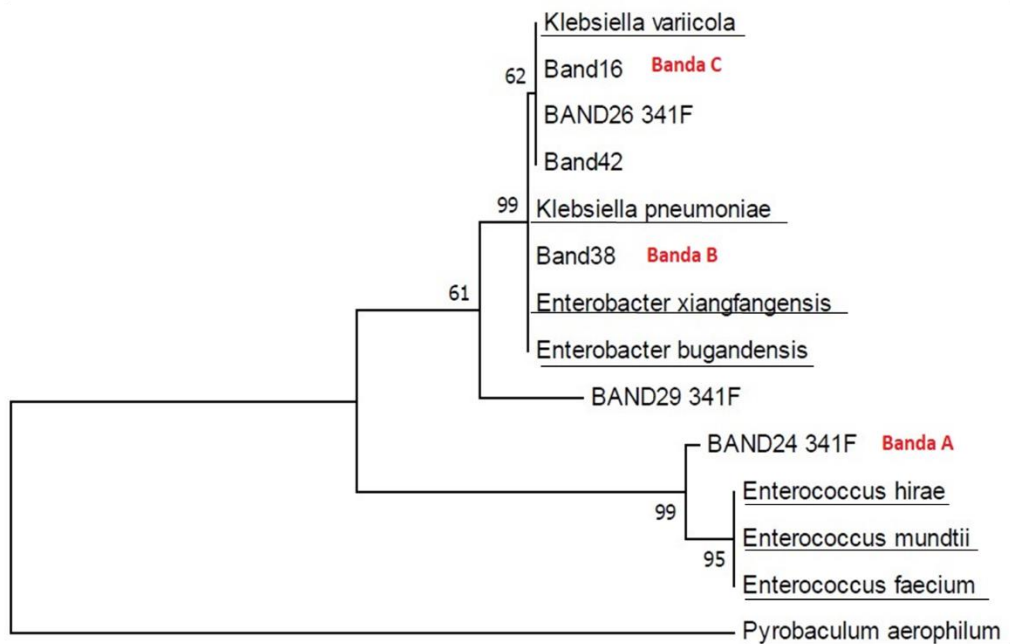


Los patrones de las bandas obtenidos por la técnica de TTGE fueron agrupados en 8 clústeres por medio del método UPGMA para la construcción de un dendrograma (Anexo E), el cual no mostro diferencias significativas entre las muestras y sus respectivos patrones de bandeo.

⁹Patrones de bandeo en geles de TTGE de los productos de amplificación del DNAr 16S entre la región variable V3-V6 de todas las muestras de DNA total obtenido del intestino de larvas de *S. frugiperda*. **L**: marcador de peso 100bp. **C+**: controles positivos correspondientes a dos sepas de referencia (*B. cereus* y *E. coli*)

Las bandas con patrones únicos de migración respecto al marcador de peso establecido (100bp) y de mayor intensidad se escindieron por duplicado cuando fue posible. El DNA obtenido como resultado de la elución de 33 bandas se utilizó para ser re-amplificado y enviado a secuenciar. De las secuencias obtenidas 7 fueron editadas exitosamente utilizando el programa BioEdit, las restantes secuencias presentaron electroferogramas con ruidos excesivos y difíciles de alinear correctamente con secuencias registradas en el GenBank. Una vez editadas las secuencias de nucleótidos, se sometieron al programa de búsqueda BLASTn (Altschul et al., 1997; “Nucleotide BLAST - NCBI,” n.d.) y al RDP (Ribosomal Database Project) (“Sequence Match - RDP,” n.d.) para establecer sus respectivas afiliaciones filogenéticas. Con el propósito de probar la identidad de las secuencias se llevó a cabo la construcción de una filogenia usando el método de Neighbor-Joining y el estimador de distancias Jukes-Cantor usando para esto alineamientos múltiples de las secuencias de referencia (Figura 6-5).

Figura 6-5: Filogenia de secuencias re-amplificadas de TTGE¹⁰



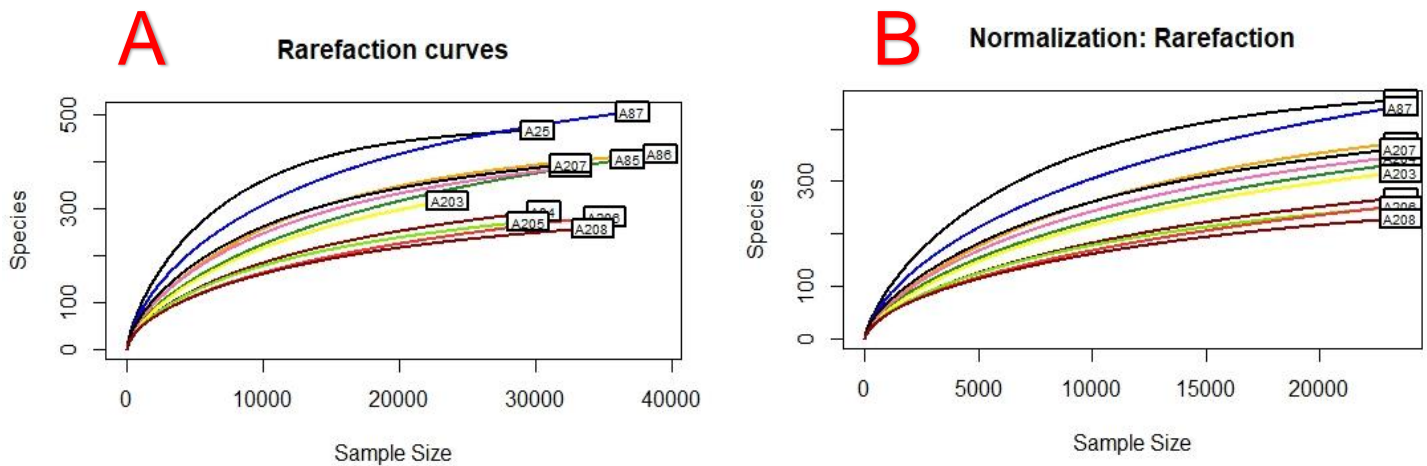
¹⁰Filogenia de las secuencias parciales del DNAr 16S correspondientes a las bandas obtenidas por TTGE. La secuencia del DNAr 16S de la archaea *Pyrobaculum aerophilum* fue usada como outgroup para mejorar la topología de la filogenia.

En ese orden de ideas los resultados de los análisis de secuencias obtenidas de los re-amplificados de la secuencia parcial de DNAr 16S (región V3-V6) revelaron una alta similitud con secuencias de los géneros *Enterococcus* sp., *Enterobacter* sp., y *Klebsiella* sp. correspondientes a las bandas A, B y C respectivamente de la 'figura 6-4'.

6.3.2 Análisis de secuenciación masiva del DNAr 16S mediante Illumina-MiSeq

La secuenciación arrojó reads de 250 nucleótidos en promedio; estos datos fueron tratados en busca de depurar las secuencias quiméricas obteniéndose 391.087 reads agrupados en 7093 OTUs diferentes con un 97% de similitud. Un análisis de rarefacción mostró que la profundidad de cada muestra intestinal respecto al número de reads fue adecuada para los análisis de diversidad alfa y beta (Figura 6-6); además se logró evidenciar que este análisis logra explicar la riqueza bacteriana de cada muestra analizada para *S. frugiperda* biotipo maíz.

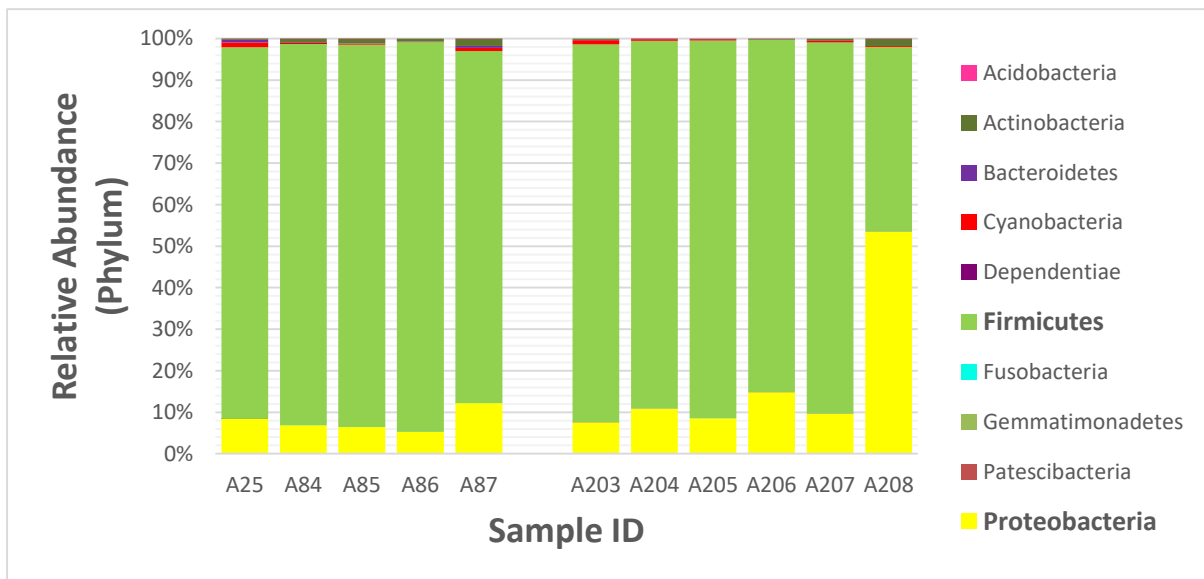
Figura 6-6: Curvas de rarefacción¹¹



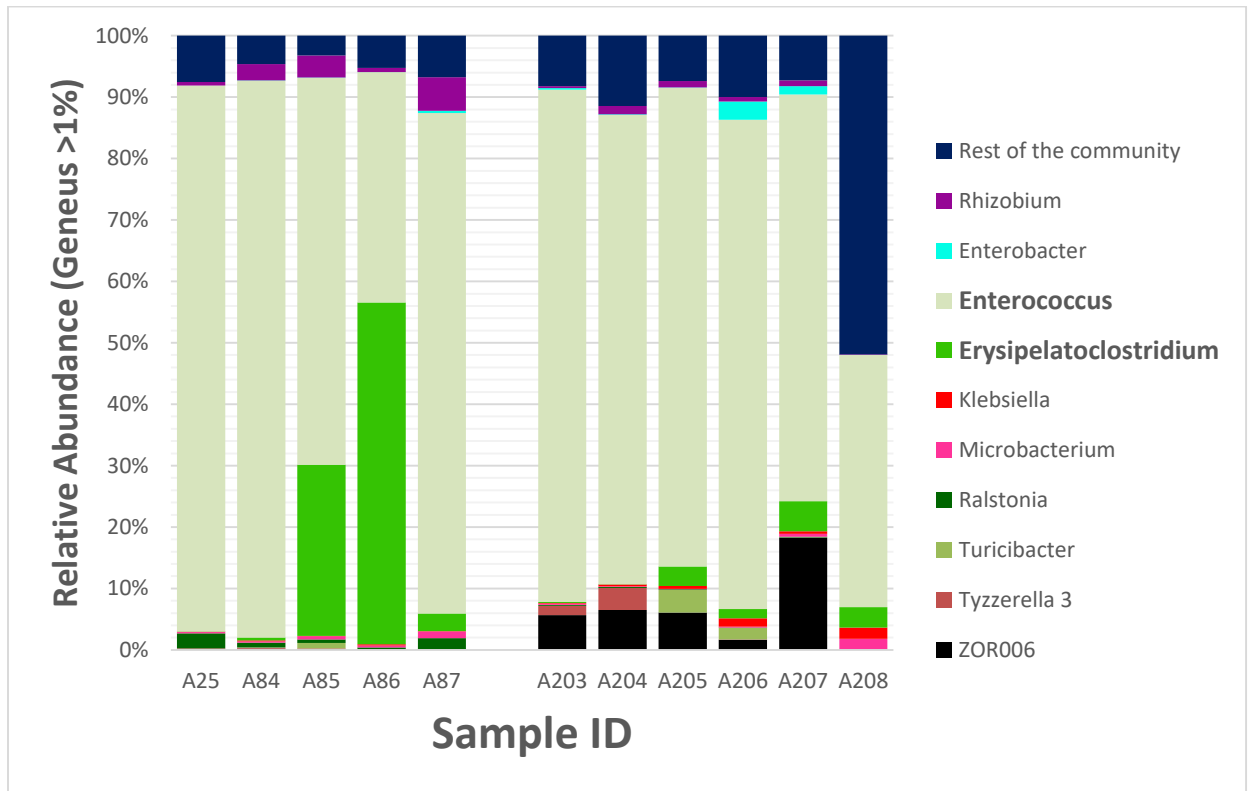
¹¹**A:** Curvas de rarefacción para cada muestra intestinal de *S. frugiperda* mostrando la profundidad respecto al número de reads por muestra. **B:** Curvas de rarefacción normalizadas, usando la muestra con menos reads (A203) como corte de los datos; los datos normalizados fueron empleados en los subsiguientes análisis de diversidad. Las secuencias analizadas corresponden a secuencias parciales del DNAr 16S (250pb).

Firmicutes y Proteobacteria fueron los Phyla más abundantes en todas las muestras, donde Firmicutes corresponde, en la mayoría de los casos, al 90% aproximadamente del total de las comunidades bacterianas presentes, exceptuando la muestra A208 donde el Phylum Proteobacteria posee el 53% del total de las comunidades (Figura 6-7). *Enterococcus* fue el género más abundante en todas las muestras analizadas (85-90%), excepto la A86 donde *Erysipelatoclostridium* fue el más abundante con casi un 55% del total de la comunidad; las comunidades agrupadas como “Rest of the community” corresponden a géneros con menos del 1% de abundancia relativa dentro del total (Figura 6-8). Se logra observar una diferencia respecto a la temporada de colecta dentro del core community, donde el género *Erysipelatoclostridium* es más abundante para la temporada 1 de recolecta decayendo su abundancia en la siguiente temporada; paralelamente se puede ver como el filotipo ZOR006 toma un porcentaje considerable para la temporada 2 al igual que el género *Tyzerella* 3 comparado con la temporada 1.

Figura 6-7: Histograma de Phylum bacteriano¹²



¹²Abundancia relativa (%) de Phyla bacterianos relacionados con las OTUs encontrados en once muestras intestinales de larvas silvestres de *S. frugiperda*; el análisis se hizo a partir de secuencias pertenecientes a la región V4 del DNAr 16S.

Figura 6-8: Histograma de Genero bacteriano¹³

Los índices de diversidad α no mostraron una diferencia estadísticamente significativa, además, la riqueza observada es mayor en la temporada 1 de colecta al igual que los índices de diversidad Chao1 y Shannon; el indicador de Simpson muestra un comportamiento similar (Figura 6-9). El análisis CAP (30.6%) y PCoA muestra una agrupación muy marcada entre las muestras según la microbiota relacionadas a la época de colecta, indicando que las diferencias que se puedan encontrar en las comunidades bacterianas si está directamente influenciadas en un 30% aproximadamente por las condiciones ambientales en cada temporada de colecta (Figura 6-10).

¹³Abundancia relativa (%) de Géneros bacterianos relacionados con las OTUs encontrados en once muestras intestinales de larvas silvestres de *S. frugiperda*; el análisis se hizo a partir de secuencias pertenecientes a la región V4 del DNAr 16S.

Figura 6-9: Índices de alfa diversidad¹⁴

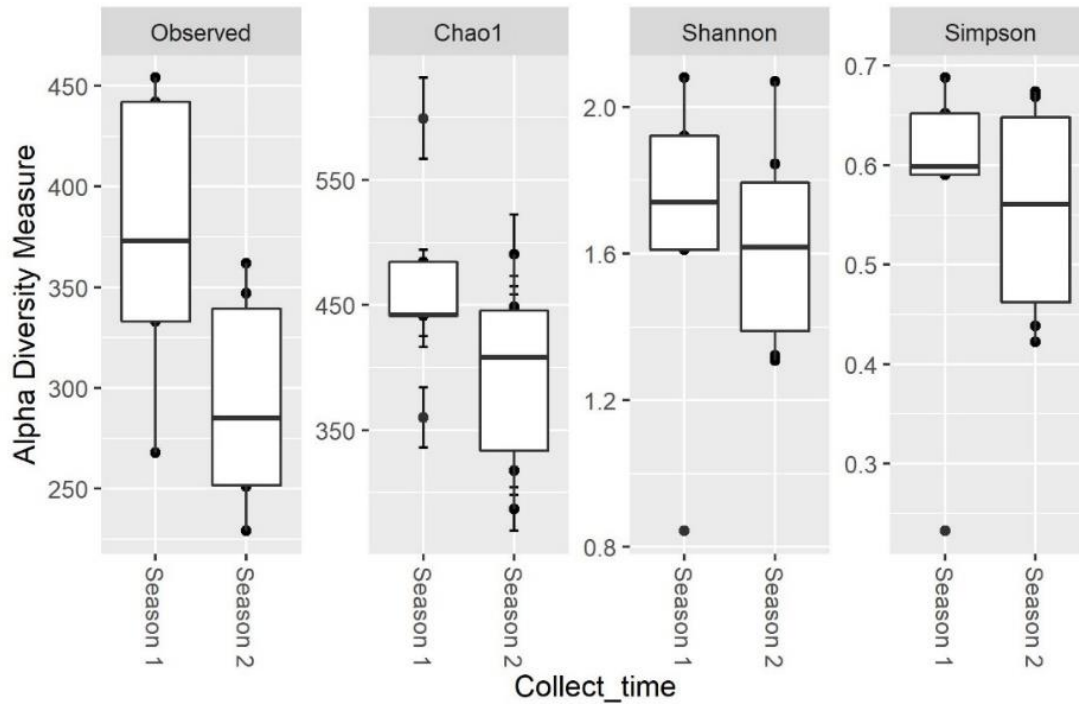
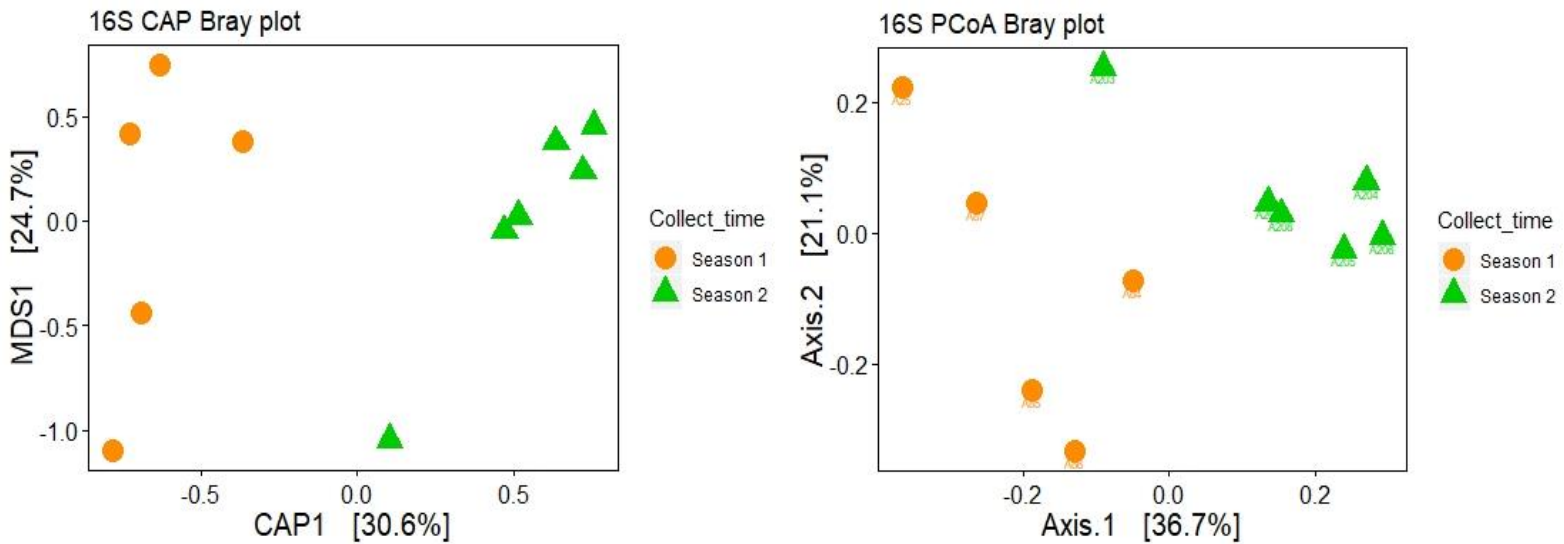


Figura 6-10: Análisis de coordenadas principales PcoA y CAP¹⁵



¹⁴Índices de alfa diversidad de las 11 muestras intestinales de *S. frugiperda* respecto a la temporada de colecta

¹⁵Análisis de coordenadas principales (PcoA) y CAP obtenido a partir de datos normalizados basados en el análisis de dis-similaridad Bray-Curtis para las once muestras intestinales de larvas de *S. frugiperda*.

7. Discusión

En la actualidad, el estudio de la microbiota intestinal asociada a insectos plaga ha venido creciendo ya que se considera una nueva alternativa en la búsqueda de moléculas que ayuden a la formulación de compuestos para enfrentar la problemática concerniente al control de las plagas polífagas en diversos cultivos de interés alimentario y económico. Específicamente para *S. frugiperda*, los avances en el conocimiento de su dinámica dentro de los ecosistemas y cultivos agrarios va desde la observación ecológica y comportamental hasta el análisis genético de la especie, el cual ha mostrado explícitamente la separación en biotipos. La biotipificación de *S. frugiperda* ha sido probada gracias a diferencias genéticas entre individuos de la misma especie, que se deben principalmente a la adaptación al alimento que consumen, divergiendo hacia un proceso de sub-especiación, además, parámetros comportamentales (reproducción, alimentación) y morfológicos (morfometría alar en los adultos) también han sido diferenciados entre los dos biotipos (maíz y arroz) de ésta especie (Cañas-Hoyos et al., 2014; Cano Calle, 2015; Lobo Hernandez, 2011; Saldamando & Vélez-Arango, 2010b). En este estudio, inicialmente fue realizado un análisis taxonómico a las larvas silvestres de *S. frugiperda* colectadas en cultivos de maíz, usando la metodología PCR-RFLP, con el objetivo de corroborar el biotipo esperado de los individuos colectados en estos cultivos. Los resultados encontrados corroboraron el biotipo de las larvas con el alimento o planta hospedera (maíz); adicionalmente, se determinó con éxito el biotipo para todos los individuos procesados en este estudio a partir del DNA extraído, dejando como novedad, la presencia de un individuo híbrido entre ambos biotipos (Muestra 'A205'), que se determinó a partir de la amplificación del gen COI y la no digestión del producto amplificado por la enzima MSPI, conjuntamente con el patrón de bandeo mostrado en la amplificación de la región nuclear FR para

dicha muestra como había sido previamente reportado (Cano Calle, 2015); estudios al respecto muestran que, la probabilidad de la presencia de éste individuo en cultivos de maíz es muy baja, pero debido a la naturaleza polífaga pueden encontrarse en una pequeña proporción, sin embargo, los cruces entre machos pertenecientes al biotipo maíz con hembras pertenecientes al biotipo arroz (el caso recíproco no se ha evidenciado) se pueden presentar al existir una diversidad amplia de cultivos o plantas hospederas en una zona específica (Cañas-Hoyos et al., 2017).

En las últimas décadas, varios autores han sugerido el papel crucial de la microbiota intestinal en el desarrollo de los insectos ya que esta se relaciona con aspectos cruciales como inmunidad, reproducción, digestión, nutrición, producción de metabolitos como feromonas, moléculas antimicrobianas entre otros (Dillon & Dillon, 2004). En Lepidópteros como *Plodia interpunctella*, se ha demostrado que la microbiota intestinal es importante para la respuesta del insecto al control biológico donde se usan endotoxinas de 'Bt'; adicionalmente se ha demostrado que cambios en la dinámica poblacional de la microbiota intestinal pueden estar asociados a cambios en la expresión de genes asociados a la respuesta inmune del hospedero (Orozco-Flores et al., 2017). Otros estudios indican la relación entre microbiota y resistencia a insecticidas en *S. frugiperda* y *Plutella xylostella*, en donde aislamientos del género *Enterococcus* sp. (Firmicutes), *Enterobacter* sp. (Proteobacteria), y *Serratia* sp. (Proteobacteria) tienen un rol principal en la detoxificación y en la modulación de la respuesta inmune del hospedero (Almeida et al., 2017a; Xia et al., 2018)

Los métodos que se emplean actualmente para el análisis de microbiota abarcan dos tipos de aproximaciones: metodologías dependientes de cultivo y metodologías independientes de cultivo (Silva Bedoya, 2015; Vivero et al., 2016); en el caso de la implementación de cultivos microbiológicos, se tienen ventajas respecto a la obtención de aislamientos puros, que permiten observar características morfológicas en placa, así como la aplicación de pruebas metabólicas a dichos aislamientos con diversos fines biotecnológicos. Si bien las técnicas que dependen de cultivos no logran abarcar la diversidad total de una muestra problema, ya que

se estima que solo alrededor del 5% de las bacterias son cultivables bajo las condiciones de laboratorio actuales (Dillon & Dillon, 2004; Tang et al., 2012), si tienen una profundidad adecuada para arrojar resultados concluyentes en la identificación de un género y en muchos casos de la especie bacteriana; otra falencia que presentan estos métodos son la elección del medio de cultivo óptimo, el cual dependerá de la naturaleza de la muestra tratada y estará sujeto a aspectos técnicos controlables por el investigador. En este estudio se seleccionaron dos medios de cultivo con el fin de abarcar la mayor cantidad de morfotipos bacterianos posibles y su posterior purificación; se usó el Agar Nutritivo como medio de cultivo no selectivo ni diferencial para bacterias, y el medio de cultivo McConkey como medio selectivo y diferencial para bacterias Gram negativas entéricas, ya que en este caso se trataba de bacterias provenientes del intestino de *S. frugiperda*.

Los recuentos bacterianos y por ende las unidades formadoras de colonia (UFC/g) aumentaron entre las dos temporadas de colecta, donde el aumento en las precipitaciones y el descenso en la temperatura ambiental son los factores diferenciadores más marcados, planteando así, la posible influencia de cambios climáticos en la dinámica bacteriana asociada al intestino de *S. frugiperda*.

Un total de 72 aislamientos puros se lograron luego de la depuración según las características macro y microscópicas de los cultivos, se seleccionaron 25 aislamientos con características morfológicas y perfil de bandas diferenciales en el análisis de ITS para ser identificados taxonómicamente a partir de la secuenciación del DNAr 16S. Bajo las condiciones de este estudio, los aislamientos bacterianos secuenciados mostraron una asociación taxonómica con los Phylum Firmicutes y Proteobacteria, relacionados con los géneros *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Enterococcus* y *Bacillus* previamente reportados para otros lepidópteros; debido a que algunas secuencias parciales del DNAr 16S no fueron lo suficientemente extensas, sólo 6 de las 22 secuencias pudieron confirmar la especie, evidenciando una aproximación más cercana al porcentaje de similitud de 100%. Es de aclarar que 3 secuencias de los 25 totales, no presentaron resoluciones (%HQ) aceptables para los posteriores análisis, por lo que debieron ser descartadas.

Como se mencionó anteriormente, una característica asociada a *S. frugiperda* es la tolerancia que este insecto posee respecto a ciertos pesticidas químicos y toxinas provenientes de *Bacillus turingensis* (Ríos-Díez et al., 2012). Se ha mostrado que bacterias aisladas del intestino de las larvas de *S. frugiperda* poseen la capacidad de degradar moléculas tóxicas para el huésped además de la relación directa que existe entre la respuesta inmunes del insecto con la microbiota intestinal residente, explicando la visible resistencia del insecto a diversos agroquímicos y pesticidas (Wu et al., 2016). Asimismo se ha mostrado el potencial biorremediador de cepas del género *Enterococcus* provenientes del intestino de *S. frugiperda* respecto a ciertos plaguicidas como 'lambda-cihalotrina', 'deltametrina', 'clorpirifós etílico', 'espinosad' y 'lufenuron', planteando la influencia directa de este tipo de bacterias presentes en el intestino de larva con la metabolización de los plaguicidas por parte de la misma (Almeida et al., 2017b). A futuro, se hace necesario evaluar de los aislamientos obtenidos, la capacidad de biorremediación de moléculas recalcitrantes y degradación de insecticidas de uso común en el cultivo de maíz en Colombia.

Una de las aproximaciones cultivo independiente en este estudio, consistió en el análisis de fragmentos del DNAr 16S usando una técnica de electroforesis de gradiente en gel 'TTGE' complementada con la secuenciación masiva de nueva generación, metodologías que partían de la obtención de DNA total a partir del intestino de larvas silvestres de *S. frugiperda*. En este estudio se usaron larvas de último instar (L4), que, por su tamaño intestinal (~2 cm), permitieron la extracción de DNA y análisis individual para todas las metodologías usadas. La ventaja de estas técnicas se basa en el análisis de un mayor número de muestras y la obtención de una mayor cantidad de secuencias para ser analizadas, y en este caso específico, una información más completa sobre la diversidad bacteriana sería obtenida respecto a la población bacteriana reportada a partir de los cultivos bacterianos. A pesar de las ventajas de esta aproximación se debe mencionar que la electroforesis en gradiente es de difícil estandarización e implementación práctica y requieren de especial destreza técnica por parte del investigador. A pesar de su costo, el secuenciamiento de nueva generación, ha sido tal vez una de las

herramientas modernas más utilizadas para estudio de la diversidad bacteriana debido al análisis masivo de secuencias, sin embargo, por el corto tamaño de las secuencias arrojadas la identificación taxonómica llega a nivel de género y no de especie. De aquí la importancia de abordar ambos tipos de metodologías en estudios de ecología microbiana.

Dentro de los resultados de este trabajo, se encontró correlación entre la información taxonómica cultivo dependiente e independiente ya que las secuencias parciales de las bandas del TTGE arrojaron la misma información en cuanto a los géneros bacterianos reportados por el análisis cultivo dependiente. Por otra parte, el análisis de la secuenciación masiva del DNAr 16S, reveló que el género más abundante fue *Enterococcus*, siendo este ampliamente reportado para otros lepidópteros como *Spodoptera littoralis*, en donde se destaca que bacterias pertenecientes al género *Enterococcus* son capaces de mantenerse luego de la metamorfosis (Chen et al., 2016); Es importante anotar que en este estudio se logró encontrar una marcada diferencia dentro de las comunidades bacterianas respecto a la temporada en la cual fueron colectadas (season 1 y season 2), donde el género *Erysipelatoclostridium* se ve drásticamente reducido cuando hay un aumento en las precipitaciones (≥ 134 mm) y la caída de $\sim 2^{\circ}\text{C}$ en la temperatura media de la zona de colecta de las larvas, mientras que *Tyzerella* 3 y el filotipo ZOR006 muestran un favorecimiento en su abundancia al presentarse el cambio ambiental entre ambas temporadas de colecta. Si bien fue evidente el cambio de la abundancia relativa de las comunidades bacterianas entre ambas temporadas de colecta, el análisis CAP y PCoA confirmó dicha información, mostrando una clara separación de las muestras respecto a la temporada y explica en un 30% aproximadamente, la influencia de la temporada de colecta en el comportamiento de las comunidades bacterianas dentro del intestino de las larvas, es decir, del total de factores que puedan estar modelando las comunidades bacterianas intestinales para *S. frugiperda*, el 30% de ese modelado o cambio se debe al aumento en las precipitaciones y el descenso en la temperatura del ambiente donde se colectaron las larvas.

Estudios realizados en otras especies de lepidópteros mostraron una presencia muy marcada de los Phylum Firmicutes y Proteobacteria dentro de las comunidades bacterianas asociadas al intestino de los insectos, donde por ejemplo la microbiota intestinal relativa a *S. littoralis* posee una predominancia de bacterias correspondientes al Phylum Firmicutes y más específicamente al género *Enterococcus* (Chen et al., 2016). Otro lepidóptero, *Busseola fusca*, plaga del maíz en el continente Africano, mostro en su microbiota intestinal la predominancia de los géneros *Bacillus*, *Enterococcus* y *Klebsiella* (Snyman, Gupta, Bezuidenhout, Claassens, & van den Berg, 2016). En esta misma línea, *Helicoverpa armigera* mostró que en su intestino se albergan comunidades bacterianas asociadas a los Phylum Firmicutes y Proteobacteria, pero que para este caso la predominancia estaba marcada por bacterias pertenecientes al Phylum Actinobacteria (Ranjith, ManiChellappan, Harish, Girija, & Nazeem, 2016), esto debiéndose quizás a la relación tan marcada que posee la microbiota intestinal con el alimento que consume el insecto, ya que para el caso de *Spodoptera* y *Busseola* las plantas de la familia de las Poaceae, como el maíz, son las preferidas como alimento; no así en el caso de *Helicoverpa armigera*, que si bien es una plaga polífaga, el tomate (*Solanum lycopersicum*) es su principal fuente de alimento. Apoyado en los resultados de este estudio, donde el “core” central bacteriano es congruente con el de otros lepidópteros, y según el comportamiento de los mismos dentro de los cultivos, se puede sugerir que, en general, la diversidad bacteriana de los lepidópteros es baja y que la composición de la microbiota no depende del alimento consumido por el insecto, pero que dicho alimento si tiene una relación directa con la abundancia de las comunidades bacterianas asociadas al intestino de las larvas de *S. frugiperda* (Jones, Mason, Felton, & Hoover, 2019), y que características ambientales tales como temperatura y precipitaciones también poseen una influencia en la abundancia de dichas comunidades, como lo sugiere Gichuhi et al., 2019, que si bien no tuvo en cuenta variables ambientales específicas, si mostro como al cambiar la proveniencia de las larvas (ubicación geográfica) donde varían factores como altura sobre el nivel del mar, temperatura, radiación, precipitación,

entre otras, también varía la abundancia relativa de la comunidad bacteriana asociada al intestino de larvas de *S. frugiperda*.

Una de las primicias para avanzar en el conocimiento general de los lepidópteros, es la implementación de estrategias de control en campo que reduzcan la afectación económica en los cultivos de interés agrario, donde en el caso del género *Spodoptera*, el control exitoso de las especies *S.littoralis*, *S.frugiperda*, *S.litura* y *S.exigua* ha sido reportado a través de la captura masiva, la interrupción del apareamiento y los métodos de atracción y muerte (Guerrero et al., 2014). Por otra parte, el control biológico donde se puede interferir el ciclo de vida de las larvas manipulando su comunidad bacteriana plantea una nueva estrategia que mitigaría el impacto ecológico de la lucha contra la plaga. La alteración de la homeostasis intestinal parece ser una estrategia acertada para el control del insecto. Se ha reportado que la alteración en cuanto a la abundancia de algunos aislamientos intestinales como el caso de *Enterococcus muntii*, deja al insecto sin uno de sus mecanismos naturales de defensa ante patógenos, afectando directamente su ciclo de vida (Shao et al., 2017a).

8. Conclusiones y recomendaciones

8.1 Conclusiones

Los métodos moleculares utilizados en este estudio fueron pertinentes para establecer y corroborar la identificación taxonómica de las larvas silvestres obtenidas en cultivos de maíz.

Las secuencias parciales de las bandas obtenidas por la técnica TTGE se correlacionaron con los géneros bacterianos de los aislamientos cultivados, siendo *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Enterococcus* y *Bacillus* los géneros reportados. Adicionalmente, el análisis NGS, reportó la presencia de estos géneros y la abundancia de *Enterococcus*.

La diversidad bacteriana encontrada en el intestino de *Spodopetra frugiperda* fue baja, siendo esto congruente con lo reportado para otros lepidópteros. Es necesario realizar estudios similares para *Spodopetra frugiperda* biotipo “Arroz” con el fin de comprender la dinámica bacteriana dentro del intestino de este insecto y su relación con el alimento que consumen.

Variaciones de la temperatura y las precipitaciones en la zona de colecta de las larvas pueden tener influencia directa en la abundancia relativa de las comunidades bacterianas presentes en el intestino de *Spodopetra frugiperda*.

8.2 Recomendaciones

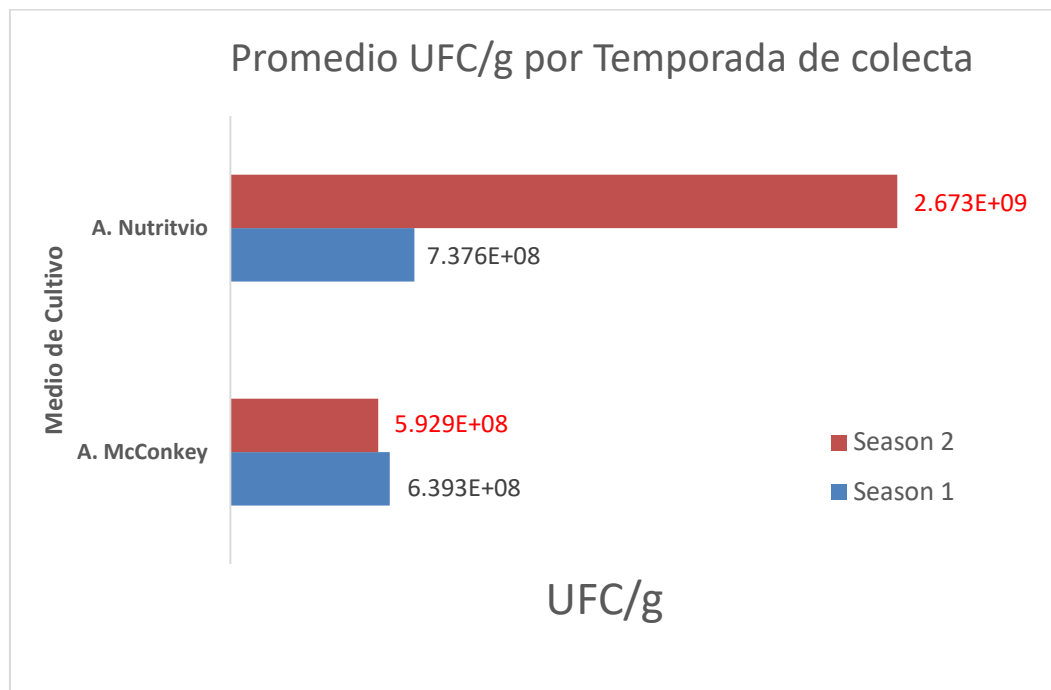
Es de vital importancia para el conocimiento global de la especie *Spodoptera frugiperda*, que también se analice la microbiota intestinal presente en larvas del biotipo arroz de forma similar a la presentada en este estudio.

Partiendo de las correlaciones planteadas en este trabajo, se puede plantear la futura exploración de las actividades enzimáticas de los aislamientos bacterianos obtenidos; además, la implementación de metodologías que busquen esclarecer el papel de bacterias como *Enterococcus munti* de las cuales se tienen reportes sobre la acción antimicrobiana de esta especie bacteriana.

Si bien no se tiene reportes de la presencia de microorganismos diferentes a hongos y bacterias dentro del intestino de lepidópteros, establecer metodologías que describan la presencia de hongos y quizás otros microorganismos dentro del intestino de *S. frugiperda* sería un gran aporte al entendimiento de la dinámica biológica de este insecto.

Anexos

A. Anexo: Número de unidades formadoras de colonia por temporada de colecta

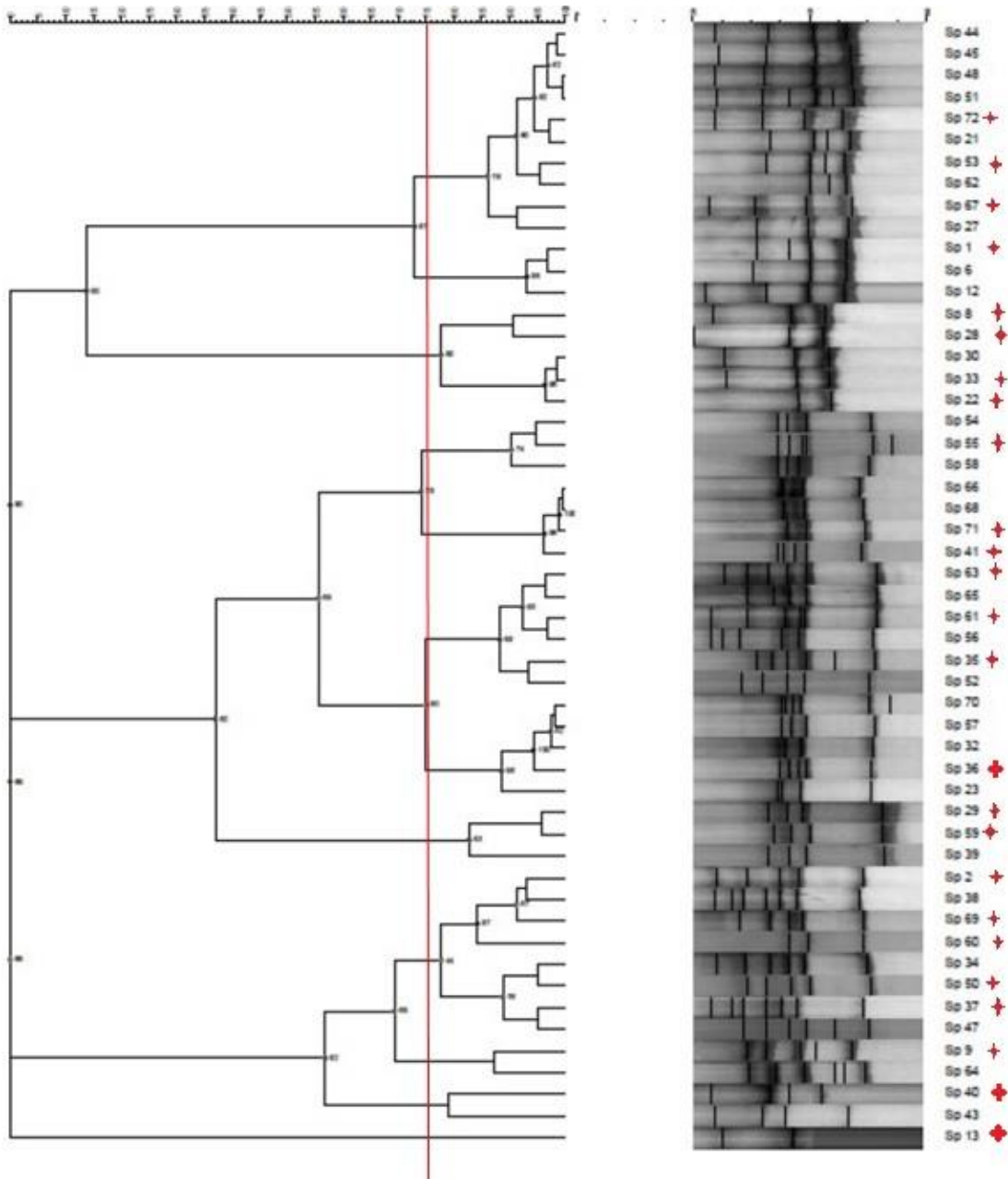


B. Anexo: Caracterización macro y microscópica de los aislamientos obtenidos

Aislado	MORFOLOGIA DE COLONIA					MICROSCOPIA	
	FORMA	ELEVACIÓN	BORDE	TEXTURA	COLOR	GRAM	FORMA
Sp1	puntiforme	plana	entero	lisa	blanco/beige	+	cocos
Sp2	circular	convexa	ondulado	lisa	blanco-beige	-	bacilos
Sp6	puntiforme	plana	entero	lisa	blanca/translúcida	+	cocos
Sp7	puntiforme	plana	entero	lisa	blanca/translúcida	+	cocos
Sp8	puntiforme	plana	entero	lisa	amarillo	+	cocos
Sp9	irregular	plana	rizado	rugosa	beige	-	bacilos
Sp11	circular	convexa	ondulado	lisa	blanco-beige	-	bacilos
Sp12	puntiforme	plana	entero	lisa	blanca/translúcida	+	cocos
Sp13	puntiforme	plana	entero	lisa	amarillo	+	cocos
Sp21	puntiforme	plana	entero	lisa	blanca/translúcida	+	bacilos
Sp22	puntiforme	plana	entero	lisa	amarillo	+	cocos
Sp23	circular	convexa	entero	lisa/cremosa	blanco/beige	+	bacilos
Sp24	circular	convexa	entero	lisa/cremosa	blanco/beige	+	bacilos
Sp25	puntiforme	plana	entero	lisa/cremosa	blanco/beige	+	cocos
SP26	puntiforme	plana	entero	lisa/cremosa	blanco/beige	+	cocos
Sp27	puntiforme	plana	entero	lisa/cremosa	blanco/beige	+	cocos
Sp28	puntiforme	plana	entero	lisa/cremosa	blanco/beige	+	cocos
Sp29	circular	convexa	ondulado	rugosa	blanco/beige	+	bacilos
Sp30	puntiforme	plana	entero	lisa/cremosa	blanco/beige	+	cocos
Sp31	puntiforme	plana	entero	lisa/cremosa	blanco/beige	+	cocos
Sp32	puntiforme	convexa	entero	lisa/cremosa	blanco/beige	N/A	N/A
Sp33	puntiforme	plana	entero	lisa/cremosa	blanco/beige	+	cocos
Sp34	puntiforme	convexa	entero	lisa/cremosa	blanco/beige	+	bacilos
Sp35	irregular	plana	lobulado	lisa/cremosa	beige	-	bacilos
Sp36	circular	convexa	entero	lisa/cremosa	blanco/beige	+	bacilos
Sp37	puntiforme	convexa	entero	lisa/cremosa	blanco/beige	+	bacilos
Sp38	puntiforme	convexa	entero	lisa/cremosa	blanco/beige	+	bacilos
Sp39	irregular	plana	ondulado	rugosa	blanco/beige	+	bacilos
Sp40	puntiforme	convexa	entero	lisa/cremosa	blanco/beige	-	bacilos
Sp41	circular	plana	entero	rugosa	blanco/beige	-	bacilos
Sp42	circular	plana	entero	rugosa	blanco/beige	+	bacilos
Sp43	circular	convexa	entero	lisa/cremosa	blanco/beige	N/A	N/A
Sp44	puntiforme	plana	entero	lisa/cremosa	blanco/beige	+	cocos

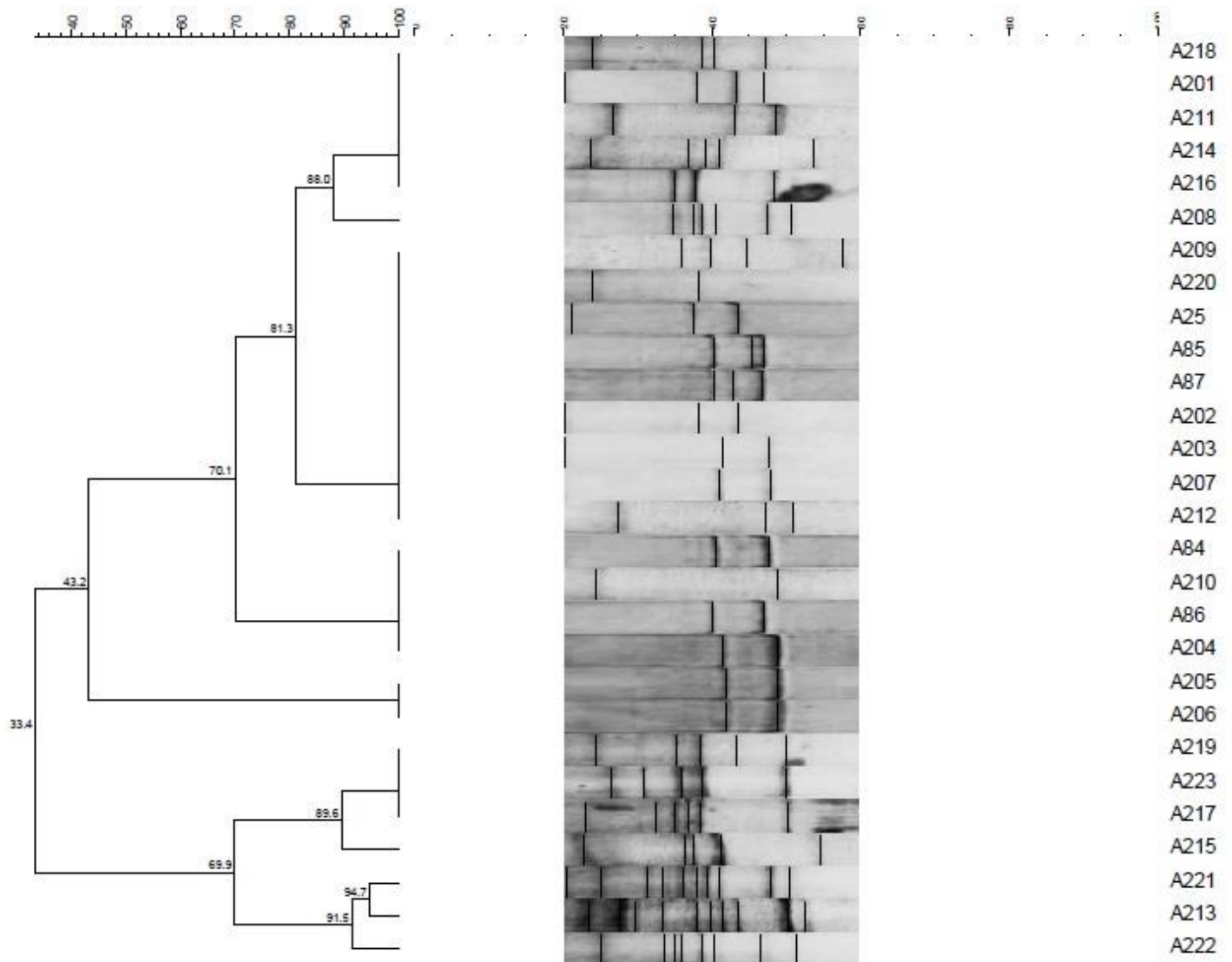
Sp45	puntiforme	plana	entero	lisa/cremosa	blanco/beige	+	bacilos
Sp46	circular	umbonada	entero	lisa/cremosa	blanco/beige	+	bacilos
Sp47	circular	umbonada	entero	lisa/cremosa	blanco/beige	+	bacilos
Sp48	puntiforme	plana	entero	lisa/cremosa	blanco/beige	+	bacilos
Sp49	puntiforme	plana	entero	lisa/cremosa	blanco/beige	+	bacilos
Sp50	circular	convexa	ondulado	lisa/cremosa	blanco/beige	-	bacilos
Sp51	puntiforme	plana	entero	lisa/cremosa	blanco/beige	-	bacilos
Sp52	irregular	plana	ondulado	lisa/cremosa	blanco/beige	+	bacilos
Sp53	puntiforme	plana	entero	lisa/cremosa	blanco/beige	+	bacilos
Sp54	circular	convexa	entero	lisa/cremosa	blanco/beige	+	bacilos
Sp55	circular	umbonada	entero	lisa/cremosa	blanco/beige	-	bacilos
Sp56	circular	convexa	entero	lisa/cremosa	blanco/beige	-	bacilos
Sp57	circular	convexa	entero	lisa/cremosa	blanco/beige	N/A	N/A
Sp58	circular	convexa	entero	lisa/cremosa	blanco/beige	-	bacilos
Sp59	circular	convexa	ondulado	rugosa	blanco/beige	+	bacilos
Sp60	circular	convexa	entero	lisa/cremosa	blanco/beige	+	bacilos
Sp61	puntiforme	convexa	entero	lisa/cremosa	blanco/beige	+	bacilos
Sp62	puntiforme	plana	entero	lisa/cremosa	blanco/beige	+	cocos
Sp63	circular	convexa	entero	lisa/cremosa	blanco/beige	-	bacilos
Sp64	circular	plana	entero	lisa/cremosa	blanco/beige	-	bacilos
Sp65	circular	convexa	entero	lisa/cremosa	blanco/beige	-	bacilos
Sp66	circular	plana	entero	lisa/cremosa	blanco/beige	-	bacilos
Sp67	puntiforme	plana	entero	lisa/cremosa	blanco/beige	+	cocos
Sp68	circular	convexa	entero	lisa/cremosa	blanco/beige	+	bacilos
Sp69	circular	umbonada	entero	lisa/cremosa	blanco/beige	-	bacilos
Sp70	puntiforme	convexa	entero	lisa/cremosa	blanco/beige	-	bacilos
Sp71	circular	umbonada	entero	lisa/cremosa	blanco/beige	+	cocos
Sp72	puntiforme	plana	entero	lisa/cremosa	blanco/beige	+	cocos

C. Anexo: Dendrograma - análisis de ITS de los aislamientos bacterianos¹⁶



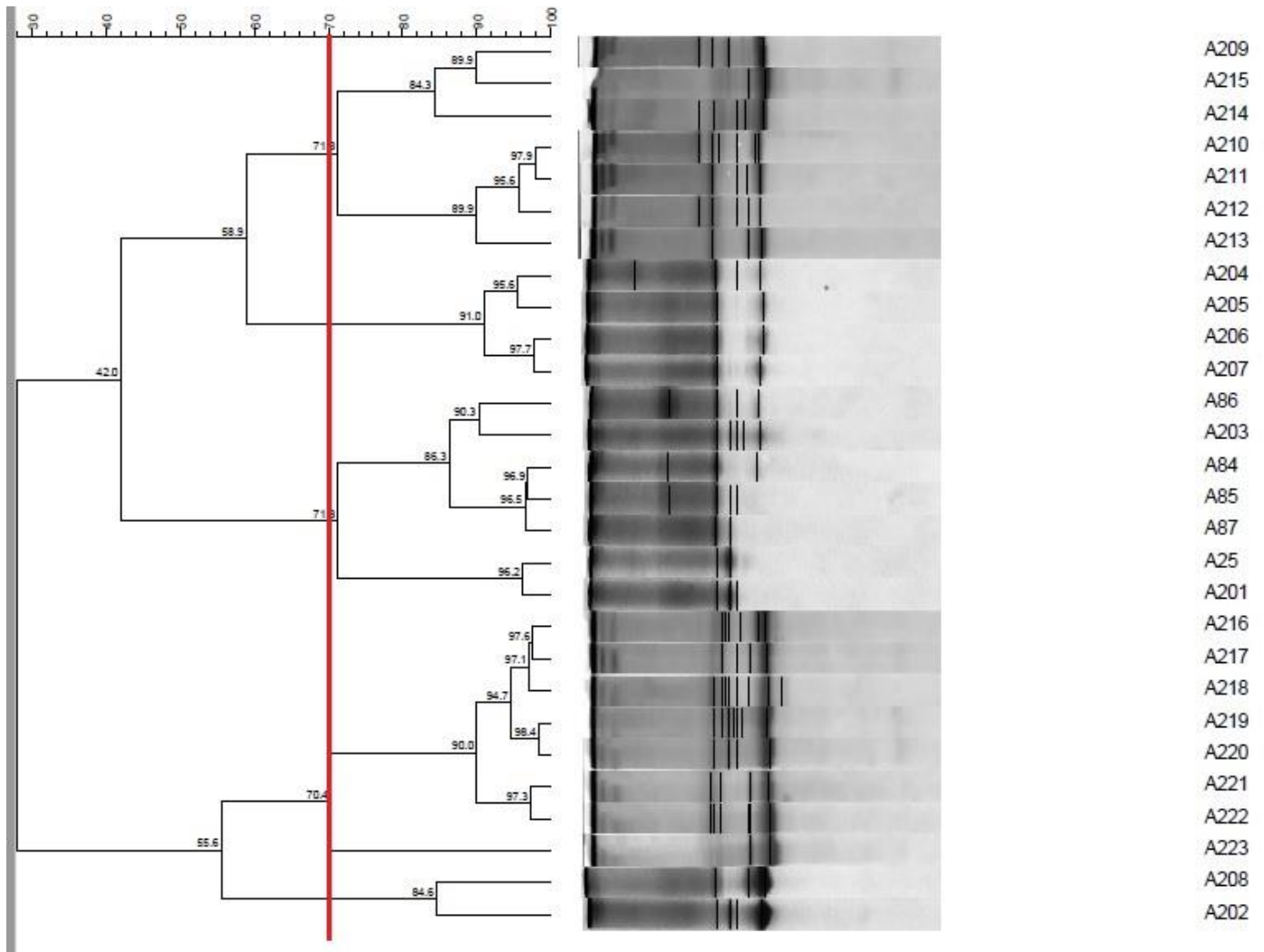
¹⁶Dendrograma (PEARSON-COMPLITE LINKAGE) obtenido mediante el software GelCompar II®, representando el análisis de ITS de los aislamientos bacterianos obtenidos. Se usó un índice de similitud de 75% para el agrupamiento de los clusters. +: Aislamientos seleccionados para secuenciar

D. Anexo: Dendrograma - análisis de ITS del DNA total¹⁷



¹⁷Dendrograma (PEARSON-COMPLITE LINKAGE) obtenido mediante el software GelCompar II®, representando el análisis de ITS del DNA total a partir muestras intestinales de larvas de *S. frugiperda*

E. Anexo: Dendrograma - TTGE¹⁸



¹⁸Dendrograma (PEARSON-COMPLITE LINKAGE) obtenido con el software GelCompar II a partir de los patrones de bandeado en geles de TTGE del producto amplificado del DNAr 16S desde el DNA total de muestras intestinales de larvas de *S. frugiperda*

F. Anexo: Presentación de resultados en eventos científicos

Los resultados de este estudio fueron presentados como 'poster' en dos simposios académicos internacionales.

- **17th International Symposium on Microbial Ecology (ISME17) Leipzig-Germany.**

ISME 17



Leipzig

DECLARATION OF ATTENDANCE ISME17 CCL Leipzig, Germany, 12-17 August 2018

The International Society for Microbial Ecology (ISME), organizer of the 17th International Symposium on Microbial Ecology (ISME17) in Leipzig, Germany, from 12 – 17 August 2018, hereby declares that the following delegate attended ISME17:

Name: Marlon Felipe Higueta Palacio
University/Institute: National university of Colombia
Country: Colombia

And contributed to a **Poster** presentation in the following session:

Session Title: PS16 - Visualization of microorganisms and their activity

Abstract Title: Midgut bacterial community associated to wild type *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) corn strain in Antioquia - Colombia

Day: 16.08.2018

Sincerely yours,



Sarash de Wilde
ISME Office

Disclaimer: An ISME Officer checks all declarations for validity before signing. However, ISME does not accept any responsibility or liability for the accuracy, content and/or completeness of the information contained on this declaration of attendance.



- **BioMicroWorld 2017 : VII International Conference on Environmental, Industrial and Applied Microbiology**



Bibliografía

- Almeida, L. G. de, Moraes, L. A. B. de, Trigo, J. R., Omoto, C., Cõnsoli, F. L., & Anspaugh, D. (2017a). The gut microbiota of insecticide-resistant insects houses insecticide-degrading bacteria: A potential source for biotechnological exploitation. *PLOS ONE*, *12*(3), e0174754. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0174754>
- Almeida, L. G. de, Moraes, L. A. B. de, Trigo, J. R., Omoto, C., Cõnsoli, F. L., & Anspaugh, D. (2017b). The gut microbiota of insecticide-resistant insects houses insecticide-degrading bacteria: A potential source for biotechnological exploitation. *PLOS ONE*, *12*(3), e0174754. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0174754>
- Altschul, S. F., Madden, T. L., Schäffer, A. A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., & Lipman, D. J. (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: A new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research*, *25*(17), 3389–3402. <http://doi.org/10.1093/nar/25.17.3389>
- Álvarez Colom, O., Neske, A., Popich, S., & Bardón, A. (2007). Toxic effects of annonaceous acetogenins from *Annona cherimolia* (Magnoliales: Annonaceae) on *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). *Journal of Pest Science*, *80*(1), 63–67. <http://doi.org/10.1007/s10340-006-0149-2>
- Arango, J. A., Romero, M., & Orduz, S. (2002). Diversity of *Bacillus thuringiensis* strains from Colombia with insecticidal activity against *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera:Noctuidae). *Journal of Applied Microbiology*, *92*(3), 466–474. <http://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2002.01545.x>
- Brinkmann, N., Martens, R., & Tebbe, C. C. (2008). Origin and diversity of metabolically active gut bacteria from laboratory-bred larvae of *Manduca sexta* (Sphingidae, Lepidoptera, Insecta). *Applied and Environmental*

- Microbiology*, 74(23), 7189–96. <http://doi.org/10.1128/AEM.01464-08>
- Broderick, N. A., Raffa, K. F., Goodman, R. M., & Handelsman, J. (2004). Census of the bacterial community of the gypsy moth larval midgut by using culturing and culture-independent methods. *Applied and Environmental Microbiology*, 70(1), 293–300. <http://doi.org/10.1128/aem.70.1.293-300.2004>
- Camarinha-Silva, A., Jáuregui, R., Chaves-Moreno, D., Oxley, A. P. A., Schaumburg, F., Becker, K., ... Pieper, D. H. (2014). Comparing the anterior nare bacterial community of two discrete human populations using Illumina amplicon sequencing. *Environmental Microbiology*, 16(9), 2939–2952. <http://doi.org/10.1111/1462-2920.12362>
- Cañas-Hoyos, Marquez, E. J. M., & Saldamando-Benjumea, A. C. I. (2014). Differentiation of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) Corn and Rice Strains From Central Colombia: A Wing Morphometric Approach. *Ann. Entomol. Soc. Am*, 107(3), 575–581. <http://doi.org/10.1603/AN12154>
- Cañas-Hoyos, N., Lobo-Echeverri, T., & Saldamando-Benjumea, C. I. (2017). Chemical Composition of Female Sexual Glands of *Spodoptera frugiperda* Corn and Rice Strains from Tolima, Colombia. *Southwestern Entomologist*, 42(2), 375–394. <http://doi.org/10.3958/059.042.0207>
- Cañas-Hoyos, N., Márquez, E. J., & Saldamando-Benjumea, C. I. (2014). Differentiation of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) Corn and Rice Strains From Central Colombia: A Wing Morphometric Approach. *Annals of the Entomological Society of America*, 107(3), 575–581. <http://doi.org/10.1603/AN12154>
- Cano-Calle, D., Arango-Isaza, R. E., & Saldamando-Benjumea, C. I. (2015). Molecular identification of *spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) corn and rice strains in colombia by using a PCR-RFLP of the mitochondrial gene cytochrome oxidase i (COI) and a PCR of the gene FR (For Rice). *Annals of the Entomological Society of America*, 108(2), 172–180. <http://doi.org/10.1093/aesa/sav001>
- Cano Calle, D. (2015). *Identificación de biotipos de Spodoptera frugiperda (Lepidoptera : Noctuidae) en los departamentos de Córdoba, Meta, Tolima y*

- Valle del Cauca mediante el gen mitocondrial Citocromo Oxidasa I (COI) y la región nuclear FR*. National University of Colombia.
- Capinera, J. L. (2014). Fall Armyworm , *Spodoptera frugiperda* (J . E . Smith), 1–6.
- Caporaso, J. G., Kuczynski, J., Stombaugh, J., Bittinger, K., Bushman, F. D., Costello, E. K., ... Knight, R. (2010). QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data Intensity normalization improves color calling in SOLiD sequencing. *Nature Publishing Group*, 7(5), 335–336. <http://doi.org/10.1038/nmeth0510-335>
- Chen, B., Teh, B.-S., Sun, C., Hu, S., Lu, X., Boland, W., & Shao, Y. (2016). Biodiversity and Activity of the Gut Microbiota across the Life History of the Insect Herbivore *Spodoptera littoralis*. *Scientific Reports*, 6(1), 29505. <http://doi.org/10.1038/srep29505>
- Clima Santa Fe de Antioquia: Temperatura, Climograma y Tabla climática para Santa Fe de Antioquia - Climate-Data.org. (2017). Retrieved November 1, 2018, from <https://es.climate-data.org/america-del-sur/colombia/antioquia/santa-fe-de-antioquia-50304/>
- Cruz, G. S., Wanderley-Teixeira, V., Oliveira, J. V., Lopes, F. S. C., Barbosa, D. R. S., Breda, M. O., ... Teixeira, A. A. C. (2016). Sublethal Effects of Essential Oils From *Eucalyptus staigeriana* (Myrtales: Myrtaceae), *Ocimum gratissimum* (Lamiales: Lamiaceae), and *Foeniculum vulgare* (Apiaceae) on the Biology of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). *Journal of Economic Entomology*, 109(2), 660–666. <http://doi.org/10.1093/jee/tow005>
- Di Toto Blessing, L., Álvarez Colom, O., Popich, S., Neske, A., & Bardón, A. (2010). Antifeedant and toxic effects of acetogenins from *Annona montana* on *Spodoptera frugiperda*. *Journal of Pest Science*, 83(3), 307–310. <http://doi.org/10.1007/s10340-010-0299-0>
- Dillon, R. J., & Dillon, V. M. (2004). THE GUT BACTERIA OF INSECTS : Nonpathogenic Interactions. *Annual Review of Entomology*, 49(1), 71–92. <http://doi.org/10.1146/annurev.ento.49.061802.123416>

- Edgar, R. C. (2010). Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST. *Bioinformatics*, 26(19), 2460–2461.
<http://doi.org/10.1093/bioinformatics/btq461>
- Edgar, R., Haas, B., Clemente, J., Quince, C., & Knight, R. (2011). UCHIME improves sensitivity and speed of chimera detection. *Bioinformatics*, 27(16), 2194–2200. <http://doi.org/10.1093/bioinformatics/btr381>
- Engel, P., & Moran, N. A. (2013). The gut microbiota of insects - diversity in structure and function. *FEMS Microbiology Reviews*, 37(5), 699–735.
<http://doi.org/10.1111/1574-6976.12025>
- Espejo, R. T., Feijóo, C. G., Romero, J., & Vásquez, M. (1998). PACE analysis of the heteroduplexes formed between PCR-amplified 16S rRNA genes: Estimation of sequence similarity and rDNA complexity. *Microbiology*, 144(6), 1611–1617. <http://doi.org/10.1099/00221287-144-6-1611>
- Feras Q. Alali, Xiao-Xi Liu, and, & McLaughlin*, J. L. (1999). Annonaceous Acetogenins: Recent Progress. <http://doi.org/10.1021/NP980406D>
- García, R., Mosquera, M., Vargas, C., & Rojas, L. (2002). Control biológico, microbiológico y físico de *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae), plaga del maíz y otros cultivos en Colombia. *Revista Colombiana de Entomología*, 28(1), 53–60. Retrieved from
<http://www.scielo.org.co/scieloOrg/php/reflinks.php?refpid=S0120-0488200500020000500009&lng=pt&pid=S0120-04882005000200005>
- Gichuhi, J., Subramanian, S., Khamis, F. M., Berg, J. Van den, Plessis, H. du, Ekesi, S., & Herren, J. K. (2019). Diversity of fall armyworm, *Spodoptera frugiperda* and their gut bacterial community in Kenya. *BioRxiv*, 664987.
<http://doi.org/10.1101/664987>
- Gil, R., Latorre, A., & Moya, A. (2004). Bacterial endosymbionts of insects: insights from comparative genomics. *Environmental Microbiology*, 6(11), 1109–1122. <http://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2004.00691.x>
- Gómez Valderrama, J. A., Guevara Agudelo, E. J., Barrera Cubillos, G. P., Cotes Prado, A. M., & Villamizar Rivero, L. F. (2010). ISOLATION, IDENTIFICATION AND CHARACTERIZATION OF NATIVE

- NUCLEOPOLYHEDROVIRUS OF SPODOPTERA FRUGIPERDA IN COLOMBIA, 63(2010), 1–10.
- Groot, A. T., Marr, M., Schöfl, G., Lorenz, S., Svatos, A., & Heckel, D. G. (2008). Host strain specific sex pheromone variation in *Spodoptera frugiperda*. *Frontiers in Zoology*, 5(1), 20. <http://doi.org/10.1186/1742-9994-5-20>
- Guerrero, A., Malo, E. A., Coll, J., & Quero, C. (2014). Semiochemical and natural product-based approaches to control *Spodoptera* spp. (Lepidoptera: Noctuidae). *Journal of Pest Science*, 87(2), 231–247. <http://doi.org/10.1007/s10340-013-0533-7>
- ICA. (2003). *Boletín Epidemiología*.
- Jensen, M. A., Webster, J. A., & Straus, N. (1993). Rapid identification of bacteria on the basis of polymerase chain reaction-amplified ribosomal DNA spacer polymorphisms. *Applied and Environmental Microbiology*, 59(4), 945–52. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8476298>
- Jensen, P. R., & Fenical, W. (1994). Strategies for the Discovery of Secondary Metabolites from Marine Bacteria: Ecological Perspectives. *Annual Review of Microbiology*, 48(1), 559–584. <http://doi.org/10.1146/annurev.mi.48.100194.003015>
- Jones, A. G., Mason, C. J., Felton, G. W., & Hoover, K. (2019). Host plant and population source drive diversity of microbial gut communities in two polyphagous insects. *Scientific Reports*, 9(1), 2792. <http://doi.org/10.1038/s41598-019-39163-9>
- Levy, H. C., Garcia-Maruniak, A., & Maruniak, J. E. (2002). STRAIN IDENTIFICATION OF SPODOPTERA FRUGIPERDA (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE) INSECTS AND CELL LINE: PCR-RFLP OF CYTOCHROME OXIDASE C SUBUNIT I GENE. *Florida Entomologist*, 85(1), 186–190. [http://doi.org/10.1653/0015-4040\(2002\)085\[0186:SIOSFL\]2.0.CO;2](http://doi.org/10.1653/0015-4040(2002)085[0186:SIOSFL]2.0.CO;2)
- Lobo Hernandez, M. I. (2011). CARACTERIZACIÓN MOLECULAR CON MARCADORES AFLP's DE LOS BIOTIPOS DE *Spodoptera frugiperda* (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE) PERTENECIENTES A LOS DEPARTAMENTOS DE CÓRDOBA, META Y VALLE DEL CAUCA,

COLOMBIA. Universidad Nacional de Colombia.

- Meagher, R. L., & Gallo-Meagher, M. (2003). IDENTIFYING HOST STRAINS OF FALL ARMYWORM (LEPIDOPTERA\ NOCTUIDAE) IN FLORIDA USING MITOCHONDRIAL MARKERS. Retrieved from <http://www.bioone.org/doi/pdf/10.1653/0015-4040%282003%29086%5B0450%3AIIHSOFA%5D2.0.CO%3B2>
- Meagher, R. L., & Nagoshi, R. N. (2004). Population dynamics and occurrence of *Spodoptera frugiperda* host strains in southern Florida. *Ecological Entomology*, 29(5), 614–620. <http://doi.org/10.1111/j.0307-6946.2004.00629.x>
- Moreno, C. X., Moy, F., Daniels, T. J., Godfrey, H. P., & Cabello, F. C. (2006). Molecular analysis of microbial communities identified in different developmental stages of *Ixodes scapularis* ticks from Westchester and Dutchess Counties, New York. *Environmental Microbiology*, 8(5), 761–772. <http://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2005.00955.x>
- Muyzer, G., de Waal, E. C., & Uitterlinden, A. G. (1993). Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Applied and Environmental Microbiology*, 59(3), 695–700. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7683183>
- Nagoshi, R. N., & Meagher, R. (2003). *Fall armyworm FR sequences map to sex chromosomes and their distribution in the wild indicate limitations in interstrain mating*. *Insect Molecular Biology* (Vol. 12). Retrieved from [https://www.ars.usda.gov/arsuserfiles/11809/FAW FR SEQUENCES.pdf](https://www.ars.usda.gov/arsuserfiles/11809/FAW_FR_SEQUENCES.pdf)
- Nagoshi, R. N., & Meagher, R. L. (2004a). Behavior and Distribution of the Two Fall Armyworm Host Strains in Florida. *Florida Entomologist*, 87(4), 440–449. [http://doi.org/10.1653/0015-4040\(2004\)087\[0440:BADOTT\]2.0.CO;2](http://doi.org/10.1653/0015-4040(2004)087[0440:BADOTT]2.0.CO;2)
- Nagoshi, R. N., & Meagher, R. L. (2004b). Seasonal Distribution of Fall Armyworm (Lepidoptera: Noctuidae) Host Strains in Agricultural and Turf Grass Habitats. *Environ. Entomol.*, 33(4), 881–889. Retrieved from [https://www.ars.usda.gov/arsuserfiles/11809/SEASONAL DISTRIBUTION.pdf](https://www.ars.usda.gov/arsuserfiles/11809/SEASONAL_DISTRIBUTION.pdf)

- Nucleotide BLAST - NCBI. (n.d.). Retrieved March 28, 2019, from [https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE=Nucleotides&PROGRAM=blastn&BLAST_PROGRAMS=blastn&PAGETYPE=BlastSearch&DATABASE=refseq_rna&DESCRIPTIONS=100&EQ_TEXT=arabidopsis\[orgn\]&QUERY=8033](https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE=Nucleotides&PROGRAM=blastn&BLAST_PROGRAMS=blastn&PAGETYPE=BlastSearch&DATABASE=refseq_rna&DESCRIPTIONS=100&EQ_TEXT=arabidopsis[orgn]&QUERY=8033)
- Orozco-Flores, A. A., Valadez-Lira, J. A., Oppert, B., Gomez-Flores, R., Tamez-Guerra, R., Rodríguez-Padilla, C., & Tamez-Guerra, P. (2017). Regulation by gut bacteria of immune response, *Bacillus thuringiensis* susceptibility and hemolin expression in *Plodia interpunctella*. *Journal of Insect Physiology*, *98*, 275–283. <http://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2017.01.020>
- Ortega Corona, A. (1987). *Insectos nocivos del maiz : una guía para su identificación en el campo*. CIMMYT. Retrieved from <https://repository.cimmyt.org/handle/10883/732>
- Pashley, D. P. (1988). Current Status of Fall Armyworm Host Strains. *Florida Entomologist*, *71*(3), 227–234. Retrieved from <http://journals.fcla.edu/flaent/article/view/58384/56063>
- Pashley, D. P., Hardy, T. N., & Hammond, A. M. (1995). Host Effects on Developmental and Reproductive Traits in Fall Armyworm Strains (Lepidoptera: Noctuidae). *Ann Entomol Soc Am*, *88*(6), 748–755. <http://doi.org/10.1093/aesa/88.6.748>
- Pashley, D. P., & Martin, J. A. (1987). Reproductive Incompatibility Between Host Strains of the Fall Armyworm (Lepidoptera: Noctuidae). *Ann Entomol Soc Am*, *80*(6), 731–733. <http://doi.org/10.1093/aesa/80.6.731>
- Powell, D. P., McMichael, M., & Silvain, J.-F. (2004). Multilocus Genetic Analysis of Host Use, Introgression, and Speciation in Host Strains of Fall Armyworm (Lepidoptera: Noctuidae). *Annals of the Entomological Society of America*, *97*(5), 1034–1044. [http://doi.org/10.1603/0013-8746\(2004\)097\[1034:MGAOHU\]2.0.CO;2](http://doi.org/10.1603/0013-8746(2004)097[1034:MGAOHU]2.0.CO;2)
- Quisenberry, S. . S. . (1991). Fall Armyworm (Lepidoptera : Noctuidae) Host Strain Reproductive Compatibility. *Florida Entomological Society*, *74*(2), 194–199.
- Ranjith, M. T., ManiChellappan, Harish, E. R., Girija, D., & Nazeem, P. A. (2016).

- Bacterial communities associated with the gut of tomato fruit borer, *Helicoverpa armigera* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae) based on Illumina Next-Generation Sequencing. *Journal of Asia-Pacific Entomology*, 19(2), 333–340. <http://doi.org/10.1016/J.ASPEN.2016.03.007>
- Ríos-Díez, J. D., & Saldamando-Benjumea, C. I. (2011). Susceptibility of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) Strains From Central Colombia to Two Insecticides, Methomyl and Lambda-Cyhalothrin: A Study of the Genetic Basis of Resistance. *Journal of Economic Entomology*, 104(5), 1698–1705. <http://doi.org/10.1603/EC11079>
- Ríos-Díez, J. D., Siegfried, B., & Saldamando-Benjumea, C. I. (2012). Susceptibility of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) Strains from Central Colombia to Cry1Ab and Cry1Ac Entotoxins of *Bacillus thuringiensis*. *Southwestern Entomologist*, 37(3), 281–293. <http://doi.org/10.3958/059.037.0304>
- Saldamando, C. I., & Vélez-Arango, A. M. (2010a). Host plant association and genetic differentiation of corn and rice strains of *Spodoptera frugiperda* Smith (Lepidoptera: Noctuidae) in Colombia. *Neotropical Entomology*, 39(6), 921–929. <http://doi.org/10.1590/S1519-566X2010000600012>
- Saldamando, C. I., & Vélez-Arango, A. M. (2010b). Host Plant Association and Genetic Differentiation of Corn and Rice Strains of *Spodoptera frugiperda* Smith (Lepidoptera: Noctuidae) in Colombia. *Neotropical Entomology*, 39(6), 921–929. <http://doi.org/10.1590/S1519-566X2010000600012>
- Sequence Match - RDP. (n.d.). Retrieved March 28, 2019, from http://rdp.cme.msu.edu/seqmatch/seqmatch_intro.jsp
- Shao, Y., Chen, B., Sun, C., Ishida, K., Hertweck, C., & Boland, W. (2017a). Symbiont-Derived Antimicrobials Contribute to the Control of the Lepidopteran Gut Microbiota. *Cell Chemical Biology*, 24(1), 66–75. <http://doi.org/10.1016/j.chembiol.2016.11.015>
- Shao, Y., Chen, B., Sun, C., Ishida, K., Hertweck, C., & Boland, W. (2017b). Symbiont-Derived Antimicrobials Contribute to the Control of the Lepidopteran Gut Microbiota. *Cell Chemical Biology*, 24(1), 66–75.

- <http://doi.org/10.1016/j.chembiol.2016.11.015>
- Silva Bedoya, L. M. (2015). *DIVERSIDAD BACTERIANA ASOCIADA A UNA PLANTA DE TRATAMIENTO DE AGUAS RESIDUALES (PTAR) Y ESTUDIO DE MICROORGANISMOS PRESENTES INVOLUCRADOS EN LA DEGRADACIÓN DE ÁCIDOS GRASOS*. Universidad Nacional de Colombia.
- Snyman, M., Gupta, A. K., Bezuidenhout, C. C., Claassens, S., & van den Berg, J. (2016). Gut microbiota of *Busseola fusca* (Lepidoptera: Noctuidae). *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, *32*(7), 115.
<http://doi.org/10.1007/s11274-016-2066-8>
- Sparks, A. N. (1979). A Review of the Biology of the Fall Armyworm. *The Florida Entomologist*. <http://doi.org/10.2307/3494083>
- Spiteller, D., Dettner, K., & Boland, W. (2005). Gut Bacteria May Be Involved in Interactions between Plants, Herbivores and Their Predators: Microbial Biosynthesis of N-Acylglutamine Surfactants as Elicitors of Plant Volatiles. *Biological Chemistry*, *381*(8), 755–762. <http://doi.org/10.1515/BC.2000.096>
- Tamura, K., Dudley, J., Nei, M., & Kumar, S. (2007). MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) Software Version 4.0. *Molecular Biology and Evolution*, *24*(8), 1596–1599.
<http://doi.org/10.1093/molbev/msm092>
- Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M., & Kumar, S. (2011). MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Molecular Biology and Evolution*, *28*(10), 2731–2739.
<http://doi.org/10.1093/molbev/msr121>
- Tang, X., Freitag, D., Vogel, H., Ping, L., Shao, Y., Cordero, E. A., ... Boland, W. (2012). Complexity and Variability of Gut Commensal Microbiota in Polyphagous Lepidopteran Larvae. *PLoS ONE*, *7*(7), e36978.
<http://doi.org/10.1371/journal.pone.0036978>
- Torres Lissette, & Cotes Alba Marina. (2005). Efecto de la crioconservación sobre la viabilidad y actividad biocontroladora de *Nomuraea rileyi* contra *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). *Revista Colombiana de*

Entomología., 31(2), 133–138. Retrieved from
<http://www.scielo.org.co/pdf/rcen/v31n2/v31n2a05.pdf>

Velasquez-Velez, M. I., Saldamando-Benjumea, C. I., Rios-Diez, J. D., Velásquez-Vélez, M. I., Saldamando-Benjumea, C. I., & Ríos-Diez, J. D. (2011). Reproductive Isolation Between Two Populations of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) Collected in Corn and Rice Fields From Central Colombia. *Annals of the Entomological Society of America*, 104(4), 826–833. <http://doi.org/10.1603/AN10164>

Vélez, A. R. (1997). *Plagas agrícolas de impacto económico en Colombia : bionomía y manejo integrado* (2. ed.). Medellín Colombia: Editorial Universidad de Antioquia. Retrieved from <http://www.worldcat.org/title/plagas-agricolas-de-impacto-economico-en-colombia-bionomia-y-manejo-integrado/oclc/41918335>

Vélez Arango, A. M., Arango I, R. E., Villanueva, D. M., Aguilera G, E., & Saldamando B, C. I. (2008). Identificación de biotipos de *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) mediante marcadores mitocondriales y nucleares. *Revista Colombiana de Entomología*, 34(2), 145–150.

Vivero Gómez, R. J. (2016). *CHARACTERIZATION OF THE INTESTINAL MICROBIOTA OF NATURAL POPULATIONS OF Lutzomyia evansi : VECTOR OF VISCERAL CHARACTERIZATION OF THE INTESTINAL MICROBIOTA OF NATURAL POPULATIONS OF Lutzomyia evansi : VECTOR OF VISCERAL* PhD in Biotechnology Science. Universidad Nacional de Colombia.

Vivero, R. J., Cadavid-Restrepo, G., Moreno-Herrera, C. X., & Soto Uribe, S. I. (2017). Molecular detection and identification of *Wolbachia* in three species of the genus *Lutzomyia* on the Colombian Caribbean coast. *BioMed Central*, 1–9. <http://doi.org/10.1186/s13071-017-2031-x>

Vivero, R. J., Jaramillo, N. G., Cadavid-Restrepo, G., Soto, S. I. U., Herrera, C. X. M., Amora, S., ... Moran, N. (2016). Structural differences in gut bacteria communities in developmental stages of natural populations of *Lutzomyia evansi* from Colombia's Caribbean coast. *Parasites & Vectors*, 9(1), 496.

- <http://doi.org/10.1186/s13071-016-1766-0>
- Wernegreen, J. J. (2002). Genome evolution in bacterial endosymbionts of insects. *Nature Reviews Genetics*, 3(11), 850–861.
<http://doi.org/10.1038/nrg931>
- Whitford, S. F., Quisenberry, S. ., Riley, T. . J. ., & Lee, J. . W. . (1988). Oviposition Preference , Mating Compatibility , and Development of Two Fall Armyworm Strains. *The Source Entomologist, Florida*, 71(3), 234–243.
- Wu, K., Yang, B., Huang, W., Dobens, L., Song, H., & Ling, E. (2016). Gut immunity in Lepidopteran insects. *Developmental & Comparative Immunology*, 64, 65–74. <http://doi.org/10.1016/J.DCI.2016.02.010>
- Xia, X., Sun, B., Gurr, G. M., Vasseur, L., Xue, M., & You, M. (2018). Gut microbiota mediate insecticide resistance in the diamondback moth, *Plutella xylostella* (L.). *Frontiers in Microbiology*, 9(JAN), 1–10.
<http://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00025>
- Yu, J., Saiardi, A., Greenwood, J. S., & Bewley, J. D. (2014). Molecular and biochemical identification of inositol 1,3,4,5,6-pentakisphosphate 2-kinase encoding mRNA variants in castor bean (*Ricinus communis* L.) seeds. *Planta*, 239(5), 965–77. <http://doi.org/10.1007/s00425-014-2028-z>
- Yu, Z., & Morrison, M. (2004). Comparisons of different hypervariable regions of rrs genes for use in fingerprinting of microbial communities by PCR-denaturing gradient gel electrophoresis. *Applied and Environmental Microbiology*, 70(8), 4800–6. <http://doi.org/10.1128/AEM.70.8.4800-4806.2004>
- Yun, J.-H., Roh, S. W., Whon, T. W., Jung, M.-J., Kim, M.-S., Park, D.-S., ... Bae, J.-W. (2014). Insect gut bacterial diversity determined by environmental habitat, diet, developmental stage, and phylogeny of host. *Applied and Environmental Microbiology*, 80(17), 5254–64.
<http://doi.org/10.1128/AEM.01226-14>
- Zenner, I., Polanía, D., Adrian, H., Maldonado, A., Cruz, R. M., & Díaz Sánchez, J. L. (2009). *Spodoptera frugiperda*: respuesta de distintas poblaciones a la toxina Cry1Ab. *Revista Colombiana de Entomología*, 3(351), 34–41.

Retrieved from <http://www.scielo.org.co/pdf/rcen/v35n1/v35n1a07.pdf>