



Universidad Autónoma De Querétaro

Facultad De Química

**“Identificación molecular y análisis filogenético de Baculovirus asociados a infección en *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae)”**

Tesis

Que como parte de los requisitos para obtener el Grado de

Maestro en Ciencia y Tecnología Ambiental

Presenta

IBT. Francisco Javier Flores Gallardo

Dirigido por

Dr. Juan Campos Guillén

SANTIAGO DE QUERÉTARO, QUERÉTARO, 20 de Octubre 2023



Dirección General de Bibliotecas y Servicios Digitales  
de Información



Identificación molecular y análisis filogenético de  
Baculovirus asociados a infección en *Spodoptera*  
*frugiperda* (Lepidoptera; Noctuidae)

**por**

Francisco Javier Flores Gallardo

se distribuye bajo una [Licencia Creative Commons  
Atribución-NoComercial-SinDerivadas 4.0 Internacional](#).

**Clave RI:** FQMAC-309168



Universidad Autónoma De Querétaro

Facultad De Química

**“Identificación molecular y análisis filogenético de Baculovirus asociados a infección en *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae)”**

Tesis

Que como parte de los requisitos para obtener el Grado de

Maestro en Ciencia y Tecnología Ambiental

Presenta

IBT. Francisco Javier Flores Gallardo

Dr. Juan Campos Guillén

Presidente

Dr. Miguel Angel Ramos López

Secretario

Dr. Víctor Pérez Moreno

Vocal

Dr. José Alberto Rodríguez Morales

Suplente

M en C. Erika Álvarez Hidalgo

Suplente

Centro Universitario, Querétaro, Qro.

Fecha de aprobación por el Consejo Universitario

México

## **DECLARACIÓN DE RESPONSABILIDAD DEL ESTUDIANTE**

Declaro que los datos propios obtenidos en esta investigación fueron generados durante el desarrollo de mi trabajo de tesis de forma ética y que reporto detalles necesarios para que los resultados de esta tesis sean reproducibles en eventuales investigaciones futuras. Finalmente, este manuscrito de tesis es un trabajo original en el cual se declaró y dio reconocimiento a cualquier colaboración o cita textual presentas en el documento.

## **DEDICATORIAS**

M<sup>a</sup> Dolores Hernández Carrillo †

Andrés Sebastián Flores Fuentes

## **AGRADECIMIENTOS**

Al COHNACYT por la beca de manutención otorgada durante la maestría.

A la Universidad Autónoma de Querétaro y la Maestría en Ciencia y Tecnología Ambiental por permitirme realizar mis estudios de posgrado.

Al Dr. Juan Campos Guillén por todo el apoyo brindado, así como su tiempo conocimientos y voluntad para llevar a cabo mi proyecto de investigación.

A mis sinodales: Dr. Miguel Ramos, Dr. Víctor Pérez, Dr. José Alberto Rodríguez y la M en C. Erika Álvarez por sus asesorías y colaboración para llevar a cabo este proyecto.

A los docentes de la maestría por su acompañamiento y recomendaciones para concluir esta etapa.

Al QFB Jorge Núñez Ramírez por sus enseñanzas, conocimientos y paciencia.

A mi mamá, papá, hermanos, cuñada, familia y amigos.

# ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE DE CUADROS .....	VII
ÍNDICE DE FIGURAS .....	VIII
RESUMEN.....	IX
ABSTRACT: .....	X
<b>1. INTRODUCCIÓN Y JUSTIFICACIÓN .....</b>	<b>1</b>
<b>2. ANTECEDENTES.....</b>	<b>3</b>
2.1. Gusano cogollero del maíz ( <i>Spodoptera frugiperda</i> ) .....	3
2.1.1. Ciclo de vida de <i>Spodoptera frugiperda</i> .....	3
2.1.2. Daños económicos causados por <i>Spodoptera frugiperda</i> .....	4
2.1.3. Distribución geográfica <i>Spodoptera. frugiperda</i> .....	4
2.2. Manejo de gusano cogollero del maíz <i>Spodoptera frugiperda</i> .....	5
2.2.1. Manejo físico.....	5
2.2.2. Manejo químico .....	6
2.2.3. Manejo cultural.....	6
2.2.4. Manejo botánico .....	7
2.2.5. Manejo biológico .....	8
2.3. Diversidad microbiana en <i>Spodoptera frugiperda</i> .....	8
2.4. Características generales de los baculovirus.....	9
2.4.1. Usos y aplicaciones .....	10
2.4.2. Baculovirus como método de manejo de plagas .....	11
2.4.3. Mecanismo de infección .....	12
<b>3. HIPÓTESIS .....</b>	<b>16</b>
<b>4. OBJETIVOS .....</b>	<b>17</b>
4.1. Objetivo general.....	17
4.2. Objetivos específicos.....	17

<b>4.</b>	<b>METODOLOGÍA.....</b>	<b>18</b>
4.1.	Sitio de estudio. ....	18
4.2.	Obtención de muestras y cría en condiciones de laboratorio de <i>Spodoptera frugiperda</i> ....	18
4.3.	Identificación de larvas infectadas.....	19
4.4.	Extracción de ADN de interés. ....	19
4.5.	Análisis de diversidad bacteriana mediante la secuenciación parcial del gen 16S rDNA ....	20
4.6.	Amplificación de ADN para la detección de baculovirus.....	20
4.7.	Clonación de ADN de interés ....	21
4.8.	Secuenciación y análisis filogenético ....	22
4.9.	Análisis metagenómico ....	23
4.10.	Manejo de residuos RPBI ....	23
<b>5.</b>	<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....</b>	<b>24</b>
5.1.	Análisis de la diversidad bacteriana usando el amplicón del gen 16S rDNA.....	24
5.2.	Detección por PCR y secuenciación parcial de los genes <i>lef-8</i> , <i>lef-9</i> y <i>polh</i> .....	26
5.3.	Análisis metagenómico .....	31
<b>6.</b>	<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>35</b>
6.1.	Importancia de los resultados.....	35
6.2.	Importancia del método .....	35
6.3.	Perspectivas. ....	35
<b>7.</b>	<b>REFERENCIAS .....</b>	<b>36</b>



## ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Ejemplos de productos elaborados a base de baculovirus .....	11
Cuadro 2. Composición para un kilogramo de dieta artificial .....	19
Cuadro 3. Cebadores usados para la amplificación .....	21
Cuadro 4 Resultados de la secuenciación de los fragmentos amplificados.....	31

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Diagrama de Nucleopoliedrovirus de múltiples cápsides .....	10
Figura 2. Ciclo de infección de baculovirus .....	15
Figura 3 Plásmido utilizado para la clonación.....	22
Figura 4 Análisis de diversidad bacteriana en larvas sanas y muertas.....	26
Figura 5 Contexto genómico y ubicación de los genes lef-8, lef-9 y polh. ....	27
Figura 6 Gel de agarosa con los fragmentos amplificados. ....	29
Figura 7 Principales especies de virus encontrados .....	33
Figura 8 Principales especies bacterianas encontradas .....	34

## RESUMEN

*Spodoptera frugiperda* es un insecto del orden de los lepidópteros, y es considerado una plaga que causa graves daños en cultivos de importancia económica, por ejemplo; maíz, sorgo, arroz y algodón. Existen diversos métodos para controlar el crecimiento de la población de este insecto y el más usado es el uso de insecticidas de origen químico-sintético. Sin embargo, su uso desmedido ha provocado que en las últimas décadas se incrementen los mecanismos de resistencia del insecto y los efectos negativos al ambiente. Por lo que se vuelve necesario investigar alternativas para el manejo de esta plaga. Al coleccionar larvas de *S. frugiperda* de los campos de cultivo, es posible que algunos patógenos potenciales se dispersen afectando el establecimiento de una colonia en condiciones de laboratorio de manera saludable. La detección de estos patógenos es importante no solo para evitar su dispersión, sino también para su aislamiento y posterior caracterización ya que pueden ser potenciales agentes de control biológico. Por lo anterior el objetivo de este proyecto fue la detección de patógenos potenciales en larvas de *S. frugiperda* criadas bajo condiciones de laboratorio cuyos cuerpos presenten fenotipos asociados a infecciones. Los resultados mostraron que utilizando la secuenciación parcial del gen 16S rDNA por Illumina MiSeq, en larvas saludables y muertas se encontró una abundancia relativa de *Enterococcus* spp., de 89.2% y 94.8% respectivamente. Mientras que de *Pseudomonas* spp., y *Acetobacter* spp., se encontró una menor abundancia relativa. Sumado a lo anterior, al analizar los estudios metagenómicos se encontró que en aquellas larvas que presentaban síntomas de infección, las secuencias de virus relacionadas a la presencia de baculovirus mostraban una abundancia relativa muy alta cerca del 77%, comparada con el 15% en larvas saludables. Se detectaron además secuencias virales relacionadas al virus del encrespamiento amarillo de la hoja del tomate, *Heliothis zea* nudivírus, *Clostera anachoreta* granulovirus y *Tipula oleracea* nudivírus. Los resultados demuestran que una detección molecular de agentes patógenos es primordial durante la crianza de insectos como un control de calidad para evitar su dispersión o adquisición.

**Palabras clave:** Infección, Baculovirus, *Spodoptera frugiperda*, Microbioma.

**ABSTRACT:**

*Spodoptera frugiperda* is an insect of the Lepidoptera order and is considered a pest that causes serious damage to economically important crops such as corn, sorghum, rice and cotton. There are several methods to control the population growth of this insect and the most widely used is the use of chemical-synthetic insecticides. However, their excessive use has led in recent decades to an increase in the insect's resistance mechanisms and negative effects on the environment. Therefore, it has become necessary to investigate alternatives for the management of this pest. When *S. frugiperda* larvae are collected from crop fields, it is possible that some potential pathogens may spread, affecting the establishment of a healthy colony in laboratory conditions. The detection of these pathogens is important not only to avoid their spread, but also for their isolation and subsequent characterization since they can be potential biological control agents. Therefore, the objective of this project was to detect potential pathogens in *S. frugiperda* larvae reared under laboratory conditions whose bodies show phenotypes associated with infections. The results showed that using partial sequencing of the 16S rDNA gene by Illumina MiSeq, in healthy and dead larvae, a relative abundance of *Enterococcus* spp. of 89.2% and 94.8%, respectively, was found. *Pseudomonas* spp. and *Acetobacter* spp. had a lower relative abundance. In addition to the above, when analyzing the metagenomic studies, it was found that in those larvae showing symptoms of infection, the virus sequences related to the presence of baculovirus showed a very high relative abundance compared to healthy larvae. Viral sequences related to Tomato yellow leaf curl virus, *Heliothis zea* nudiviruses, *Clostera anachoreta* granulovirus and *Tipula oleracea* nudivirus were also detected. The results demonstrate that a molecular detection of pathogens is paramount during insect rearing as a quality control to prevent their spread or acquisition.

**Keywords:** Infection, Baculovirus, *Spodoptera frugiperda*, Microbiome.

## 1. INTRODUCCIÓN Y JUSTIFICACIÓN

2

3 *Spodoptera frugiperda* (gusano cogollero del maíz), es un insecto polífago que  
4 debido a la naturaleza de sus hábitos alimenticios se considera una de las  
5 principales plagas a nivel mundial ya que una vez que ataca a los cultivos puede  
6 ocasionar la pérdida total. En México, esta plaga cobra una gran relevancia debido  
7 a que uno de los principales cultivos a los que ataca es el maíz, cultivo de  
8 importancia económica, cultural y alimenticia para los mexicanos. Dentro de los  
9 principales métodos de manejo para esta plaga se encuentra el uso de insecticidas  
10 químico-sintéticos que si bien representan una alternativa eficaz para el manejo de  
11 plagas su uso también acarrea algunos problemas ambientales como la  
12 contaminación de cuerpos de agua, generación de resistencia en los insectos  
13 blanco, así como disminución en la población de insectos benéficos; por lo anterior  
14 el uso de alternativas de origen biológico para el manejo de *S. frugiperda* se vuelve  
15 fundamental. Una de las opciones que se plantean para disminuir el uso de este tipo  
16 de insecticidas es el utilizar productos de origen biológico, siendo una de las  
17 opciones más comercializadas aquellos productos que dentro de sus componentes  
18 principales se encuentran baculovirus, estos son un tipo de virus entomopatógenos  
19 que debido a la coevolución con sus hospederos han desarrollado una alta  
20 especificidad y baja persistencia en el ambiente. Sin embargo, debido a la  
21 coevolución es precisamente por lo cual estos productos pueden llegar a generar  
22 resistencia en los insectos blanco; motivo por el cual el caracterizar nuevas especies  
23 de agentes biológicos con potencial actividad entomopatógena se vuelve  
24 fundamental. No obstante, para evaluar la capacidad infectiva que presentan estos  
25 productos es importante tener pies de cría de insectos libres de microorganismos  
26 patógenos para obtener resultados fiables acerca de su efectividad. Por tal motivo  
27 algunas de las técnicas para la caracterización de microorganismos presentes en el  
28 microbioma de los insectos durante su crianza, es el uso de técnicas moleculares  
29 como la secuenciación parcial de genes blanco para confirmar la presencia de  
30 microorganismos patógenos, los análisis de diversidad bacteriana y la  
31 secuenciación de un gran cantidad de fragmentos de DNA para estudios

32 metagenómicos que permitan un diagnóstico oportuno. Motivado por lo anterior la  
33 presente investigación tuvo como objetivo el diagnóstico molecular utilizando  
34 estrategias de secuenciación como la secuenciación del gen 16s rDNA y análisis  
35 metagenómicos para la detección de agentes patógenos relacionados con la  
36 necrosis presentada en larvas de *S. frugiperda* criadas bajo condiciones de  
37 laboratorio.  
38

39 **2. ANTECEDENTES**

40 **2.1. Gusano cogollero del maíz (*Spodoptera frugiperda*)**

41 **2.1.1. Ciclo de vida de *Spodoptera frugiperda***

42 *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae), gusano cogollero del maíz, es un  
43 insecto polífago del orden de los lepidopteros, (Capinera, 2014) que presentó sus  
44 primeras apariciones en regiones tropicales y subtropicales del continente  
45 americano, aunque en los últimos reportes se tiene que esta plaga ya se encuentra  
46 distribuida en los continentes africano y asiático (Montezano et al., 2018;  
47 Vatanparast & Park, 2022). El ciclo de vida completo de este insecto puede durar  
48 de 35 a 40 días y entre los factores que pueden provocar alteraciones en su  
49 desarrollo se encuentra la temperatura y la humedad (Casmuz, Juárez, Socías,  
50 Murúa, Prieto, Medina, Willink, & Gastaminza, 2010; Murúa et al., 2003; Murúa &  
51 Irla, 2004). La etapa larval tiene una duración promedio de veinticinco días y  
52 dependiendo del tamaño de la larva existen seis distintos estadios, durante los  
53 primeros realiza su alimentación durante el día y conforme su desarrollo avanza sus  
54 hábitos se vuelven más nocturnos (Murúa et al., 2003, 2008; Murúa & Irla, 2004).  
55 En el primer estadio presenta una tonalidad clara en su cuerpo con una cabeza  
56 grande con tonalidades oscuras, y a medida que se va desarrollando su tonalidad  
57 cambia a color marrón, oscureciéndose hasta llegar a un color marrón oscuro, pero  
58 presentando líneas blancas en sentido longitudinal, así como algunas manchas  
59 oscuras y espinas (Capinera, 2014). En el sexto y último estadio las larvas dejan de  
60 alimentarse entrando a la etapa prepupal, donde se preparan para formar la pupa,  
61 en esta etapa se entierran en el suelo entre 3 y 5 cm de profundidad, con el propósito  
62 de formar la cámara pupal y una vez que concluye la metamorfosis emerger como  
63 adultos (Casmuz, Juárez, Socías, Murúa, Prieto, Medina, Willink, & Gastaminza,  
64 2010; Murúa et al., 2003; Murúa & Irla, 2004). En su fase adulta su envergadura  
65 puede medir de 32 mm a 42 mm, sus alas por lo general llegan a presentar dos  
66 tonalidades distintas, las delanteras son de color castaño-grisáceas, mientras que  
67 las alas posteriores son de color blanco, de igual forma entre machos y hembras  
68 existen diferencias, los machos presentan una mancha blanca en las alas anteriores  
69 y las hembras carecen de ella (Capinera, 2014). Es en la etapa adulta donde

70 copulan y ovipositan, pudiéndolo hacer en el mismo cultivo (Casmuz, Juárez,  
71 Socías, Murúa, Prieto, Medina, Willink, & Gastaminza, 2010; Murúa et al., 2003;  
72 Murúa & Irla, 2004), durante la etapa de ovispostura, una hembra pone alrededor  
73 de 1 400 huevos en grupos de 100 a 150 huevos, la morfología de los huevos es  
74 esférica de color blanco con un diámetro aproximado de 0.5 mm, presentando una  
75 capa de hilos de seda y escamas que lo recubren (Casmuz, Juárez, Socías, Murúa,  
76 Prieto, Medina, Willink, & Gastamiza, 2010). Posterior a la emergencia de las larvas  
77 estas consumen el corion del huevo donde eclosionaron, ocultándose entre las  
78 hojas de los cultivos que ataca, teniendo la capacidad de que si el hospedero no  
79 cuenta con las características adecuadas para desarrollarse se traslada a otra en  
80 busca de alimento (Murúa et al., 2003, 2008; Murúa & Irla, 2004).

81

### 82 **2.1.2. Daños económicos causados por *Spodoptera frugiperda***

83 Dentro de las plagas con mayor importancia económica en Mesoamérica se  
84 encuentra *S. frugiperda*, ya que dentro de los cultivos que suele atacar se encuentra  
85 el mijo, alfalfa, algodón, arroz, papa, caña de azúcar, trigo, soya y principalmente el  
86 maíz. Durante su etapa larval *S. frugiperda* penetra en el cogollo de las plantas de  
87 maíz, causando daños que dependiendo de la etapa fenológica del cultivo pueden  
88 ocasionar la pérdida total de la planta. Las primeras etapas de desarrollo de la planta  
89 hasta llegar al cogollo son las más vulnerables, y ya en sus etapas adultas es donde  
90 tienen mayor capacidad tienen de recuperarse y volver a su producción normal con  
91 menor afectaciones para los agricultores (Martínez-Martínez et al., 2019). De igual  
92 forma en el continente africano se han reportado pérdidas económicas importantes,  
93 llegando en 2018 a las 17.7 millones de toneladas de maíz que se traducen en  
94 alrededor de 4 600 millones de dólares (FAO, 2019).

95

### 96 **2.1.3. Distribución geográfica *Spodoptera. frugiperda***

97 *S. frugiperda* se encuentra principalmente distribuida en zonas tropicales y  
98 subtropicales, ya que este tipo de clima le otorga las condiciones necesarias para  
99 llevar a cabo su ciclo de vida de forma continua a lo largo del año, cosa que no  
100 ocurre en zonas con climas templados y fríos debido a que no logra sobrevivir todo



101 el año comportándose como una plaga estacional, debido a que no posee la  
102 capacidad de hibernar en condiciones climáticas desfavorables conocida como  
103 diapausa que está relacionada con varios cambios en su metabolismo regulados  
104 por señales externas que van a determinar su ocurrencia, tiempo y duración, entre  
105 las que destacan, fotoperiodo, temperatura, humedad, nutrición y fenología del  
106 hospedero (Allsopp et al., 2012; Leather et al., 1995; Pair et al., 1991). De los cerca  
107 de 200 diferentes cultivos que puede atacar *S. frugiperda* más del 50% se encuentra  
108 en Centro y Norteamérica (Casmuz, Juárez, Socías, Murúa, Prieto, Medina, Willink,  
109 & Gastaminza, 2010).

110

## 111 **2.2. Manejo de gusano cogollero del maíz *Spodoptera frugiperda***

### 112 **2.2.1. Manejo físico**

113 En zonas en vías de desarrollo el principal método físico de manejo de *S. frugiperda*  
114 consta en la recolección manual de las macillas y de larvas en los cultivos afectados,  
115 aunque es un método muy poco eficiente debido a la velocidad con la que se realiza,  
116 puede reducir de forma importante la población de larvas en las primeras etapas del  
117 desarrollo del cultivo. Otras alternativas que suelen usarse de manera frecuente  
118 debido a su bajo costo y alta disponibilidad son la sal, orina, aceites y detergentes,  
119 aunque no existe evidencia científica que garantice su eficacia, por lo que en  
120 algunos casos no se recomienda su uso (Hruska, 2019; Rwomushana et al., 2018;  
121 Yigezu & Wakgari, 2020). Dentro de las alternativas que recomienda la FAO se  
122 encuentra la aplicación de ceniza o arena directamente en las zonas donde el  
123 insecto suele atacar a la planta debido a su bajo costo y efectividad. La arena actúa  
124 como un abrasivo lesionando el cuerpo de la larva o como desecante debido a que  
125 absorbe la cera que recubre su cuerpo (FAO, 2017; Hruska, 2019). De igual forma  
126 la arena puede servir como reservorio de algunos microorganismos  
127 entomopatógenos, un ejemplo son las esporas de *Beauveria bassiana* que se ha  
128 utilizado como alternativa biológica para el manejo de *S. frugiperda* (Ramirez-  
129 Rodriguez & Sánchez-Peña, 2016).

130

### 131 **2.2.2. Manejo químico**

132 En 2019 de acuerdo con (FAO, 2022) la importación de plaguicidas en México  
133 alcanzó las 140 000 toneladas lo que en términos económicos representa  
134 transacciones por cerca de 794 millones de dólares, mientras que el consumo de  
135 insecticidas en México fue de alrededor de 12 000 toneladas y a nivel mundial  
136 alcanzó las 700 000 toneladas. El uso de insecticidas de origen químico-sintético es  
137 el principal método de manejo contra *S. frugiperda*, siendo las familias de los  
138 organofosforados, organoclorados, piretroides y carbamatos las más utilizadas,  
139 destacando el benzoato de emamectina, el imidacloprid, lindano, clorpirifos-etil,  
140 acetamiprid, cipermetrina, lambda-cihalotrin, deltametrina, permetrina,  
141 maltodextrina, palmitato de etilo, carbaril y fipronil (Chimweta et al., 2019; R. D.  
142 Harrison et al., 2019; Kansime et al., 2019; Rwomushana et al., 2018; Sisay et al.,  
143 2019). El uso de estos insecticidas tuvo buenos resultados en algunas regiones de  
144 África, aunque su uso excesivo ha causado problemas como la generación de  
145 resistencia a los insecticidas por parte de los insectos, aumento en los costos de  
146 producción, deterioro de la biodiversidad, así como problemas de salud tanto para  
147 los productores como a los consumidores (Damalas & Eleftherohorinos, 2011; Day  
148 et al., 2017).

149

### 150 **2.2.3. Manejo cultural**

151 Algunos de los principales métodos culturales para el manejo de plagas son la  
152 siembra una vez terminada la temporada de lluvias, intercalación de los cultivos a  
153 la hora de la siembra, rotación de los cultivos y la eliminación de la maleza en la  
154 periferia del cultivo, aunque por si solos no presentan una alta tasa de efectividad al  
155 usarse en conjunto con algún otro método de manejo como pudiera ser el botánico  
156 o el biológico su efectividad aumenta de manera significativa ayudando a disminuir  
157 los daños provocados por *S. frugiperda* (Assefa, 2018; Kasoma et al., 2020). Dentro  
158 de las practicas que resultan benéficas para los cultivos de maíz se encuentra el  
159 realizar la siembra durante la primera temporada de lluvias ya que favorece a que  
160 presenten mejores características durante su desarrollo (R. D. Harrison et al., 2019).  
161 El que se presente una sincronía entre los ciclos de vida del insecto y del cultivo, es

162 una de causas que pueden originar que los daños que ocasiona *S. frugiperda*  
163 puedan incrementarse, motivo por el cual se recomienda realizar una siembra más  
164 temprana para así evitar una infestación en las etapas cruciales del cultivo (Chhetri  
165 & Acharya, 2019). En países del continente africano que se encuentran en vías de  
166 desarrollo como lo son Etiopía y Kenia las afectaciones a los cultivos ocasionados  
167 por la presencia de *S. frugiperda* son un problema importante, y para combatirlo se  
168 encontró que el porcentaje de agricultores que utilizan algún método de manejo  
169 cultural era del 14% y 39% respectivamente (Gebreyesus-Gebreziher, 2020).

170

#### 171 **2.2.4. Manejo botánico**

172 Con el fin de perpetuar su especie los seres vivos poseen mecanismos de defensa,  
173 en este caso algunas plantas presentan capacidades insecticidas, gracias a que sus  
174 hojas, flores, semillas, tallos, frutos o raíces tienen la propiedad de generar  
175 metabolitos secundarios que actúan como repelentes para los insectos (Ahissou  
176 et al., 2021). A diferencia de los insecticidas de origen químico-sintético, los  
177 insecticidas de origen botánico presentan un menor impacto ambiental, una baja  
178 persistencia y en algunos casos las concentraciones requeridas para que presenten  
179 un efecto anti alimentario o repelente son menores (Bhusal & Chapagain, 2020).  
180 Dentro de los extractos que se ha reportado que presentan cierto porcentaje de  
181 efectividad contra *S. frugiperda* se encuentran aquellos que se obtuvieron a partir  
182 de algún miembro de las siguientes familias: Asteraceae, Celastraceae,  
183 Euphorbiaceae, Poaceae, Rubiaceae, Lamiaceae, Meliaceae, Apiaceae y  
184 Cactaceae, destacando los extractos de *Siphoneugena densiflores* (Myrtaceae) que  
185 presentó un 100% de mortalidad, *Carica papaya* (Caricaceae) que presentó un 90%  
186 de mortalidad y *Vernonia holosenicea* (Asteraceae) que presentó un 87% de  
187 mortalidad contra *S. frugiperda* (Rioba & Stevenson, 2020). (Ramos-López et al.,  
188 2010) evaluaron la actividad insecticida de extractos metanólicos de hojas y semillas  
189 de *Ricinus communis*, reportando una supervivencia larval del 0% a partir de una  
190 concentración de 9 600 ppm del extracto metanólico de las semillas y una  
191 supervivencia larval del 0% a las 24 000 ppm del extracto metanólico de las hojas.  
192 De igual forma otro de los extractos de los que se tiene conocimiento posee

193 actividad insecticida es el ácido linolénico, que a partir de una concentración de 400  
194 ppm mostró una supervivencia larval del 62.5% y una supervivencia pupal del 80%  
195 (Ramos-López et al., 2012).

196

### 197 **2.2.5. Manejo biológico**

198 El manejo biológico se describe como el uso de organismos vivos como animales,  
199 plantas, y microorganismos con la capacidad de tener un efecto insecticida o  
200 insectistático sobre determinadas plagas. La ventaja que presenta este tipo de  
201 manejo sobre otros como por ejemplo el químico-sintético, es que no se caracteriza  
202 por aumentar de manera significativa la contaminación o por causar daños  
203 ambientales, esto ocasiona que el desarrollo de nuevos plaguicidas de origen  
204 biológico sea de suma importancia para lograr disminuir el uso de plaguicidas de  
205 origen químico-sintético (Nava-Pérez et al., 2012). De manera general se pueden  
206 agrupar a los plaguicidas de origen biológico en dos grandes subgrupos: agentes  
207 microbianos que abarcan a los virus, hongos, protozoos y bacterias y los agentes  
208 bioquímicos, que comprenden a los atrayentes, hormonas, reguladores de  
209 crecimiento de insectos, enzimas y sustancias de señalización química (Alfonso,  
210 2002).

211

### 212 **2.3. Diversidad microbiana en *Spodoptera frugiperda***

213 La relación simbiótica que existe entre la comunidad microbiana presente y las  
214 propias larvas de *S. frugiperda* juega un papel fundamental en el desarrollo,  
215 evolución, rendimiento y aprovechamiento de los recursos para la supervivencia del  
216 insecto contra factores bióticos y abióticos (Gomes et al., 2020). Si bien el realizar  
217 un análisis de diversidad bacteriana nos sirve para conocer los principales géneros  
218 bacterianos presentes en una muestra, resulta limitante ya que para la  
219 determinación de la composición se realiza una amplificación parcial del gen 16S  
220 rRNA mediante la reacción en cadena de la polimerasa (*PCR*), lo que ocasiona un  
221 sesgo en la proporción de los géneros bacterianos presentes (Logares et al., 2014)  
222 Al identificar que géneros bacterianos se encontraban presentes en larvas de *S.*  
223 *frugiperda* (Jones et al., 2019) encontraron principalmente los géneros

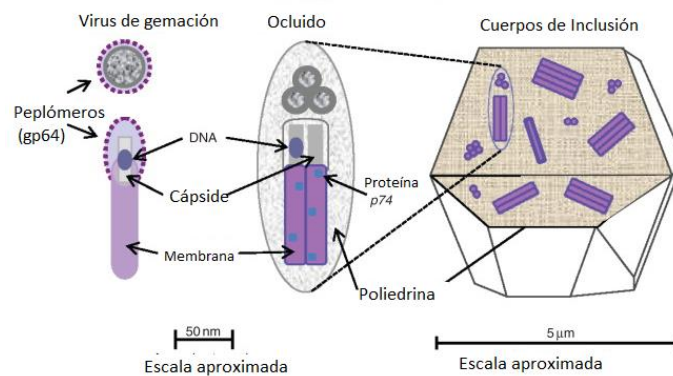
224 *Enterococcus*, *Pseudomonas*, *Chryseobacterium*, *Sphingobacterium*,  
225 *Ochrobactrum* y *Acinetobacter*. En el mismo sentido (Chen et al., 2023) compararon  
226 la microbiota de *S. frugiperda* en distintas etapas de su desarrollo encontrando que  
227 los filos más abundantes en todas las etapas de desarrollo de *S. frugiperda* son  
228 Proteobacteria y Firmicutes. De igual forma (Kalha et al., 2014) reportaron que  
229 dentro de las familias de bacterias entomopatógenas que atacan algún insecto plaga  
230 se encuentran, Bacillaceae, Pseudomonadaceae, Enterobacteriaceae,  
231 Streptococcaceae y Micrococcaceae; de igual forma mencionan que existen más de  
232 100 especies de bacterias entomopatógenas entre las que destacan, *Bacillus*  
233 *thuringiensis*, *B. sphaericus*, *B. cereus* y *B. popilliae*, que se han utilizado como  
234 posibles métodos de control biológico. Por otro lado (Muñoz-Benavent et al., 2021)  
235 reportaron que para la caracterización de las funciones del microbioma intestinal en  
236 los insectos una de las técnicas más utilizadas es la secuenciación de alto  
237 rendimiento o secuenciación de nueva generación (NGS) usando pirosecuenciación  
238 o Illumina para secuenciar principalmente algunos fragmentos de los genes, 16S  
239 rRNA, 18S rRNA y del espaciado interno transcrito (*ITS*), para el análisis de  
240 bacterias, eucariotas y hongos respectivamente de igual forma se han desarrollado  
241 técnicas novedosas como lo son la metatranscritómica, metaproteómica y  
242 metabolómica que permiten conocer más y mejores aspectos de las interacciones  
243 microbianas en menor tiempo.

244

#### 245 **2.4. Características generales de los baculovirus**

246 Dentro de todas las familias y géneros de virus que existen, se ha encontrado que  
247 algunos de ellos pueden dispersarse en gran variedad de insectos, debido a su  
248 infectividad que es la capacidad que presentan para invadir, persistir y multiplicarse  
249 dentro del huésped, destacando algunos de ellos que son capaces de utilizarse para  
250 el manejo de insectos plaga (Fauquet & Fargette, 2005). Dentro de estas familias,  
251 Baculoviridae es de las más estudiada debido a su uso como insecticida biológico,  
252 anteriormente los géneros de la familia de los baculovirus se clasificaban en  
253 *Granulovirus* spp (GV) y *Nucleopolyhedrovirus* (NPV), pero esta clasificación quedó  
254 en desuso y actualmente los NPV se agrupan en los géneros *Alphabaculovirus* spp,

255 *Deltabaculovirus* spp, y *Gammabaculovirus* spp; los GV pasaron a conformar el  
 256 género *Betabaculovirus* (Villamizar et al., 2018). Dentro del género  
 257 *Alphabaculovirus* se encuentran los nucleopoliedrovirus de múltiples cápsides  
 258 (MNPV) y los nucleopoliedrovirus de cápsides simples (NPVS), en ambos grupos  
 259 cada cuerpo de inclusión contiene varios viriones, mientras que los *Betabaculovirus*  
 260 únicamente tienen una nucleocápside con un virión por cada cuerpo de inclusión  
 261 (Jacas Miret & Urbaneja, 2008; Lipa, 2008). En la Figura 1 se describe la estructura  
 262 de los nucleopoliedrovirus de múltiple cápside, como se forma los cuerpos de  
 263 oclusión y la ubicación de los virus de gemación, así como su DNA.



264  
 265  
 266

Figura 1. Diagrama de Nucleopoliedrovirus de múltiples cápsides (Hitchman et al., 2011).

#### 267 **2.4.1. Usos y aplicaciones**

268 Dentro de las características que presentan los baculovirus se encuentra que es  
 269 una de las familias de virus entomopatógenos más utilizada para el manejo de  
 270 plagas resaltando el género *Alphabaculovirus* como un método eficaz para el  
 271 manejo de *S. frugiperda* debido a su capacidad insecticida, así como a su alta  
 272 especificidad (Battu et al., 2001; Ordóñez-García et al., 2015). Dentro de los  
 273 productos que tienen como componente principal algún tipo de baculovirus que se  
 274 comercializan y cuentan con registro comercial se encuentran los enlistados en el  
 275 Cuadro 1, donde figura la presencia de Spod-X®, Gypcheck®, TM Biocontrol-1®,  
 276 SAN 404®, Spodopterin®, Granupom®, Carpovirus Plus® y Spodopterin®, donde  
 277 se observan que están diseñados para especies en específico. Pero al igual que  
 278 otros métodos de manejo no es perfecto, y no está exento de que sus hospederos

279 generen resistencia contra alguno de los productos comerciales, como es el caso  
 280 del granulovirus de *Cydia pomonella* (CpGV) (Fritsch et al., 2005; Sauphanor et al.,  
 281 2006), es importante realizar una rotación entre los productos a suministrar, por esto  
 282 el desarrollar nuevas formulaciones con distintos tipos de baculovirus cobra gran  
 283 relevancia para el manejo biológico de plagas (Villamizar et al., 2018).

284  
 285

Cuadro 1. Ejemplos de productos elaborados a base de baculovirus modificado de (Villamizar et al., 2018)

Virus	Nombre comercial	Plaga blanco
SeNPV	Spod-X ®	<i>Spodoptera exigua</i>
LdNPV	Gypcheck ®	<i>Lymantria dispar</i>
OpMNPV	TM Biocontrol-1 ®	<i>Orgyia pseudotsugata</i>
AcMNPV	SAN 404 ®	<i>Autographa californica</i>
SpliNPV	Spodopterin ®	<i>Spodoptera littoralis</i>
CpGV	Granupom ®	<i>Cydia pomonella</i>
CpGV	Carpovirus Plus ®	<i>Cydia pomonella</i>

286

#### 287 **2.4.2. Baculovirus como método de manejo de plagas**

288 En el mercado es fácil encontrar una variedad de productos cuyo componente  
 289 principal sean baculovirus o mezclas de ellos que ya cuentan con registro para su  
 290 comercialización (Villamizar et al., 2019). Un ejemplo es el uso de  
 291 Nucleopoliedrovirus múltiple (MNPV) de *Anticarsia gemmatalis* (AgMNPV) para el  
 292 manejo de la oruga de las leguminosas en Brasil (*A. gemmatalis*) que es el principal  
 293 defoliador de la soya, en un principio se aplicó un filtrado de larvas maceradas que  
 294 fueron infectadas con este virus, para de forma posterior desarrollar una formulación  
 295 efectiva (Sosa-Gómez et al., 2008); otro método que presentó resultados favorables  
 296 fue el uso de NPVs para el manejo de *S. frugiperda* en Colombia, donde a partir de  
 297 larvas infectadas se caracterizaron por técnicas moleculares tres aislados distintos,  
 298 seleccionando el aislado NPV003 ya que fue el único que provocó sintomatología  
 299 característica de infección en larvas de *S. frugiperda*, actualmente este aislado está  
 300 en proceso de registro en Colombia con el nombre comercial de Spobiol® (Barrera  
 301 et al., 2015).

302

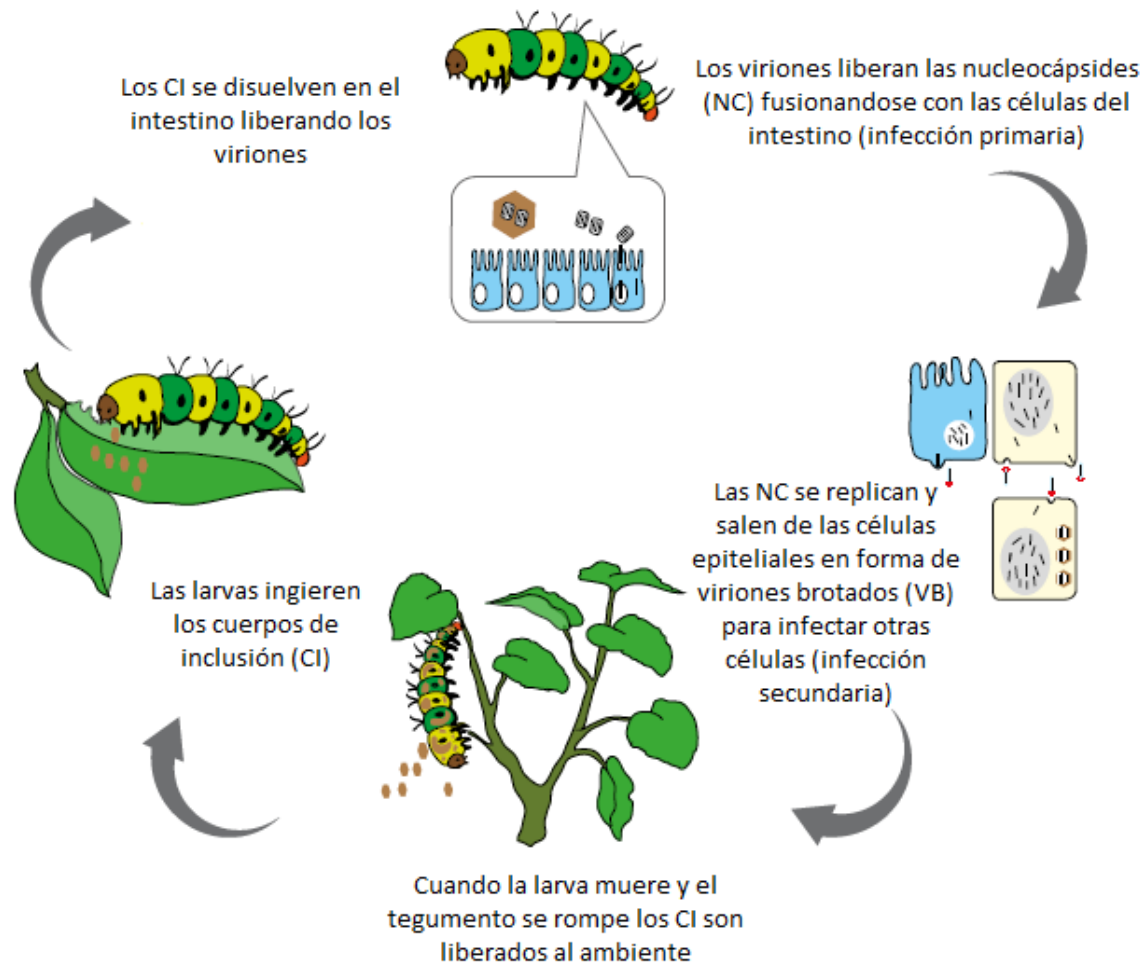
### 303 **2.4.3. Mecanismo de infección**

304 El ciclo de infección de los baculovirus es un proceso complejo que se describe a  
305 continuación (Figura 2), donde se explica cómo es que los cuerpos inclusión son  
306 ingeridos por el insecto blanco, disueltos en el intestino del insecto gracias a la  
307 alcalinidad del ambiente que predomina liberando los virus derivados ocluidos  
308 (ODV), que atravesarán la membrana peritrófica del intestino, unirse a las  
309 microvellosidades e ingresar a las células (Rohrmann, 2013). Una vez dentro de las  
310 células las nucleocápsides se dirigen al núcleo donde da inicio la etapa de  
311 transcripción del genoma del virus y así dar origen a la nueva generación del  
312 virus (Caballero et al., 2001), las recién creadas nucleocápsides se transportan  
313 hasta la membrana celular para brotar al espacio extracelular, esto provoca que  
314 formen una envoltura a partir de la membrana celular para brotar al espacio  
315 extracelular, esto provoca que formen una envoltura a partir de la membrana celular  
316 conformando los viriones brotados (BV), que en una segunda instancia serán los  
317 encargados de desarrollar la infección secundaria, circulando por la hemolinfa  
318 infectando los demás tejidos de la larva. Ya en las últimas etapas de la infección la  
319 nucleocápside se encapsula dentro de una matriz proteica, ya sea de granulina en  
320 el caso de los *Betabaculovirus* spp., o de poliedrina en el caso de los *Alfabaculovirus*  
321 spp., *Gammabaculovirus* spp., y *Deltabaculovirus* spp., que forma los nuevos CI.  
322 Una vez que la larva muere los CI son liberados al ambiente (Rohrmann, 2013). En  
323 los invertebrados los hemocitos son las células encargadas de la respuesta inmune,  
324 los agentes patógenos o derivados de estos activan la inmunidad humoral,  
325 promoviendo la producción de péptidos antimicrobianos, la mielinización y la  
326 coagulación de la hemolinfa. El sistema inmune de los insectos, así como el de los  
327 mamíferos presenta similitudes funcionales y estructurales como lo son la presencia  
328 de hemocitos en los insectos y neutrófilos en los mamíferos, ya que ambos  
329 fagocitan, producen superóxidos y liberan enzimas para la desgranulación (Piatek  
330 et al., 2020). Las larvas infectadas por baculovirus presentan distintas  
331 sintomatologías dependiendo del género que esté presente, hasta el momento se  
332 han identificado tres tipos distintos de infección. En el tipo uno, el virus invade al  
333 hospedero a través del epitelio del intestino medio, para posteriormente infectar el



334 tejido graso, esto provoca que la larva pueda vivir más tiempo alimentándose y  
335 creciendo de manera regular, pero un par de días previo a su muerte comienzan a  
336 tener un estado letárgico, después de la infección las larvas comienzan a hincharse  
337 y presentar un aspecto blanquecino cremoso debido a la acumulación de células  
338 infectadas llenas de gránulos infectados, en este tipo de infección los tejidos no  
339 presentan licuefacción. Infección tipo dos, en este caso la infección es muy similar  
340 a la tipo uno, aunque solo se necesitan entre cinco y diez días para que se presente  
341 la muerte del insecto y en este caso las larvas si presentan licuefacción de sus  
342 tejidos. Infección tipo tres, este tipo de infección es exclusiva del granulovirus de  
343 *Harrisia brillians* y se caracteriza por el tropismo tisular restringido al epitelio  
344 intestinal en la parte media, la producción de viriones y cuerpos de inclusión tanto  
345 en larvas como en adultos y la muerte del insecto entre cuatro y siete días posterior  
346 a la infección. Debido a diversas características que presentan los baculovirus se  
347 han utilizado de manera extensiva como un plaguicida de origen biológico contra  
348 algunos lepidopteros a nivel mundial, en algunos casos obteniéndolos a partir de  
349 muestras de larvas de *S. frugiperda* infectadas. En América Latina se tiene  
350 evidencia que se ha realizado la evaluación de cepas de nucleopoliedrovirus de  
351 *Spodoptera frugiperda* (SfNPV) sobre algunas poblaciones de *S. frugiperda*, de  
352 manera que se han obtenido resultados con perspectivas positivas, sin embargo, en  
353 México no existen tantos estudios a nivel laboratorio relacionados con la  
354 caracterización y evaluación de la actividad de cepas de baculovirus (Núñez et al.,  
355 2014). Los baculovirus poseen un genoma circular de doble cadena y con un  
356 tamaño entre los 90 y 180 kilo pares de bases (kpb), presentan entre 90 y 181  
357 marcos de lectura abiertos y pueden tener más de 800 genes distintos, la  
358 secuenciación de distintos genomas de baculovirus ha demostrado que existen  
359 aproximadamente treinta y siete genes conservados en todas las especies, estos  
360 genes son considerados los genes núcleo de los baculovirus ya que están  
361 relacionados con actividades fundamentales como lo es la replicación, transcripción,  
362 ensamblaje de los viriones y su capacidad de infección (Gómez Valderrama &  
363 Villamizar, 2013). Algunos de los genes que se utilizan para identificar la presencia  
364 de baculovirus son, *lef-8* y *lef-9* que codifican subunidades de la ARN polimerasa,

365 así como el gen *polh* y su homólogo *gran*, que son los responsables de codificar las  
366 proteínas estructurales poliedrina en los NPV y granulina en los GV  
367 respectivamente; debido a que son de los genes más conservados en los  
368 baculovirus se han utilizado para diversos análisis filogenéticos (Jehle et al., 2006).  
369 Es por todo lo anterior que el analizar el microbioma que se encuentra presente en  
370 larvas de *S. frugiperda*, es una alternativa para detectar agentes entomopatógenos,  
371 como virus y bacterias, con potencial actividad insecticida. Ya que las larvas en el  
372 campo al estar en constante interacción con otros organismos y su ambiente pueden  
373 fácilmente transmitir microorganismos patógenos como virus o bacterias, que a  
374 pesar de no desarrollar alguna infección en el organismo hospedero pueden servir  
375 de reservorio y pasar de generación en generación e inclusive pueden permanecer  
376 al ser trasladadas a espacios confinados con condiciones controladas como las que  
377 se dan al establecer colonias en el laboratorio para reproducirlas y ya una vez  
378 consiguen las condiciones adecuadas pueden migrar a otros organismos o  
379 permanecer en el hospedero y desarrollar infecciones. Algunos de los métodos más  
380 usados para la identificación de microorganismos se basan en la secuenciación  
381 parcial de genes específicos, o el uso de técnicas metagenómicas para obtener  
382 resultados más robustos acerca de los microorganismos presentes, como puede ser  
383 el ensamblar los genomas completos de algunos microorganismos y con esto  
384 detectar la presencia de algunos genes de interés.  
385



386  
387

Figura 2. Ciclo de infección de baculovirus (Villamizar et al., 2018).

388 **3. HIPÓTESIS**

389 Las larvas de *Spodoptera frugiperda* obtenidas de cultivos de maíz en el estado de  
390 Querétaro, pueden ser reservorio de virus y bacterias entomopatógenas, su  
391 dispersión y fenotipo infectivo puede detectarse a través de diagnósticos  
392 moleculares.

393

394 **4. OBJETIVOS**

395

396 **4.1. Objetivo general**

397 Identificar mediante técnicas moleculares los baculovirus y bacterias asociados a  
398 infección presentes en larvas de *S. frugiperda*.

399

400 **4.2. Objetivos específicos**

401 1. Determinar la presencia de baculovirus en larvas infectadas de *Spodoptera*  
402 *frugiperda* mediante la amplificación por PCR de genes específicos para su  
403 detección.

404

405 2. Identificar la diversidad bacteriana presente en larvas de *S. frugiperda*  
406 mediante la amplificación parcial del gen 16S rDNA.

407

408 3. Determinar la composición bacteriana y viral del microbioma de larvas sanas  
409 e infectadas de *Spodoptera frugiperda* mediante un análisis metagenómico.

410

411 **4. METODOLOGÍA**

412

413 **4.1. Sitio de estudio.**

414 Esta investigación se realizó en el Laboratorio de Microbiología, ubicado en la  
415 Facultad de Química de la Universidad Autónoma de Querétaro.

416

417 **4.2. Obtención de muestras y cría en condiciones de laboratorio de**  
418 ***Spodoptera frugiperda***

419 Se obtuvieron muestras de larvas que presentaron fenotipo necrótico asociado a  
420 infecciones proporcionadas por el laboratorio de compuestos Naturales insecticidas.

421 Los insectos fueron colectados de cultivos de maíz en el municipio de Huimilpan,  
422 Querétaro, México (Latitud: 20° 28' 30" N/+; Longitud: 100° 19' 37" W/-) y (Latitud:  
423 20° 33' 23" N/+; Longitud: 100° 23' 12" W/-) posteriormente fueron criados y  
424 mantenidos a condiciones controladas de fotoperiodo luz-oscuridad 14-10 h,  
425 temperatura ( $27 \pm 2$  °C) y humedad ( $70 \pm 5$  %) en una cámara bioclimática, se les  
426 suministró una dieta artificial propuesta por (Ramos-López et al., 2010) descrita en  
427 el Cuadro 2.

428

429  
430

Cuadro 2. Composición para un kilogramo de dieta artificial de *Spodoptera frugiperda* (Ramos-López et al., 2010).

Sustancia	Cantidad
Maíz molido	120 g
Frijol molido	60 g
Levadura	20 g
Neomicina	0,6 g
Multivitámico	2,5 g
*Ácido ascórbico	1.7 g
Metil 4-hidroxibenzoato	1,7 g
Agar bacteriológico	10 g
Formaldehído al 10 %	2,5 mL
Agua	800 mL
*Etanol 96°	17 mL

\*El etanol se usará para disolver el ácido ascórbico.

431  
432

#### 433 **4.3. Identificación de larvas infectadas**

434 Para el análisis de las larvas, se seleccionaron aquellas que presentaron  
435 licuefacción de sus tejidos, ablandamiento en la parte media del cuerpo y un color  
436 blanquecino ya que son características que concuerdan con infecciones de tipo 1 y  
437 2 ocasionadas por la presencia de microorganismos patógenos como bacterias o  
438 baculovirus (Miller, 1997).

439

#### 440 **4.4. Extracción de ADN de interés.**

441 El ADN total se obtuvo del procesamiento de 5 larvas con características típicas de  
442 infección y de larvas sanas sin síntomas de infección, se trituraron y siguiendo el  
443 protocolo del fabricante se realizó la extracción de ADN con el kit Quick-DNA  
444 Miniprep de la marca Zymo Research.

445 **4.5. Análisis de diversidad bacteriana mediante la secuenciación parcial del**  
446 **gen 16S rDNA**

447 Una vez obtenidas las muestras de ADN, estas fueron procesadas y analizadas con  
448 el kit ZymoBIOMICS® Targeted Sequencing Service using the Quick-16S™ NGS  
449 Library Prep Kit (Zymo Research, Irvine, California, USA) y clasificados  
450 taxonómicamente con la herramienta Uclust de Qime v.1.9.1 (Caporaso et al., 2010)  
451 utilizando la base de datos de Zymo Research.

452

453 **4.6. Amplificación de ADN para la detección de baculovirus**

454 Una vez obtenido el ADN, mediante la técnica de PCR se utilizaron cebadores  
455 degenerados que de acuerdo con (Jehle et al., 2006), permiten la amplificación de  
456 las zonas de interés para diversos baculovirus. En la tabla 5.1 se muestran la  
457 secuencia de los cebadores, así como el gen que se busca amplificar y la función  
458 que presentan dentro de los baculovirus. Para esto se efectuó la técnica de  
459 Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés) para  
460 amplificar el fragmento génico usando la mezcla de PCR *Hot Start Phusion*  
461 (*ZymoResearch*), empleando los oligonucleótidos mostrados en el Cuadro 3. El  
462 programa de PCR se llevó a cabo en un C1000 *ThermalCycler Bio-Rad* bajo las  
463 siguientes condiciones: 95°C por 10 minutos; 45 ciclos de 94°C por 15 segundos,  
464 50°C por 30 segundos, y 72°C por 30 segundos; y una extensión final de 1 minuto  
465 a 65°C (Krejmer-Rabalska et al., 2019).

466



Gen diana	Función del gen	Nombre del cebador	Posición de genoma	Secuencia del Cebador (5' A 3')*
<i>polh/gran</i>	Codificar poliedrina (NPV) o granulina (GV), que es la principal proteína de la matriz de los cuerpos de inclusión.	prPH-1	4 684 - 4 698	TGTA AACGACGGCCAGT NRCNGARGAYCCNTT
		prPH-2	5 210-5 224	CAGGAAACAGCTATGACC DGGNGCRAAYTCYTT
<i>lef-8</i>	Codificar subunidades de la ARN polimerasa de baculovirus	prL8-1	42 075 - 42 088	CAGGAAACAGCTATGACC CAYGGHGARATGAC
		prL8-2	41 373 - 41 389	CAGGAAACAGCTATGACC AYRTASGGRTCYTCSGC
<i>lef-9</i>	Codificar subunidades de la ARN polimerasa de baculovirus	prL9-1	49 748 - 49 763	CAGGAAACAGCTATGACC AARAA YGGITAYGCBG
		prL9-2	50 027 - 50 043	TGTA AACGACGGCCAGT TTGTCDCCRTCRCARTC

468 \*B = C, G o T; D = A, G o T; H = A, C o T; I = Inosina; N = C, A, T o G; R = A o G; S = C o G; Y = C o T

469

470 Una vez obtenidas las muestras de ADN amplificado, se analizaron las muestras a  
 471 través de electroforesis en gel de agarosa al 2%. Se observó mediante el uso de un  
 472 transiluminador si las regiones amplificadas correspondían a las regiones que se  
 473 buscan amplificar, con base en el marcador molecular *Thermo Scientific Generuler*  
 474 1 Kb *DNA Ladder*.

475

#### 476 4.7. Clonación de ADN de interés

477 Para clonar el producto del *PCR*, la reacción de ligación se realizó como describe el  
 478 manual técnico del fabricante *Thermo Scientific* para el kit *Clone Jet PCR Cloning*  
 479 *kit*. En un tubo Eppendorf de 1.5 mL, se añadieron 5 µL de amortiguador de ligación,  
 480 1 µL del vector de clonación, 1 µL del producto de *PCR* purificado, 1 µL de ligasa,  
 481 ajustando a un volumen final de 10 µL con agua libre de nucleasas, la mezcla se  
 482 homogeneizó por pipeteo, se incubó a temperatura ambiente por una hora, y se  
 483 guardó a -20 °C hasta su uso. En la etapa de transformación se añadieron 10 µL de  
 484 la reacción de ligación en 50 µL de células competentes de *Escherichia coli*  
 485 XL1BLUE y la mezcla se mantuvo en hielo por 15 minutos, después el choque

486 térmico se llevó a cabo a 42 °C por 2 minutos, posteriormente se mantuvo en hielo  
 487 por 5 minutos, se le añadió un mL de medio LB sin ampicilina y se incubó a 37 °C  
 488 por una hora a agitación constante de 200 rpm, después del tiempo de incubación  
 489 se plaquearon 100 µL de bacterias transformadas en cajas Petri con medio LB sólido  
 490 con ampicilina 100 µg mL<sup>-1</sup>, las cajas se dejaron a 37°C toda la noche. Con el  
 491 propósito de saber si las colonias bacterianas transformadas contenían el inserto  
 492 del gen se llevó cabo el proceso de extracción del ADN plasmídico para después  
 493 realizar un PCR para su detección. En la Figura 3, se describe la estructura del  
 494 plásmido utilizado para amplificar los fragmentos de interés.

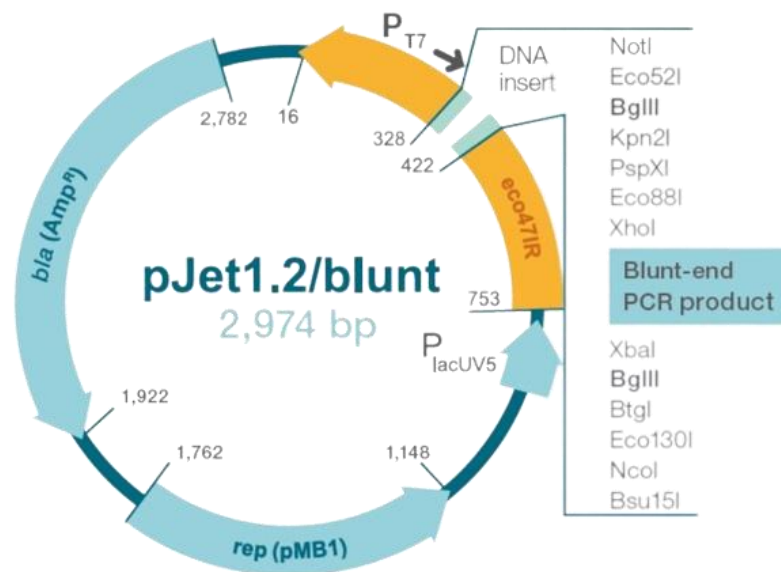


Figura 3 Plásmido utilizado para la clonación.

495  
 496  
 497

#### 498 4.8. Secuenciación y análisis filogenético

499 El producto de PCR clonado se verificó en un gel de agarosa al 2% y se purificó  
 500 utilizando el kit *DNA Clean Concentrator -5 kit* (ZymoResearch). Los amplicones  
 501 que se obtuvieron fueron enviados a secuenciar a la empresa MacroGen Inc. (*Seoul,*  
 502 *Republic of Korea*); el alineamiento y edición de las secuencias de los productos  
 503 amplificados se realizó en el software *MEGA* y comparado con las secuencias de  
 504 baculovirus por medio de la plataforma *BLAST* (*Basic Local Alignment Search*)  
 505 (Altschul et al., 1990) en las bases de datos del *National Center for Biotechnology*  
 506 *Information* (NCBI).

507 **4.9. Análisis metagenómico**

508 Para el análisis metagenómico se utilizaron dos larvas sanas y dos larvas muertas  
509 que fueron maceradas y siguiendo el protocolo del fabricante se realizó la extracción  
510 de ADN con el kit Quick-DNA Miniprep de la marca Zymo Research y enviadas a  
511 *MacroGen Sequencing Service* (Beotkkot-ro, Geumcheon-gu, Seoul, Korea) donde  
512 se secuenció siguiendo el flujo de trabajo *Illumina NGS*. Para el análisis  
513 bioinformático del metagenoma se utilizaron las herramientas, *metagenome*  
514 *binning*, *taxonomic classification* y *compressive genome analysis* de la plataforma  
515 *Bacterial and Viral Bioinformatics Resource Center, Chicago Illinois, USA* ([https://](https://www.bv-brc.org/)  
516 [www.bv-brc.org/](https://www.bv-brc.org/)) teniendo acceso el 11 de junio del 2022 (Wood et al., 2019).

517

518 **4.10. Manejo de residuos RPBI**

519 Los residuos biológicos (larvas, pupas y adultos) de *Spodoptera frugiperda* fueron  
520 manejados de acuerdo con la norma NOM-087-SEMARNAT-SSA1-2002 y de  
521 acuerdo con el convenio de residuos peligrosos que tiene la facultad de Química  
522 con una empresa privada. Las larvas, pupas y adultos de *S. frugiperda* fueron  
523 guardados debidamente en bolsas plásticas para residuos biológicos, después  
524 puestos en un congelador destinado para ese uso y puestos a disposición de la  
525 empresa contratada por la facultad.

526

527

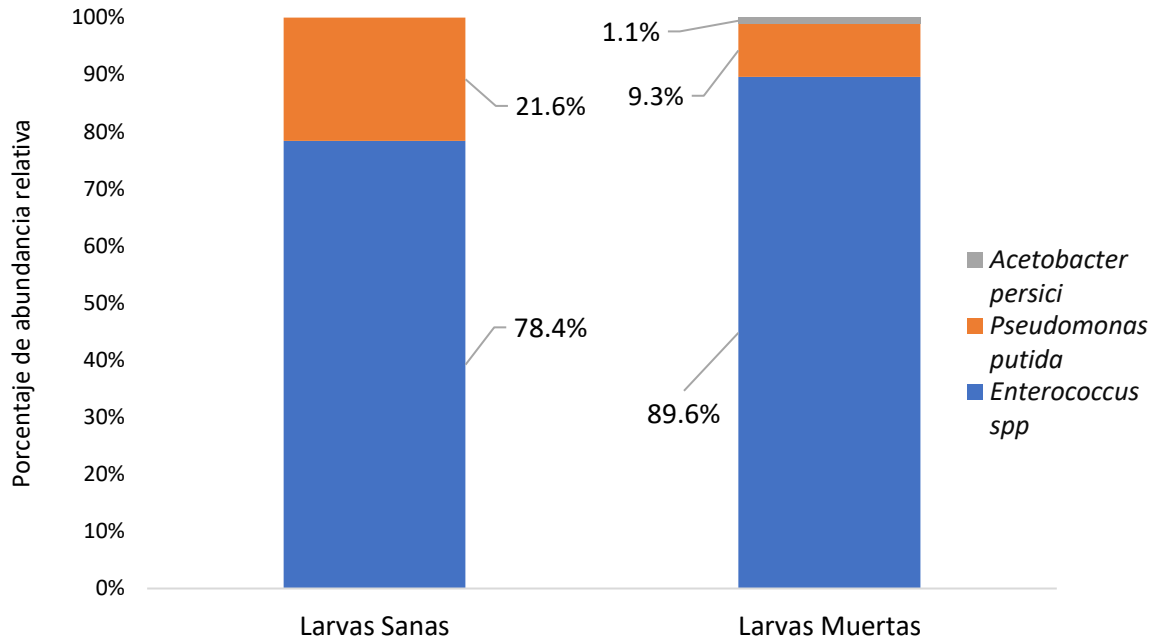
## 528 5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 529 5.1. Análisis de la diversidad bacteriana usando el amplicón del gen 16S 530 rDNA

531

532 El fenotipo necrótico encontrado en larvas muertas de *S. frugiperda*, criadas bajo  
533 condiciones de laboratorio, pudo ser causado por distintos factores, entre ellos se  
534 encuentran algunas variables biológicas como el desarrollo de infecciones  
535 ocasionadas por bacterias entomopatógenas o por virus de la familia baculoviridae.  
536 Aunque el interés principal de este trabajo fue la detección y aislamiento de  
537 baculovirus para su caracterización, era necesario conocer que la infección  
538 desarrollada no había sido ocasionada por bacterias entomopatógenas. Por tal  
539 motivo se decidió hacer un estudio de diversidad bacteriana en aquellas larvas que  
540 presentaron un fenotipo necrótico y compararlo con el presentado en larvas sanas,  
541 para esto se decidió usar una aproximación de secuenciación a través del gen ARNr  
542 16S siguiendo el flujo de trabajo *Illumina NGS*. Y conocer las diferencias entre  
543 poblaciones bacterianas de larvas sanas y larvas muertas, en la Figura 4 se observa  
544 que en larvas sanas se encontraron principalmente bacterias pertenecientes al  
545 género *Enterococcus* spp., género bacteriano del cual algunas especies forman  
546 parte del microbioma intestinal de humanos y algunos animales, por lo que debido  
547 a su inocuidad pueden persistir en el ambiente y utilizarse como indicador de  
548 material fecal en muestras de agua (Torres et al., 2018), presentando una  
549 abundancia relativa del 78.4%, y *Pseudomonas putida* con una abundancia relativa  
550 del 21.6%; mientras que en aquellas larvas que presentaron síntomas de infección  
551 se encontró la presencia de *Enterococcus* spp., con una abundancia relativa del  
552 89.6%, *Acetobacter persici* con una abundancia relativa del 9.3% y *Pseudomonas*  
553 *putida* con una abundancia relativa del 1%, esto concuerda con lo reportado por  
554 (Rozadilla et al., 2020) donde mencionan que en más de 30 especies distintas de  
555 lepidopteros los géneros bacterianos más frecuentes son, *Pseudomonas*,  
556 *Staphylococcus*, *Enterobacter* y *Enterococcus*, las cuales pueden estar presentes  
557 durante su ciclo de vida, pero su presencia no ha sido asociada a alguna  
558 enfermedad en *S. frugiperda*. Además, fue posible descartar que la muerte de las

559 larvas estuviera asociada a la presencia de bacterias del género *Bacillus*, esto es  
560 importante ya que de acuerdo con lo reportado por (Kalha et al., 2014) existen más  
561 de 100 especies distintas de bacterias entomopatógenas que han tenido algún uso  
562 como método de manejo de plagas, entre las especies que destacan se encuentran,  
563 *Bacillus thuringiensis*, que de acuerdo con (Palma et al., 2014) es una bacteria que  
564 se encuentra generalmente en el suelo, capaz de producir cristales de proteínas  
565 que poseen actividad insecticida debido a las toxinas de la familia Cry y Cyt que los  
566 componen. De igual forma se encuentra *B. spaericus*, una bacteria aeróbica  
567 formadora de esporas, con varias cepas patógenas para algunas larvas de  
568 mosquitos (Charles et al., 1996). Otra especies con características relevantes es *B.*  
569 *cereus*, bacteria facultativa productora de esporas que por lo general se puede  
570 encontrar en el suelo y contaminar alimentos, que una vez consumidos pueden  
571 ocasionar enfermedades intestinales, así como *B. popilliae* que es una bacteria  
572 patógena que afecta a una amplia diversidad de escarabajos que una vez que es  
573 ingerida por la larva se distribuye por el hemocele infectando todo su organismo,  
574 ocasionando su muerte (Bulla et al., 1978). Motivo por el cual al conocer la  
575 diversidad bacteriana y descartar la presencia de bacterias entomopatógenas el  
576 siguiente análisis se centró en determinar si la muerte de las larvas pudiera estar  
577 asociada a la presencia de algún otro agente entomopatógeno. Para esto el análisis  
578 se centró en la detección de genes específicos a través de la técnica de PCR, así  
579 como en la búsqueda de secuencias relacionadas con virus de la familia  
580 Baculoviridae, ya que se ha reportado que poseen la capacidad de infectar a larvas  
581 que pertenecen a los órdenes lepidóptera, hemíptera y díptera (R. L. Harrison et al.,  
582 2018).



583

584

585

Figura 4 Análisis de diversidad bacteriana en larvas sanas y muertas, se muestra el porcentaje de abundancia relativa de las bacterias encontradas.

586

587

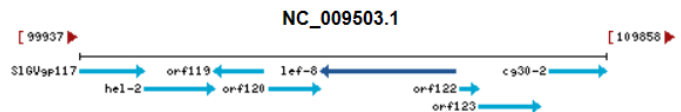
## 5.2. Detección por PCR y secuenciación parcial de los genes *lef-8*, *lef-9* y

588

*polh*

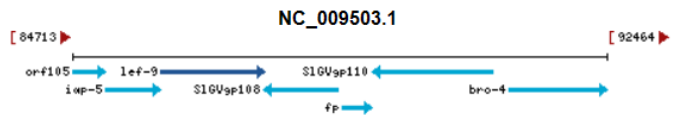
589

Sequence: NC\_009503.1 (104475..107024, complement)



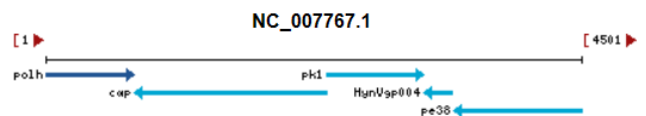
590

Sequence: NC\_009503.1 (85997..87508)



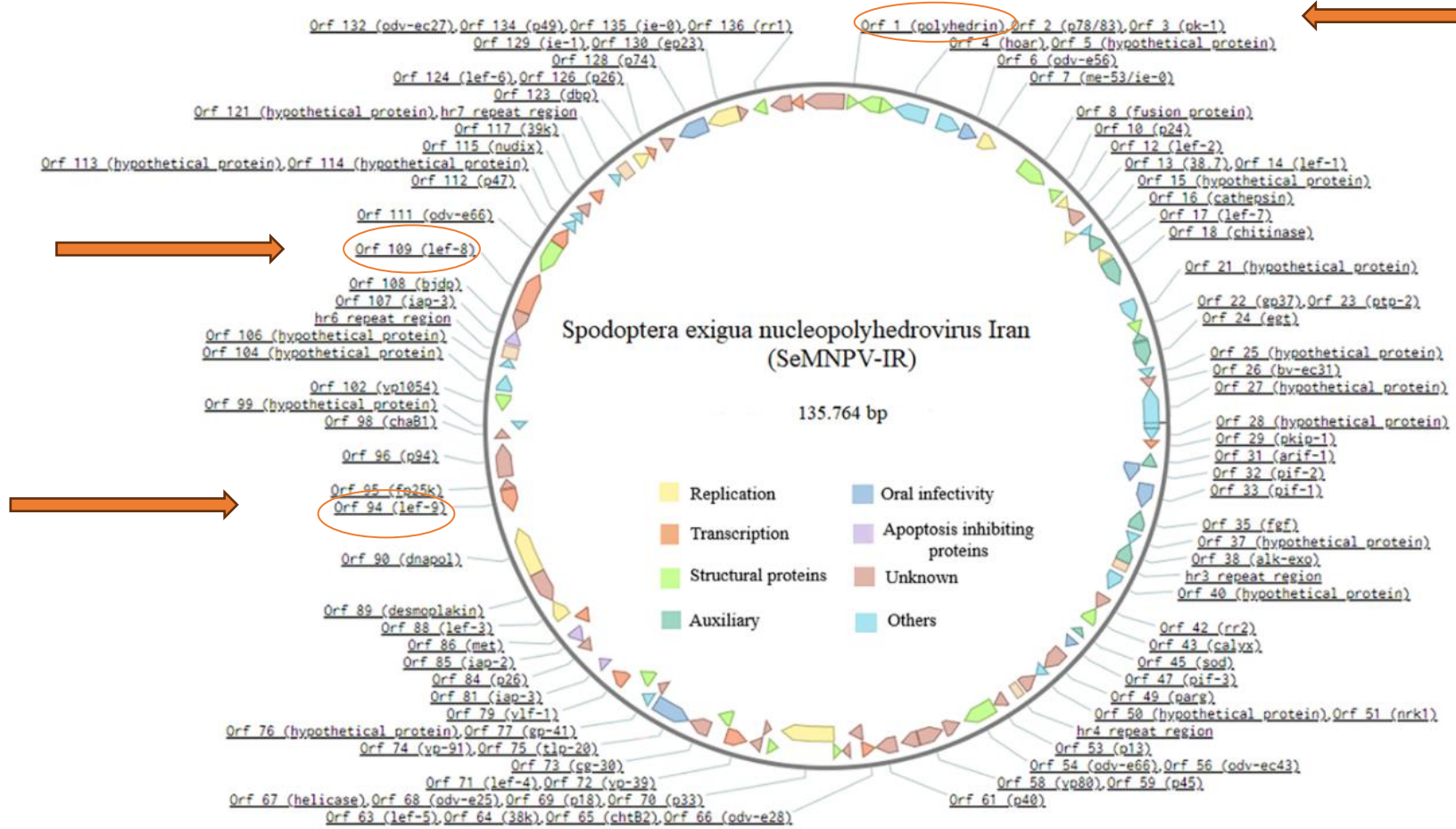
591

Sequence: NC\_007767.1 (1..738)



592

593



594

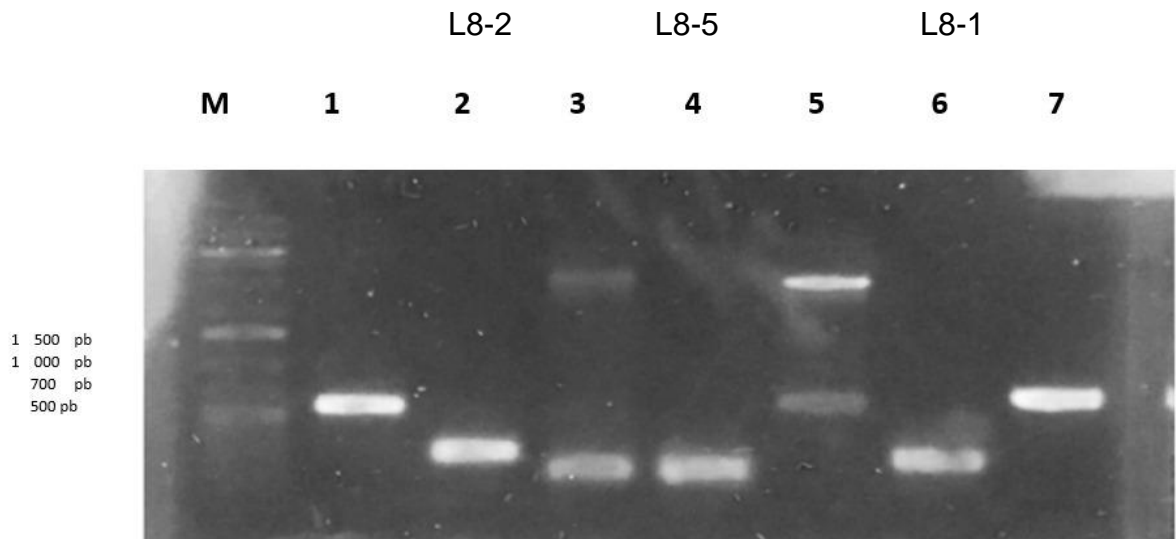
595

Figura 5 Contexto genómico y ubicación de los genes lef-8, lef-9 y polh en SeMNPV. (Eroglu & Karimi, 2023)

596 Con el estudio de diversidad bacteriana se descartó la presencia de bacterias  
597 entomopatógenas. Por lo tanto, el siguiente paso consistió en determinar si la causa  
598 de la muerte de las larvas estaba asociada a la presencia de baculovirus, y para lo  
599 cual se usó la metodología de PCR y la secuenciación parcial de genes de interés.  
600 Para esto, con el material genómico obtenido en las extracciones descritas  
601 anteriormente se procedió a la amplificación de algunos fragmentos de genes,  
602 utilizando cebadores para los genes *lef-8*, *lef-9* y *polh* que de acuerdo con (Jehle  
603 et al., 2006) se han utilizado para la clasificación taxonómica de baculovirus debido  
604 a que son genes altamente conservados y que se señala su ubicación en la Figura  
605 5. Con estos cebadores únicamente se lograron amplificar fragmentos para los  
606 genes *lef-8* (686 pb) y *polh* (540 pb), en la Figura 6 en la parte superior se muestran  
607 las amplificaciones de las muestras de PCR, donde se observan las amplificaciones  
608 del carril 1 al 7, con tamaños de muestra que van desde menos de las 500 pb hasta  
609 cerca de las 3 000 pb en algunos casos, en el primer carril vemos que se obtuvo un  
610 fragmento de alrededor de las 500 pb, en el segundo carril el tamaño obtenido  
611 estuvo entre 300 y 400 pb, para el tercer y cuarto carril las bandas más visibles  
612 estuvieron entre las 200 y 300 pb, en el quinto carril la banda superior fue la más  
613 visible siendo de alrededor de 3 000 pb, en el sexto carril la banda estuvo de nueva  
614 cuenta entre las 200 y 300 pb, para el séptimo carril la banda se localizó entre las  
615 500 y 700 pb. Por otra parte, en la parte inferior de la figura podemos ver tres  
616 corridas donde la primera se aprecia una banda tenue de alrededor de las 500 pb  
617 aunque esta corrida es altamente inespecífica, mientras que en la segunda banda  
618 pudimos observar una banda localizada entre las 700 y 1 000 pb, y para la tercer  
619 banda podemos observar que se encuentra cerca de las 700 pb, algunas muestras  
620 representativas, así como el tamaño de los fragmentos que se obtuvieron, sin  
621 embargo, de las *PCR* realizadas con los cebadores para el gen *lef-9*, no se lograron  
622 amplificar ningún fragmento relevante motivo por el cual se descartó para realizar la  
623 secuenciación. Mientras que los fragmentos L8-1 (379 pb), L8-2 (602 pb), L8-3 (175  
624 pb), L8-4 (246 pb), L8-5 (349 pb) se amplificaron utilizando cebadores para el gen  
625 *lef-8*.  
626

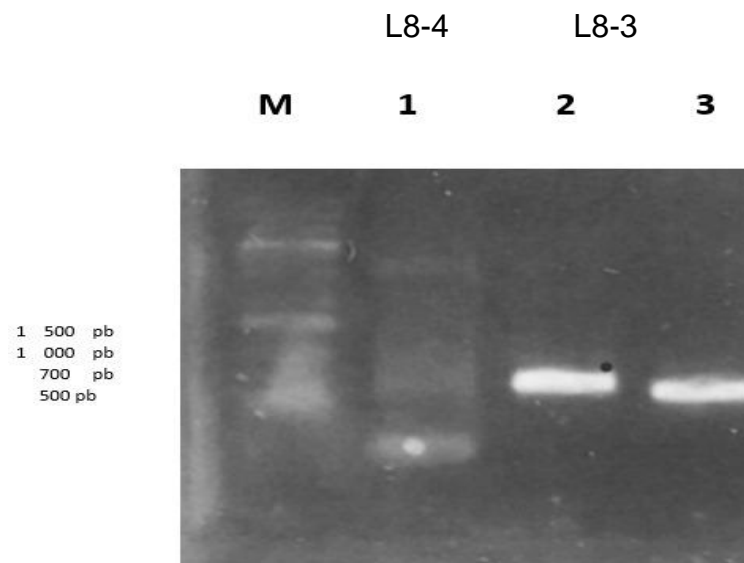


627



628

629



630

631

632

633

Figura 6 Gel de agarosa con los fragmentos amplificados donde se puede observar los tamaños de los fragmentos amplificados, donde se muestra la etiqueta de las muestras a analizar (L8-1, L8-2, L8-3, L8-4, L8-5).

634

635

636

637

638

639

Una vez que se obtuvieron los fragmentos correctamente amplificados se procedió a la secuenciación como se describió en la metodología y se utilizó la plataforma *BLAST* para su identificación mediante la comparación de su base de datos. Como resultado de esta comparación se obtuvo que algunos fragmentos secuenciados y con una muy baja cobertura de la secuencia eran similares principalmente con genes presentes en bacterias e insectos como *S. frugiperda*, esto se describe en el

640 Cuadro 4 donde se enlistan las características principales obtenidos de la  
641 secuenciación de estos fragmentos, donde se puede observar que ninguna de estas  
642 corresponde a fragmentos de material genético de baculovirus. Lo que demostró  
643 que al menos en este trabajo el método que se siguió no presentó una eficacia  
644 comprobable para la detección de baculovirus esto se puede deber a distintos  
645 factores entre los que destacan, la calidad del ADN de los baculovirus debido al flujo  
646 de trabajo utilizado para su extracción, a las características de los cebadores, ya  
647 que al ser degenerados pueden amplificar un mayor número de secuencias de  
648 manera inespecífica, de igual manera puede ser que no se encuentren baculovirus  
649 en nuestras muestras. Por tal motivo, la metodología de PCR y cebadores utilizados  
650 no permitió la detección de baculovirus. Con base en estos resultados se decidió  
651 utilizar una aproximación de análisis metagenómico.  
652

Cuadro 4 Resultados de la secuenciación de los fragmentos amplificados.

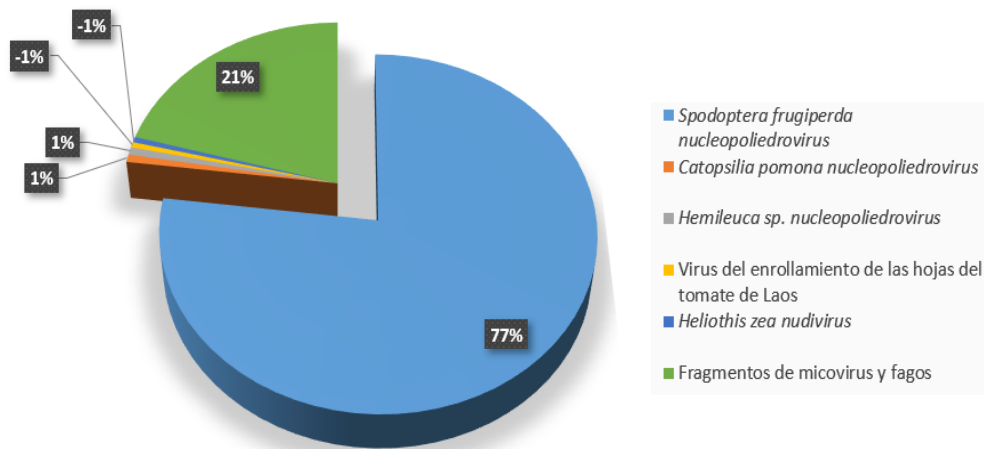
NOMBRE	TAMAÑO	DESCRIPCIÓN	PORCENTAJE DE COBERTURA (%)	PORCENTAJE DE IDENTIDAD (%)	NÚMERO DE ADHESIÓN
L8-1	379	Secuencia de <i>Spodoptera frugiperda</i>	15	100	FO681385.1
L8-2	602	ARNr 16S de bacteria no cultivada	6	100	FN678516.1
L8-3	1750	Construcción sintética clon de beta-lactamasa	12	96.79	KY726724.1
L8-4	246	<i>Spodoptera frugiperda</i> no caracterizada ARNm	32	98.77	XM_050707481.1
L8-5	349	<i>Pseudomonas putida</i>	57	98.00	CP101910.1
PH1	2386	<i>Cerastis rubricosa</i>	8	87.02	OX424531.1
PH2	1802	<i>Spodoptera frugiperda</i> ARNm	5	97.85	XM_050693354.1
PH3	1446	<i>Spodoptera frugiperda</i> CBA	9	83.10	FP340416.1
PH4	244	<i>Spodoptera frugiperda</i> ARNm	22	98.15	XM_050694141.1
PH5	367	<i>Cerastis rubricosa</i>	54	88.94	OX424531.1

654

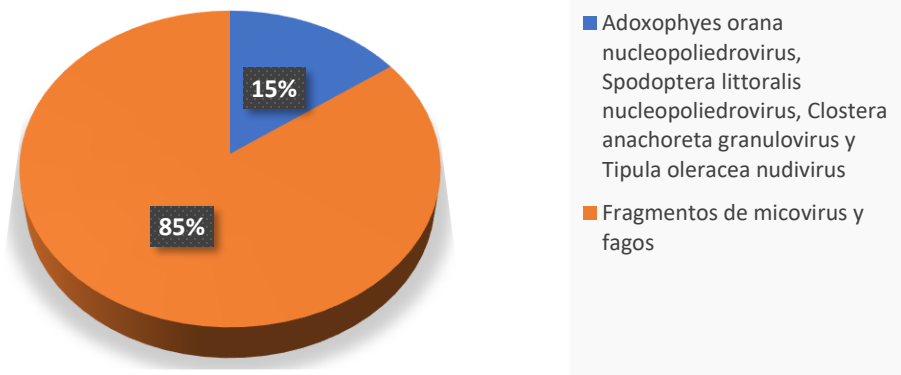
655 **5.3. Análisis metagenómico**

656 Al no lograr secuenciar el material genético de algún baculovirus mediante la técnica  
657 de PCR, la siguiente alternativa que se planteó fue la secuenciación masiva de  
658 fragmentos del genoma mediante un análisis metagenómico. Esto con el fin de  
659 establecer la población de bacterias y virus presentes en las larvas, y determinar si  
660 existe relación alguna con la muerte de estas. Esta caracterización se realizó  
661 mediante la técnica *Illumina* NGS, donde una vez obtenido el material genético se  
662 envió a la empresa Macrogen para su secuenciación y se utilizó la plataforma

663 *Bacterial and Viral Bioinformatics Resource* para el análisis bioinformático de las  
664 secuencias. Derivado de este análisis se obtuvo la abundancia relativa de virus y  
665 bacterias tanto en muestras de larvas sanas (LS1 y LS2), como de larvas muertas  
666 (LM1 y LM2). En el caso de los virus la abundancia relativa en larvas muertas fue  
667 del 1.48% y en larvas sanas fue del 0.004%. En la Figura 7 se describe que en las  
668 muestras de larvas muertas la abundancia relativa de los *Spodoptera frugiperda*  
669 nucleopoliedrovirus fue del 77%, de igual forma se encontraron lecturas  
670 correspondientes a *Catopsilia Pomona* nucleopoliedrovirus y de *Hemileuca* sp.  
671 nucleopoliedrovirus ambas con una abundancia relativa del 0.7% respectivamente,  
672 asimismo se detectaron lecturas relacionadas al virus del enrollamiento de las hojas  
673 del tomate de Laos, así como al *Heliothis zea* nudivirus ambas con una abundancia  
674 relativa del 0.5%, mientras que las lecturas restantes correspondieron a micovirus y  
675 fagos con una abundancia relativa del 20.6%. Por otra parte, en las muestras de  
676 larvas sanas se encontró una abundancia relativa de secuencias relacionadas a  
677 *Adoxophyes orana* nucleopoliedrovirus, *Spodoptera littoralis* nucleopoliedrovirus,  
678 *Clostera anachoreta* granulovirus y *Tipula oleracea* nudivirus demasiado baja que  
679 no pudo ser cuantificada, pero se estima de alrededor del 15%, el resto de las  
680 lecturas obtenidas están relacionadas con fragmentos de micovirus y fagos con una  
681 abundancia relativa del 85% en larvas vivas. Algunos trabajos como el realizado por  
682 (Tang et al., 2022) encontraron que al analizar el transcriptoma y metagenoma de  
683 larvas de *S. frugiperda* y *S. litura* los géneros más abundantes en las muestras  
684 fueron *Enterococcus*, Alphabaculovirus y *Corynebacterium*.  
685



686



687

688

Figura 7 Principales especies de virus encontrados en larvas muertas y sanas.

689 Si bien en un inicio no se tenía planteado que la muerte de las larvas estuviera  
 690 relacionada con la presencia de bacterias entomopatógenas debido a que derivado  
 691 de los análisis de diversidad bacteriana se descartó su presencia; al realizar el  
 692 análisis metagenómico se encontró que el mayor porcentaje del material genético  
 693 encontrado correspondía a bacterias de distintos géneros. En la Figura 8 se  
 694 describe la composición bacteriana de las muestras de larvas sanas y muertas  
 695 donde se determinó que principalmente se encontraba presente el género  
 696 *Enterococcus*, en específico *E. casseliflavus*, *E. flavescens* y *E. gallinarum* que en  
 697 conjunto mostraron una abundancia relativa del 85.5% en la muestra LS1, mientras  
 698 que el 14.5% restante de lecturas correspondió a distintas especies de  
 699 *Enterococcus* que no fue posible identificar.

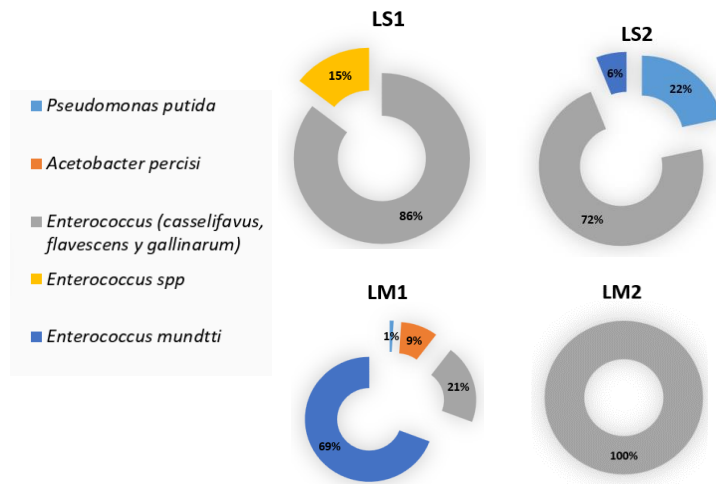


Figura 8 Principales especies bacterianas encontradas en larvas sanas y larvas muertas Larva Sana 1 (LS1), Larva Sana 2 (LS2), Larva Muerta 1 (LM1), Larva Muerta 2 (LM2).

700

701

702

703

704

705

706

707

708

709

710

711

712

713

714

715

716

717

718

En el mismo sentido en la muestra LS2 la abundancia relativa en conjunto de *E. casseliflavus*, *E. flavescens* y *E. gallinarum* fue de 72.4%, de igual forma se detectaron lecturas correspondientes a *E. mundtii* que mostró una abundancia relativa del 6%, también se detectó la presencia de *Pseudomonas putida* con una abundancia relativa del 21.6%, esto es similar a lo reportado por (Paniagua Voirol et al., 2018) donde describe que dentro del orden de los lepidopteros existen al menos 30 especies distintas que comparten en su microbioma varios géneros de bacterias principalmente aquellas que pertenecen a los géneros *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Staphylococcus*, *Enterobacter* y *Enterococcus*; sumado a esto (Yuning et al., 2022) describen que los géneros *Enterococcus* (20%), *Escherichia-Shigella* (7.84%), *Lactobacillus* (6.95%) y *Streptococcus* (6.29%) fueron los que presentaron mayor abundancia relativa en muestras del intestino de larvas de *S. frugiperda*. Derivado de lo anterior al ser las bacterias las que presentaron una mayor abundancia relativa se obtuvo más información lo que sirvió para realizar el ensamblaje de los genomas bacterianos presentes.

719 **6. CONCLUSIONES**

720

721 **6.1. Importancia de los resultados**

722 El identificar cuales fueron los principales géneros bacterianos y virales presentes  
723 en las muestras de larvas criadas en condiciones de laboratorio y obtenidas a partir  
724 de cultivos en el estado de Querétaro permite realizar una comparación contra las  
725 larvas sanas y establecer que géneros pueden estar relacionados con el aumento  
726 de la mortalidad de estas larvas.

727

728 **6.2. Importancia del método**

729 Si bien la amplificación de fragmentos genómicos ya sea para la caracterización de  
730 bacterias como lo es con la técnica del 16S rDNA, o el uso de cebadores específicos  
731 para la identificación de virus y bacterias permite la caracterización de manera  
732 rápida y económica, existen diversos factores que pueden interferir con la obtención  
733 de resultados como lo son la calidad de los primers, la calidad de la muestra e  
734 inclusive la habilidad del experimentador. Motivo por el cual el uso de nuevas  
735 técnicas como lo son los análisis metagenómicos para la caracterización del  
736 genoma completo de los organismos nos permite no solo identificar a los  
737 organismos que estamos buscando sino también conocer todos los  
738 microorganismos presentes y que pueden estar relacionados con la muerte de las  
739 larvas de *S. frugiperda*.

740

741 **6.3. Perspectivas.**

742 El realizar pruebas microbiológicas para evaluar que las larvas que se colectan de  
743 campo y que se utilizan para el establecimiento de pies de cría cuenten con un  
744 microbioma sano, se puede convertir en una excelente opción para garantizar que  
745 las colonias se desarrollen de manera estable sin que existan complicaciones  
746 causadas por agentes patógenos y aumenten su mortalidad.

747 **7. REFERENCIAS**

- 748 Ahissou, B. R., Sawadogo, W. M., & Bokonon-, A. H. (2021). Integrated pest  
749 management options for the fall armyworm *Spodoptera frugiperda* in West  
750 Africa: Challenges and opportunities . A review. *Biotechnol. Agron. Soc.*  
751 *Environ*, 25(3), 192–207.
- 752 Alfonso, M. (2002). Los plaguicidas botánicos y su importancia en la agricultura  
753 orgánica. *Agricultura Orgánica*, 2(1), 26–30.
- 754 Allsopp, P. G., Boyan, G. S., Daghish, G. J., Daly, J. C., Drake, V. A., Evans, M. L.,  
755 Fitt, G. P., Gregg, P. C., Gunning, R. V, & Jones, R. E. (2012). *Heliothis:*  
756 *research methods and prospects*. Springer Science & Business Media.
- 757 Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W., & Lipman, D. J. (1990). Basic local  
758 alignment search tool. *Journal of Molecular Biology*, 215(3), 403–410.  
759 [https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(05\)80360-2](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(05)80360-2)
- 760 Assefa, F. (2018). *Status of Fall Armyworm (Spodoptera Frugiperda), Biology and*  
761 *Control Measures on Maize Crop in Ethiopia: A Review*. 06(02).  
762 <https://doi.org/10.33687/entomol.006.02.2498>
- 763 Barrera, G. P., Belaich, M. N., Patarroyo, M. A., Villamizar, L. F., & Ghiringhelli, P.  
764 D. (2015). Evidence of recent interspecies horizontal gene transfer regarding  
765 nucleopolyhedrovirus infection of *Spodoptera frugiperda*. *BMC genomics*, 16(1),  
766 1–18.
- 767 Battu, G. S., Arora, R., & Dhaliwa, G. S. (2001). Prospects of baculoviruses in  
768 integrated pest management. En *Microbial biopesticides* (pp. 224–246). CRC  
769 Press.
- 770 Bhusal, S., & Chapagain, E. (2020). *Threats of fall armyworm ( Spodoptera*  
771 *frugiperda ) incidence in Nepal and it ' s integrated management -A review.*  
772 *January*. <https://doi.org/10.3126/janr.v3i1.27186>
- 773 Bulla, L. A., Costilow, R. N., & Sharpe, E. S. (1978). Biology of *Bacillus popilliae*.  
774 *Advances in Applied Microbiology*, 23(C), 1–18. [https://doi.org/10.1016/S0065-](https://doi.org/10.1016/S0065-2164(08)70063-7)  
775 [2164\(08\)70063-7](https://doi.org/10.1016/S0065-2164(08)70063-7)
- 776 Caballero, P., Williams, T., & López-Ferber, M. (2001). *Los baculovirus y sus*  
777 *aplicaciones como bioinsecticidas en el control biológico de plagas* (P.



778 Caballero, T. Williams, & M. López-Ferber, Eds.) [Book]. Phytoma-España.

779 Capinera, J. L. (2014). Fall army worm, *Spodoptera frugiperda* (JE Smith)(Insecta:  
780 Lepidoptera: Noctuidae). University of Florida/IFAS Extension. *Publication*  
781 *EENY-98. Available at: [http://entnemdept.ufl.edu/creatures/field/fall\\_armyworm.htm](http://entnemdept.ufl.edu/creatures/field/fall_armyworm.htm) (last access 24 March 2016).*

783 Caporaso, J. G., Kuczynski, J., Stombaugh, J., Bittinger, K., Bushman, F. D.,  
784 Costello, E. K., Fierer, N., Peña, A. G., Goodrich, J. K., & Gordon, J. I. (2010).  
785 QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. *Nature*  
786 *methods*, 7(5), 335–336.

787 Casmuz, A., Juárez, M. L., Socías, M. G., Murúa, M. G., Prieto, S., Medina, S.,  
788 Willink, E., & Gastaminza, G. (2010). Revisión de los hospederos del gusano  
789 cogollero del maíz, *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). *Revista de*  
790 *la Sociedad Entomológica Argentina*, 69(3–4), 209–231.

791 Casmuz, A., Juárez, M. L., Socías, M. G., Murúa, M. G., Prieto, S., Medina, S.,  
792 Willink, E., & Gastamiza, Gerardo. (2010). Revisión de los hospederos del  
793 gusano cogollero del maíz, *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae).  
794 *Revista de la Sociedad Entomológica Argentina*, 69(3–4), 209–231.

795 Charles, J.-F., Nielson-LeRoux, C., & Delécluse, A. (1996). *Bacillus Sphaericus*  
796 *Toxins: Molecular Biology and Mode of Action. Annual Review of Entomology*,  
797 41(1), 451–472. <https://doi.org/10.1146/annurev.en.41.010196.002315>

798 Chen, J., Ma, Y., Huang, S., Li, J., Zhang, Y., Wang, H., Qi, G., Shi, Q., Zhang, Z.,  
799 Yang, M., Chen, H., & Pang, R. (2023). The dynamics of the microbial  
800 community in fall armyworm *Spodoptera frugiperda* during a life cycle.  
801 *Entomologia Experimentalis et Applicata*. <https://doi.org/10.1111/eea.13282>

802 Chhetri, L. A. L. B., & Acharya, B. (2019). *Fall armyworm ( Spodoptera frugiperda ) :*  
803 *A threat to food security for south Asian country : Control and management*  
804 *options : A review. 4(1), 38–44.*

805 Chimweta, M., Nyakudya, I. W., & Jimu, L. (2019). Fall armyworm [ *Spodoptera*  
806 *frugiperda* ( J . E . Smith )] damage in maize : management options for flood-  
807 recession cropping smallholder farmers. *International Journal of Pest*  
808 *Management*, 0(0), 1–13. <https://doi.org/10.1080/09670874.2019.1577514>

809 Damalas, C. A., & Eleftherohorinos, I. G. (2011). *Pesticide Exposure , Safety Issues*  
810 *, and Risk Assessment Indicators.* 1402–1419.  
811 <https://doi.org/10.3390/ijerph8051402>

812 Day, R., Abrahams, P., Bateman, M., Beale, T., Clottey, V., Cock, M., Colmenarez,  
813 Y., Corniani, N., Early, R., Godwin, J., Gomez, J., Moreno, P. G., Murphy, S. T.,  
814 Phiri, N., Pratt, C., Silvestri, S., & Witt, A. (2017). *FALL ARMYWORM FALL*  
815 *ARMYWORM : IMPACTS AND IMPLICATIONS FOR AFRICA. 2016*(August).  
816 <https://doi.org/10.1564/v28>

817 Eroglu, G. B., & Karimi, J. (2023). Whole genome analysis of a novel Spodoptera  
818 exigua nucleopolyhedrovirus isolate (SeMNPV-IR) to Iran. *Biologia*, 78(9),  
819 2563–2574. <https://doi.org/10.1007/s11756-023-01399-2>

820 FAO. (2017). GESTION DURABLE DE LA CHENILLE LÉGIONNAIRE D '   
821 AUTOMNE EN AFRIQUE : PROGRAMME D ' ACTIONS DE LA FAO. *Division*  
822 *de la production végétale et de la protection des plantes.* [www.fao.org/food-](http://www.fao.org/food-chain-crisis/how-we-work/%0Aplant-protection/fall-armyworm)  
823 [chain-crisis/how-we-work/%0Aplant-protection/fall-armyworm](http://www.fao.org/food-chain-crisis/how-we-work/%0Aplant-protection/fall-armyworm)

824 FAO. (2019, abril 12). *La FAO intensifica la lucha contra el gusano cogollero del*  
825 *maíz | FAO | Food and Agriculture Organization of the United Nations; FAO.*  
826 <https://www.fao.org/resilience/noticias-eventos/historia-detalle/es/c/1257659/>

827 FAO. (2022, abril 21). *FAOSTAT.* <https://www.fao.org/faostat/es/#data/RP>

828 Fauquet, C. M., & Fargette, D. (2005). International Committee on Taxonomy of  
829 Viruses and the 3,142 unassigned species. *Virology Journal*, 2, 64.  
830 <https://doi.org/10.1186/1743-422X-2-64>

831 Fritsch, E., Undorf-Spahn, K., Kienzle, J., Zebitz, C. P. W., & Huber, J. (2005).  
832 Apfelwickler-granulovirus: erste Hinweise auf Unterschiede in der  
833 Empfindlichkeit lokaler Apfelwickler-populationen. *Nachrichtenblatt des*  
834 *Deutschen Pflanzenschutzdienstes*, 57(2), 29–34.

835 Gebreyesus-Gebreziher, H. (2020). Review on management methods of fall  
836 armyworm (*Spodoptera frugiperda* JE Smith) in Sub-Saharan Africa Arthropod-  
837 Plant Interaction View project push-pull technology for pest and soil fertility  
838 management View project Review on management methods of fall armyworm  
839 (*Spodoptera frugiperda* JE Smith) in Sub-Saharan Africa. *International Journal*

840 *of Entomology Research International Journal of Entomology Research*  
841 *www.entomologyjournals.com*, 5, 9–14. <http://www.entomologyjournals.com>  
842 Gomes, A. F. F., Omoto, C., & Cônsoli, F. L. (2020). Gut bacteria of field-collected  
843 larvae of *Spodoptera frugiperda* undergo selection and are more diverse and  
844 active in metabolizing multiple insecticides than laboratory-selected resistant  
845 strains. *Journal of Pest Science*, 93(2), 833–851.  
846 <https://doi.org/10.1007/s10340-020-01202-0>  
847 Gómez Valderrama, J., & Villamizar, L. (2013). Baculovirus: Hospederos y  
848 especificidad. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 15(2), 143–155.  
849 <https://doi.org/10.15446/REV.COLOMB.BIOTE.V15N2.41273>  
850 Harrison, R. D., Thierfelder, C., Baudron, F., Chinwada, P., Midega, C., Scha, U., &  
851 Berg, J. Van Den. (2019). *Agro-ecological options for fall armyworm (*  
852 *Spodoptera frugiperda* *JE Smith ) management: Providing low-cost ,*  
853 *smallholder friendly solutions to an invasive pest.* 243(May), 318–330.  
854 <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2019.05.011>  
855 Harrison, R. L., Herniou, E. A., Jehle, J. A., Theilmann, D. A., Burand, J. P., Becnel,  
856 J. J., Krell, P. J., van Oers, M. M., Mowery, J. D., & Bauchan, G. R. (2018). ICTV  
857 virus taxonomy profile: Baculoviridae. *Journal of General Virology*, 99(9), 1185–  
858 1186. <https://doi.org/10.1099/jgv.0.001107>  
859 Hitchman, R. B., Possee, R. D., & King, L. A. (2011). Protein Expression in Insect  
860 Cells. *Comprehensive Biotechnology, Second Edition*, 1, 323–340.  
861 <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-088504-9.00037-4>  
862 Hruska, A. J. (2019). Fall armyworm ( *Spodoptera frugiperda* ) management by  
863 smallholders Fall armyworm ( *Spodoptera frugiperda* ) management by  
864 smallholders. *CAB Reviews Perspectives in Agriculture Veterinary Science*  
865 *Nutrition and Natural Resources*, September.  
866 <https://doi.org/10.1079/PAVSNNR201914043>  
867 Jacas Miret, J. A., & Urbaneja, A. (2008). *Control biológico de plagas agrícolas.*  
868 Agropubli.  
869 Jehle, J. A., Lange, M., Wang, H., Hu, Z., Wang, Y., & Hauschild, R. (2006).  
870 Molecular identification and phylogenetic analysis of baculoviruses from

871 Lepidoptera. *Virology*, 346(1), 180–193.  
872 <https://doi.org/10.1016/j.virol.2005.10.032>

873 Jones, A. G., Mason, C. J., Felton, G. W., & Hoover, K. (2019). Host plant and  
874 population source drive diversity of microbial gut communities in two  
875 polyphagous insects. *Scientific Reports 2019* 9:1, 9(1), 1–11.  
876 <https://doi.org/10.1038/s41598-019-39163-9>

877 Kalha, C. S., Singh, P. P., Kang, S. S., Hunjan, M. S., Gupta, V., & Sharma, R.  
878 (2014). Entomopathogenic Viruses and Bacteria for Insect-Pest Control.  
879 *Integrated Pest Management: Current Concepts and Ecological Perspective*,  
880 225–244. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-398529-3.00013-0>

881 Kansiime, M. K., Mugambi, I., Rwomushana, I., Lamontagne-godwin, J., Rware, H.,  
882 Phiri, N. A., Chipabika, G., & Day, R. (2019). Farmer perception of fall  
883 armyworm ( *Spodoptera frugiperda* J . E . Smith ) and farm-level management  
884 practices in Zambia. *Wiley Online Library, February*.  
885 <https://doi.org/10.1002/ps.5504>

886 Kasoma, C., Shimelis, H., & Laing, M. D. (2020). Fall armyworm invasion in Africa :  
887 implications for maize production and breeding Fall armyworm invasion in  
888 Africa : implications for maize production and breeding. *Journal of Crop*  
889 *Improvement*, 00(00), 1–36. <https://doi.org/10.1080/15427528.2020.1802800>

890 Krejmer-Rabalska, M., Rabalski, L., Jukes, M. D., Lobo de Souza, M., Moore, S. D.,  
891 & Szewczyk, B. (2019). New Method for Differentiation of Granuloviruses  
892 (Betabaculoviruses) Based on Real-Time Polymerase Chain Reaction (Real-  
893 Time PCR). *Viruses*, 11(2), 115. <https://doi.org/10.3390/v11020115>

894 Leather, S. R., Walters, K. F. A., & Bale, J. S. (1995). *The ecology of insect*  
895 *overwintering*. Cambridge University Press.

896 Lipa, J. J. (2008). Lacey L.A., Kaya H.K. (Eds.). 2007. Field Manual of Techniques  
897 in Invertebrate Pathology. 2nd Edition. Application and Evaluation of Pathogens  
898 for Control of Insects and Other Invertebrate Pests. Springer, Dordrecht, 868  
899 pp. ISBN 978-1-4020-5932-2. *Journal of Plant Protection Research*, 48(4), 452.  
900 [http://www.plantprotection.pl/Lacey-L-A-Kaya-H-K-Eds-2007-Field-Manual-of-](http://www.plantprotection.pl/Lacey-L-A-Kaya-H-K-Eds-2007-Field-Manual-of-Techniques-in-Invertebrate-Pathology,92574,0,2.html)  
901 [Techniques-in-Invertebrate-Pathology,92574,0,2.html](http://www.plantprotection.pl/Lacey-L-A-Kaya-H-K-Eds-2007-Field-Manual-of-Techniques-in-Invertebrate-Pathology,92574,0,2.html)

902 Logares, R., Sunagawa, S., Salazar, G., Cornejo-Castillo, F. M., Ferrera, I.,  
903 Sarmiento, H., Hingamp, P., Ogata, H., de Vargas, C., Lima-Mendez, G., Raes,  
904 J., Poulain, J., Jaillon, O., Wincker, P., Kandels-Lewis, S., Karsenti, E., Bork, P.,  
905 & Acinas, S. G. (2014). Metagenomic 16S rDNA Illumina tags are a powerful  
906 alternative to amplicon sequencing to explore diversity and structure of microbial  
907 communities. *Environmental microbiology*, 16(9), 2659–2671.  
908 <https://doi.org/10.1111/1462-2920.12250>

909 Martínez-Martínez, L., Montaña-Montaña, A., Padilla-Cortes, E., & Roselia, J.-L.  
910 (2019). Daño a Maíz por Spodoptera frugiperda (J. E. Smith, 1797)  
911 (Lepidoptera: Noctuidae) y su muestreo en Oaxaca, México. *Entomología*  
912 *Agrícola*, 6, 236–241.

913 Miller, L. K. (1997). *The baculoviruses*. Springer Science & Business Media.

914 Montezano, D. G., Specht, A., Sosa-gómez, D. R., & Brasília, U. De. (2018). Host  
915 Plants of Spodoptera frugiperda ( Lepidoptera : Noctuidae ) in the Americas.  
916 *African Entomology*, 26, 286–300.

917 Muñoz-Benavent, M., Pérez-Cobas, A. E., García-Ferris, C., Moya, A., & Latorre, A.  
918 (2021). Insects' potential: Understanding the functional role of their gut  
919 microbiome. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 194, 113787.  
920 <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2020.113787>

921 Murúa, M. G., & Irla, E. V. (2004). Population parameters of Spodoptera Frugiperda  
922 (Smith) (Lep.: Noctuidae) fed on corn and two predominant grasses in Tucuman  
923 (Argentina). *Acta Zoológica Mexicana (nueva serie)*, 20(1), 199–210.

924 Murúa, M. G., Vera, M. T., Abraham, S., Juaréz, M. L., Prieto, S., Head, G. P., &  
925 Willink, E. (2008). Fitness and mating compatibility of Spodoptera frugiperda  
926 (Lepidoptera: Noctuidae) populations from different host plant species and  
927 regions in Argentina. *Annals of the Entomological Society of America*, 101(3),  
928 639–649. [https://doi.org/10.1603/0013-8746\(2008\)101\[639:FAMCOS\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1603/0013-8746(2008)101[639:FAMCOS]2.0.CO;2)

929 Murúa, M. G., Virla, E. G., & Defagó, V. (2003). Evaluación de cuatro dietas  
930 artificiales para la cría de “Spodopetera frugiperda” (Lep.: Noctuidae) destinada  
931 a mantener poblaciones experimentales de himenópteros parasitoide. *Boletín*  
932 *de sanidad vegetal. Plagas*, 29(1), 43–51.

- 933 Nava-Pérez, E., García-Gutiérrez, C., Camacho-Báez, J. R., & Vázquez-Montoya,  
934 L. E. (2012). Bioplaguicidas: una opción para el control biológico de plagas. *Ra*  
935 *Ximhai*.
- 936 Núñez, J. C. R., Ramírez, F. V., & Del Rincón Castro, C. (2014). Caracterización  
937 biológica y molecular de cepas exóticas de *Baculovirus SfNPV*, con actividad  
938 bioinsecticida hacia una población mexicana del gusano cogollero del maíz  
939 *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). *Interciencia*, 39(5), 320–326.
- 940 Ordóñez-García, M., Rios-Velasco, C., Berlanga-Reyes, D. I., Acosta-Muñiz, C. H.,  
941 Salas-Marina, M. Á., & Cambero-Campos, O. J. (2015). Occurrence of natural  
942 enemies of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) in Chihuahua,  
943 Mexico. *Florida Entomologist*, 843–847.
- 944 Pair, S. D., Raulston, J. R., Westbrook, J. K., And, W. W. W., & Adams, S. D. (1991).  
945 Fall Armyworm ( Lepidoptera : Noctuidae ) Outbreak Originating in the Lower  
946 Rio Grande. *The Florida Entomologist*, 74(2), 200–213.
- 947 Palma, L., Muñoz, D., Berry, C., Murillo, J., & Caballero, P. (2014). *Bacillus*  
948 *thuringiensis* Toxins: An Overview of Their Biocidal Activity. *Toxins*, 6(12),  
949 3296–3325. <https://doi.org/10.3390/toxins6123296>
- 950 Paniagua Voirol, L. R., Frago, E., Kaltenpoth, M., Hilker, M., & Fatouros, N. E.  
951 (2018). Bacterial Symbionts in Lepidoptera: Their Diversity, Transmission, and  
952 Impact on the Host. *Frontiers in Microbiology*, 9.  
953 <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2018.00556>
- 954 Piatek, M., Sheehan, G., & Kavanagh, K. (2020). Utilising *Galleria mellonella* larvae  
955 for studying in vivo activity of conventional and novel antimicrobial agents.  
956 *Pathogens and Disease*, 78(8), 1–13. <https://doi.org/10.1093/femspd/ftaa059>
- 957 Ramirez-Rodriguez, D., & Sánchez-Peña, S. R. (2016). Endophytic *Beauveria*  
958 *bassiana* in *Zea mays*: Pathogenicity against Larvae of Fall Armyworm ,  
959 *Spodoptera frugiperda*. *Society of Southwestern Entomologists DOI:*, 41(3),  
960 875–878.
- 961 Ramos-López, M. A., González-Chávez, M. M., Cárdenas-Ortega, N. C., Zavala-  
962 Sánchez, M. A., & Pérez-G, S. (2012). Activity of the main fatty acid components  
963 of the hexane leaf extract of *Ricinus communis* against *Spodoptera frugiperda*.

- 964 *African Journal of Biotechnology*, 11(18), 4274–4278.  
965 <https://doi.org/10.5897/ajb11.3727>
- 966 Ramos-López, M. A., Perez-G, S., Rodríguez-Hernández, C., Guevara-Fefer, P., &  
967 Zavala-Sánchez, M. A. (2010). Activity of *Ricinus communis* (Euphorbiaceae)  
968 against *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). *African Journal of*  
969 *Biotechnology*, 9(9), 1359–1365. <https://doi.org/10.5897/ajb10.1621>
- 970 Rioba, N. B., & Stevenson, P. C. (2020). Opportunities and Scope for Botanical  
971 Extracts and Products for the Management of Fall Armyworm (*Spodoptera*  
972 *frugiperda*) for Smallholders in Africa. *Plants*, 9(2).  
973 <https://doi.org/10.3390/PLANTS9020207>
- 974 Rohrmann, G. F. (2013). Baculovirus molecular biology, 3rd [Internet] ed. *National*  
975 *Center for Biotechnology Information, Bethesda, MD*. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK49500>.
- 977 Rozadilla, G., Cabrera, N. A., Virla, E. G., Greco, N. M., & McCarthy, C. B. (2020).  
978 Gut microbiota of *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) larvae as revealed by  
979 metatranscriptomic analysis. *Journal of Applied Entomology*, 144(5), 351–363.  
980 <https://doi.org/10.1111/JEN.12742>
- 981 Rwomushana, I., Bateman, M., Beale, T., Beseh, P., Cameron, K., Chiluba, M.,  
982 Clottey, V., Davis, T., Day, R., Early, R., Godwin, J., Gonzalez-Moreno, P  
983 Kansime, M., Kenis, M., Makale, F., Mugambi, I., Murphy, S., W, Nunda., Phiri,  
984 N., Pratt, C., & Tambo, J. (2018). Fall armyworm : impacts and implications for  
985 Africa. *CABI, October*.
- 986 Sauphanor, B., BERLING, M., TOUBON, J.-F., REYES, M., DELNATTE, J., &  
987 ALLEMOZ, P. (2006). Carpacase des pommes cas de résistance au virus de  
988 la granulose en vergers biologiques: Fruits et légumes. *Phytoma-La défense*  
989 *des végétaux*, 590, 24–27.
- 990 Sisay, B., Tefera, T., Wakgari, M., Ayalew, G., & Mendesil, E. (2019). The Efficacy  
991 of Selected Synthetic Insecticides and Botanicals against Fall Armyworm,  
992 *Spodoptera frugiperda*, in Maize. *insects*.  
993 <https://doi.org/10.3390/insects10020045>
- 994 Sosa-Gómez, D. R., Moscardi, F., Santos, B., Alves, L. F. A., & Alves, S. B. (2008).

995 Produção e uso de vírus para o controle de pragas na América Latina. *Controle*  
996 *Microbiano de Pragas na America Latina. FEALQ. Piracicaba, Brazil.*

997 Tang, R., Liu, F., Lan, Y., Wang, J., Wang, L., Li, J., Liu, X., Fan, Z., Guo, T., & Yue,  
998 B. (2022). Transcriptomics and metagenomics of common cutworm  
999 (Spodoptera litura) and fall armyworm (Spodoptera frugiperda) demonstrate  
1000 differences in detoxification and development. *BMC Genomics*, 23(1).  
1001 <https://doi.org/10.1186/s12864-022-08613-6>

1002 Torres, C., Alonso, C. A., Ruiz-Ripa, L., León-Sampedro, R., Campo, R. del, &  
1003 Coque, T. M. (2018). Antimicrobial Resistance in Enterococcus spp. of animal  
1004 origin. *Antimicrobial Resistance in Bacteria from Livestock and Companion*  
1005 *Animals*, 185–227. <https://doi.org/10.1128/9781555819804.CH9>

1006 Vatanparast, M., & Park, Y. (2022). Cold tolerance strategies of the fall armyworm,  
1007 Spodoptera frugiperda (Smith)(Lepidoptera: Noctuidae). *Scientific reports*,  
1008 12(1), 1–16.

1009 Villamizar, L., Cuartas, P., Gómez, J., Barrera, G. P., Espinel, C., & Lopez-Ferber,  
1010 M. (2018). *Virus entomopatógenos en el control biológico de insectos.*

1011 Villamizar, L., Cuartas, P., Gómez, J., Barrera, G. P., Espinel, C., & Lopez-ferber,  
1012 M. (2019). Contenido Virus entomopatógenos en el control biológico de  
1013 insectos Entomopathogenic viruses in the biological control of insects. *Control*  
1014 *biológico de fitopatógenos, insectos y ácaros*, 370–409.

1015 Wood, D. E., Lu, J., & Langmead, B. (2019). Improved metagenomic analysis with  
1016 Kraken 2. *Genome Biology*. <https://doi.org/10.1186/s13059-019-1891-0>

1017 Yigezu, G., & Wakgari, M. (2020). Local and indigenous knowledge of farmers  
1018 management practice against fall Local and indigenous knowledge of farmers  
1019 management practice against fall armyworm ( Spodoptera frugiperda ) ( J . E .  
1020 Smith ) ( Lepidoptera : Noctuidae ) : A review. *Journal of Entomology and*  
1021 *Zoology Studies*, January.

1022 Yuning, L., Luyang, L., Xueming, C., Xianmei, Y., Jintian, L., & Benshui, S.  
1023 (2022). The bacterial and fungal communities of the larval midgut of  
1024 Spodoptera frugiperda (Lepidoptera: Noctuidae) varied by feeding on two  
1025 cruciferous vegetables. *Scientific Reports* |, 12, 13063.



1026  
1027

<https://doi.org/10.1038/s41598-022-17278-w>