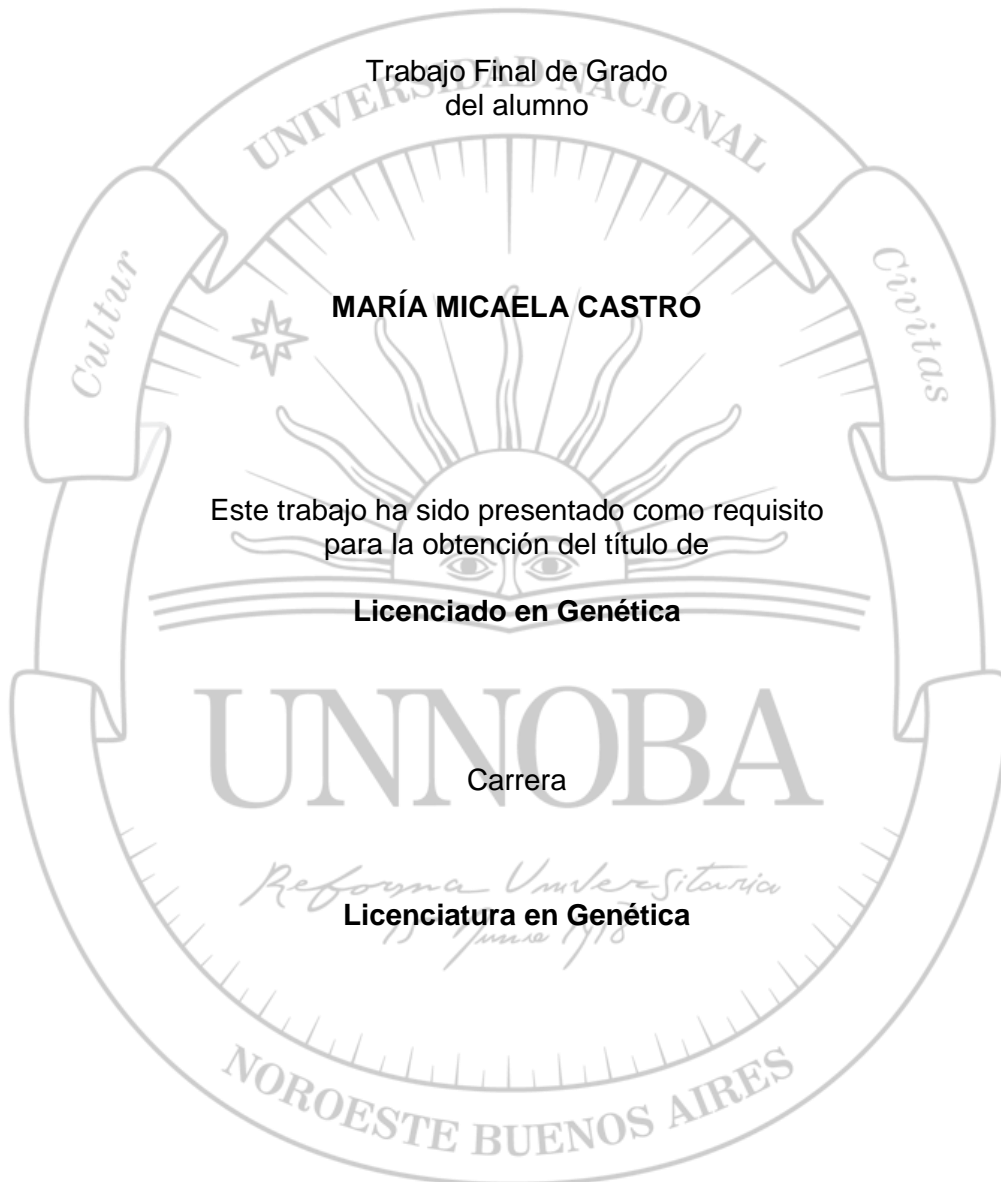


**ANÁLISIS METATRANSCRIPTÓMICO Y TRANSCRIPTÓMICO DEL TRACTO DIGESTIVO DE LARVAS DE SPODOPTERA FRUGIPERDA ALIMENTADAS CON SORGHUM HALEPENSE**



**Escuela de Ciencias Agrarias, Naturales y Ambientales.  
Universidad Nacional del Noroeste de la Provincia de Buenos Aires.**

Pergamino, 26 de Febrero de 2018.

**ANÁLISIS METATRANSCRIPTÓMICO Y TRANSCRIPTÓMICO DEL TRACTO  
DIGESTIVO DE LARVAS DE SPODOPTERA FRUGIPERDA ALIMENTADAS  
CON SORGHUM HALEPENSE**



**Susana M. Pistorale**

(Nombre y Apellido)  
**Evaluador**

**Silvina Goenaga**

(Nombre y Apellido)  
**Evaluador**

**Gabriela Fernández**

(Nombre y Apellido)  
**Evaluador**

(Nombre y Apellido)  
**Co-Director**

**Christina B. McCarthy**

(Nombre y Apellido)  
**Director**

**Escuela de Ciencias Agrarias, Naturales y Ambientales,  
Universidad Nacional del Noroeste de la Provincia de Buenos Aires**

Pergamino, 26 de Febrero de 2018.

## **AGRADECIMIENTOS**

En primer lugar, a mi familia que me apoyó durante todos estos años, que me banca en todo momento y siempre está conmigo.

A mis amigas de la vida Mica, Flor y Gabi, que son unas genias. Siempre me escucharon a la distancia y me alentaron.

Gracias infinitas a las amigas que me deja esta carrera, mi equipo, Fer, Meme, Majo, Guille, Cin y Marian, con las cuales compartí paso a paso este camino. Fueron mi sostén durante todo este tiempo y sin dudas no hubiera sido igual sin ellas.

Por último, gracias a mi directora, a Jor y a Gasti, excelentes personas que me enseñaron y ayudaron siempre con la mejor predisposición y buena energía.

Gracias a todos por cada abrazo, cada palabra de aliento u apoyo, y simplemente por ser parte de mi vida.

¡Los quiero!

## **ÍNDICE**

RESUMEN	<b>Pág. 5</b>
GLOSARIO	<b>Pág. 7</b>
SIGLAS UTILIZADAS	<b>Pág. 10</b>
INTRODUCCIÓN	<b>Pág. 11</b>
Daños ocasionados por <i>Spodoptera frugiperda</i> a los cultivos	<b>Pág. 11</b>
<i>Sorghum halepense</i>	<b>Pág. 12</b>
Biología de <i>Spodoptera frugiperda</i>	<b>Pág. 14</b>
Tracto digestivo de los insectos y membrana peritrófica	<b>Pág. 16</b>
Estrategias para el control de <i>S. frugiperda</i>	<b>Pág. 18</b>
Metatranscriptómica y transcriptómica: Herramientas para el desarrollo de agentes de biocontrol alternativos	<b>Pág.20</b>
ARN de interferencia como mecanismo para el control de plagas	<b>Pág. 21</b>
HIPÓTESIS	<b>Pág. 23</b>
OBJETIVOS	<b>Pág. 23</b>
Objetivo general	<b>Pág. 23</b>
Objetivo específico	<b>Pág. 23</b>
MATERIALES Y MÉTODOS	<b>Pág. 24</b>
RESULTADOS	<b>Pág. 29</b>
I- Metatranscriptoma	<b>Pág. 30</b>
I-a. Dominio Bacteria	<b>Pág. 30</b>
I-b. Dominio Eukarya	<b>Pág. 34</b>
I-b-i. Reino Animalia	<b>Pág. 35</b>
I-b-ii. Reino Plantae	<b>Pág. 37</b>
I-b-iii. Reino Fungi	<b>Pág. 39</b>
II- Transcriptoma	<b>Pág. 40</b>

DISCUSIÓN	<b>Pág. 44</b>
I- Metatranscriptoma	<b>Pág. 44</b>
I-a. Dominio Bacteria	<b>Pág. 45</b>
I-a-i. Phylum Firmicutes	<b>Pág. 46</b>
I-a-ii. Phylum Proteobacteria	<b>Pág. 49</b>
I-a-iii. Phylum Actinobacteria	<b>Pág. 50</b>
I-a-iv. Bacterias no cultivadas	<b>Pág. 51</b>
I-b. Dominio Eukarya	<b>Pág. 51</b>
I-b-i. Reino Animalia	<b>Pág. 52</b>
I-b-ii. Reino Plantae	<b>Pág. 53</b>
I-b-iii. Reino Fungi	<b>Pág. 53</b>
II- Transcriptoma	<b>Pág. 54</b>
CONCLUSIONES	<b>Pág. 59</b>
BIBLIOGRAFÍA	<b>Pág.61</b>
FIGURAS	
<i>Figura 1.</i> Grados de daño causados por GCM	<b>Pág. 12</b>
<i>Figura 2.</i> Oviposición de <i>S. frugiperda</i> .	<b>Pág. 14</b>
<i>Figura 3.</i> Ciclo de vida de <i>S. frugiperda</i> .	<b>Pág. 15</b>
<i>Figura 4.</i> Transformación del canal alimentario de un lepidóptero.	<b>Pág. 16</b>
<i>Figura 5.</i> Sitio de captura de las larvas de <i>S. frugiperda</i> .	<b>Pág. 25</b>
<i>Figura 6.</i> Flujo de trabajo utilizado.	<b>Pág. 27</b>
TABLAS	
<i>Tabla 1.</i> Agrupamiento manual de las categorías funcionales.	<b>Pág. 28</b>
<i>Tabla 2.</i> Resultados generales de las búsquedas por homología con todos los <i>contigs</i> .	<b>Pág. 29</b>
<i>Tabla 3.</i> Análisis de los <i>contigs</i> que presentaron homología con el Dominio	<b>Pág. 31</b>

Bacteria.

*Tabla 4.* Análisis de los *contigs* que presentaron homología con el Reino **Pág. 35**

Animalia.

*Tabla 5.* Análisis de los *contigs* que presentaron homología con el Reino **Pág. 37**

Plantae.

*Tabla 6.* Análisis de los *contigs* que presentaron homología con el Reino **Pág. 39**

Fungi.

*Tabla 7.* Análisis funcional de los *contigs* que presentaron homología con **Pág. 40**  
el Phylum Arthropoda.

## GRÁFICOS

*Gráfico 1.* Distribución general de los *contigs* asignados taxonómicamente. **Pág. 30**

*Gráfico 2.* Porcentaje de *contigs* asignados a cada una de las categorías **Pág. 43**  
funcionales en los distintos grupos taxonómicos.

## ANEXO

**Pág. 75**

*Tabla Suplementaria*

**Pág. 75**

## **RESUMEN**

*Spodoptera frugiperda* (Orden Lepidoptera, Familia Noctuidae) tiene una amplia distribución geográfica (desde Argentina hasta el sur de los Estados Unidos), y es una de las plagas que más daño causa a los cultivos de maíz en Argentina. Su control se realiza principalmente utilizando cultivos de maíz transgénico e insecticidas químicos, aunque su uso inadecuado ha llevado a que *S. frugiperda* desarrolle resistencia a ambos y, por ello, urge desarrollar estrategias de control alternativas. En este sentido, se sabe que muchos insectos obtienen su microbiota del ambiente circundante, y que estos microorganismos pueden influir en el ciclo de vida del insecto. Por otra parte, un inventario de la microbiota asociada, especialmente de especímenes silvestres, ayudaría a comprender su biología de manera más exhaustiva, y a desarrollar nuevas estrategias de control biológico.

Previamente a la realización de este trabajo se capturaron larvas de *S. frugiperda* de una fuente de alimentación alternativa, *Sorghum halepense*, una planta cianogénica, en la localidad de El Manantial (26°49'50''S, 65°16'59.4''O; Departamento de Lules, provincia de Tucumán) a 495 metros sobre el nivel del mar (m.s.n.m.). Posteriormente, se extrajo ARN total de intestinos de larvas de quinto estadio, y se lo sometió a un procedimiento de transcripción reversa y amplificación independiente de secuencia en un solo paso. La muestra se pirosecuenció y las lecturas obtenidas fueron pre-procesadas y ensambladas en *contigs*. Se realizaron búsquedas por homología con los *contigs* contra bases de datos del NCBI (nucleotídicas no redundante, 16S microbiana, y genomas secuenciados de lepidópteros; y proteica no redundante). Los resultados obtenidos fueron procesados con MEGAN (Huson *et al.*, 2007), y los perfiles taxonómicos y funcionales fueron contrastados y verificados con herramientas desarrolladas a medida. Los *contigs* correspondientes al metatranscriptoma mostraron homología con los Dominios Bacteria y Eukarya, entre los cuales se identificaron microorganismos que estarían estableciendo relaciones simbióticas con el hospedador, y otros que provendrían del ambiente

circundante. Por otra parte, el análisis del transcriptoma del hospedador reflejó los posibles efectos de *S. halepense* y de las condiciones ambientales sobre el perfil de expresión génica. En particular, se identificaron genes vinculados con detoxificación y otros relacionados con la protección de la larva de los compuestos tóxicos producidos por las plantas, que estaban sobre-representados respecto de otros genes identificados. Entre estos se identificaron varios genes que podrían actuar como blancos para el control de esta plaga mediante el uso de ARN de interferencia (ARNi). En conclusión, este estudio ha permitido obtener una visión integral de los posibles efectos de esta fuente alternativa de alimentación (*S. halepense*) y de las condiciones ambientales, sobre el transcriptoma del intestino de la larva de *S. frugiperda*, su metatranscriptoma asociado, y las interacciones entre ambos.



## GLOSARIO:

**NCBI** (*National Center for Biotechnology Information*): El Centro Nacional para la Información Biotecnológica almacena y constantemente actualiza la información referente a secuencias genómicas, artículos científicos de biomedicina, biotecnología, bioquímica, genética y genómica, además de otros datos biotecnológicos de relevancia en diversas bases de datos. Todas las bases de datos del NCBI están disponibles en línea de manera gratuita. Además el NCBI ofrece algunas herramientas bioinformáticas para el análisis de secuencias, siendo BLAST una de las más usadas.

([https://es.wikipedia.org/wiki/Centro\\_Nacional\\_para\\_la\\_Información\\_Biotecnológica](https://es.wikipedia.org/wiki/Centro_Nacional_para_la_Información_Biotecnológica))

**Número de acceso:** número asignado por el NCBI a las secuencias (nucleotídicas o proteicas) registradas en sus diferentes bases de datos.

(<https://support.ncbi.nlm.nih.gov/link/portal/28045/28049/Article/499/What-are-accession-numbers>)

**BLAST:** Algoritmo que encuentra regiones de similitud entre secuencias biológicas. El programa compara secuencias nucleotídicas o proteicas contra bases de datos de secuencias, y calcula la significancia estadística. (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)

**BLASTN:** Programa que realiza búsquedas en bases de datos nucleotídicas a partir de una secuencia nucleotídica interrogante. (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)

**BLASTX:** Programa que realiza búsquedas en bases de datos proteicas a partir de una secuencia interrogante nucleotídica traducida. (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)

**Contig:** Del inglés *Contig* (de *contiguous*). Corresponde a segmentos de [ADN](#) superpuestos que juntos representan una región consenso de ADN. (<https://es.wikipedia.org/wiki/Cóntigo>)

**E-value:** Del inglés *Expect value*. Es un parámetro que describe el número de secuencias (*hits*) que uno puede “esperar” encontrar por azar cuando se realiza una búsqueda en una base de datos de un tamaño determinado. Esencialmente, el *E-value* describe el ruido de fondo aleatorio. Cuanto más bajo el *E-value* (cuanto más cerca de cero), más significativa será la coincidencia.

([https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?CMD=Web&PAGE\\_TYPE=BlastDocs&DOC\\_TYP E=FAQ#expect](https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?CMD=Web&PAGE_TYPE=BlastDocs&DOC_TYP E=FAQ#expect))

**Hits:** Secuencias de las bases de datos que muestran una coincidencia significativa con la secuencia interrogante en las búsquedas por homología (es decir, resultados significativos), ya que presentan valores que están dentro de los establecidos como corte (por ejemplo, un *E-value* menor al establecido como valor de corte para este parámetro).

**Metatranscriptoma:** Es el estudio de la expresión de genes en una comunidad biológica. Corresponde al conjunto de los transcriptomas de los diferentes organismos que viven en un mismo ecosistema. (<https://es.wikipedia.org/wiki/Metatranscriptoma>)

**No hits:** Mensaje que arroja el programa cuando en las las búsquedas por homología no se encuentran secuencias en las bases de datos que tengan una coincidencia significativa con la secuencia interrogante (es decir, no hay resultados significativos), ya que todas presentan valores que están por fuera de los establecidos como línea de corte (por ejemplo, un *E-value* mayor al establecido como valor de corte para este parámetro).

**Script:** En informática, un *script*, archivo de órdenes, o archivo de procesamiento por lotes, es un programa usualmente simple que por lo regular se almacena en un archivo de texto plano. Habitualmente se utiliza para realizar diversas tareas como combinar componentes, interactuar con el sistema operativo o con el usuario. (<https://es.wikipedia.org/wiki/Script>)

**Transcriptoma:** Representa el material genético expresado en un tipo celular bajo determinadas condiciones (es decir, el ARNm transcrito en ciertas circunstancias).

(<https://es.wikipedia.org/wiki/Transcriptoma>)

## **SIGLAS UTILIZADAS:**

APN: Aminopeptidasa N

ARNdc: ARNs de doble cadena

ARNi: ARN de interferencia

BLAST: *Basic Local Alignment Search Tool*

CPs: Proteínas de la cutícula

GCM: Gusano Cogollero del Maíz (*Spodoptera frugiperda*)

HCN: Cianuro de hidrógeno

MP: Membrana peritrófica

SSG: Secuenciamiento de Siguiete Generación

## **INTRODUCCIÓN**

En Argentina existen numerosas plagas que producen pérdidas económicas significativas, y para las cuales el control con insecticidas y variedades resistentes es sólo un paliativo. Una de estas plagas es *Spodoptera frugiperda* (Orden Lepidoptera, Familia Noctuidae), o gusano cogollero del maíz (GCM), que tiene una amplia distribución geográfica desde Argentina hasta el sur de Estados Unidos de Norteamérica (EEUU). Debido a su carácter polífago, en el norte de nuestro país ataca a varios cultivos y, aunque el maíz (*Zea mays*) es su hospedante preferencial, también se encuentra comúnmente en sorgo granífero (*Sorghum bicolor*), alfalfa (*Medicago sativa*), y malezas como el pasto guinea (*Panicum maximum*) y el gramón (*Cynodon dactylon*) (Murúa *et al.*, 2009).

### ***Daños ocasionados por Spodoptera frugiperda a los cultivos***

Si bien los niveles de densidad con los que GCM ataca los cultivos de maíz son variables, siempre pone en riesgo su productividad (Murúa *et al.*, 2009). Su media de ataque ronda el 30%, aunque durante fechas tardías de siembra es posible registrar un 100% de plantas afectadas. Los daños en el maíz también dependen del estado fenológico, ya que cuando afecta a plantas jóvenes estos pueden ser totales (Murúa *et al.*, 2009). Más aún, el estado fenológico del cultivo también influye sobre el comportamiento de *S. frugiperda*, ya que actúa como cortadora durante la implantación del mismo pero, cuando el cultivo emerge, tiene preferencia por el cogollo. En este último caso, antes de llegar a perforar el cogollo, se alimenta de las hojas causándoles daños de diferente intensidad dependiendo del desarrollo de su aparato bucal (Leiva, 2014). Según la intensidad del daño se han descrito tres grados diferentes (Leiva, 2014) (Fig.1):

- Grado 1: sólo roen la epidermis de las hojas sin llegar a perforarlas, produciendo manchas translúcidas (Fig. 1(A)).

- Grado 2: comienza a observarse la presencia de aserrín o excrementos debido a una defoliación moderada de las hojas (Fig. 1(B)).
- Grado 3: los daños en el cogollo son intensos y comprometen a la planta; se observan larvas grandes y una gran cantidad de excrementos; las larvas consumen la lámina foliar ocasionando perforaciones irregulares, y migran hacia el cogollo para alimentarse y protegerse (Fig. 1(C)).

El daño más importante que causa la larva es en el cogollo. Hasta el estado de cuatro hojas del cultivo de maíz, *S. frugiperda* se alimenta de las hojas de la planta produciendo daños que pueden ser graves pero que no ocasionan su muerte, porque el ápice de crecimiento se encuentra por debajo del suelo. Pero cuando el maíz llega al estado de 4 a 6 hojas, la larva se alimenta del primordio apical y en este caso la planta muere (Leiva, 2014).



**Figura 1. Grados de daño causados por GCM.** (A) Grado 1 (fotografía tomada de Leiva, 2014); (B) Grado 2 (archivo del laboratorio); (C) Grado 3 (archivo del laboratorio).

### ***Sorghum halepense***

*Sorghum halepense* (etimología: *halepense* (latín), de la ciudad de Haleb (Aleppo) en Siria) es también conocido como sorgo de Alepo, sorguillo, maicillo, canutillo, pasto ruso, pasto polaco, cañota, y pasto Johnson (Burkart, 1969). Es una especie cosmopolita tetraploide ( $2n=4X=40$ ) que probablemente se originó en la región mediterránea del norte de África como resultado de una hibridación natural entre *Sorghum bicolor* ( $2n=20$ ) x

*Sorghum virgatum* (2n=20) (Bhatti *et al.*, 1960). Es una gramínea perenne de ciclo estival con un vigoroso sistema de rizomas, con un ciclo anual de desarrollo que inicia en primavera para la parte aérea, fructifica en verano y se multiplica a través de rizomas o semillas (Leguizamón, 2006).

Esta especie es considerada una de las peores malezas en 53 países que se ubican en un rango muy amplio de latitudes (55°N hasta 45°S), incluyendo Argentina (Holm *et al.*, 1977). En Argentina, al igual que en EEUU, fue introducida a principios del siglo pasado para ser utilizada como forrajera. Sin embargo, fue declarada plaga de la agricultura en 1930 debido a que es una planta invasora y, en 1951, se prohibió su siembra y multiplicación en todo el territorio nacional (Giordani y Miguens, 1978).

Además de ser una planta invasora, otra característica negativa del sorgo de Alepo es que pertenece a la familia de las plantas cianogénicas, que producen ácido cianhídrico o cianuro de hidrógeno (HCN), uno de los venenos más potentes y de efecto rápido que se conocen (Bretschneider *et al.*, 2011). Los sorgos (*Sorghum* spp.) se consideran los principales causantes de toxicidad en rumiantes, pudiendo ocasionar la muerte dentro de los 15 minutos de haber sido consumidos (Bretschneider *et al.*, 2011). El HCN es rápidamente absorbido y llega a los tejidos a través del torrente sanguíneo, donde bloquea la utilización del oxígeno inhibiendo la cadena respiratoria a nivel celular (Bretschneider *et al.*, 2011). El rol del HCN en las plantas no se conoce completamente, pero se cree que actuaría como un mecanismo de defensa contra las enfermedades, y la depredación por insectos y otros herbívoros. En la planta, el HCN se libera por cianogénesis, donde un glucósido cianogénico (no tóxico) interactúa con una enzima hidrolítica ( $\beta$ -glucosidasa). Sin embargo, debido a que ambos se encuentran en compartimentos diferentes de la planta, la ruptura de las células de la planta sería el paso necesario para que ambos compuestos interactúen y se libere el HCN.

Consecuentemente, cualquier factor que dañe la planta predispondrá a la formación de HCN y, por ende, a un mayor potencial tóxico de la misma.

### ***Biología de Spodoptera frugiperda***

El estado adulto de *S. frugiperda* presenta hábitos nocturnos, momento en el que las mariposas se movilizan hacia los cultivos para alimentarse, aparearse y oviponer. Cuando la densidad poblacional de GCM es baja, la hembra oviposita en el envés de las hojas (Fig. 2). Por el contrario, si la densidad poblacional es elevada, las hembras oviponen indiscriminadamente en toda la planta. Cada oviposición consta de unos pocos a cientos de huevos colocados en grupos y protegidos por una densa capa de escamas, que tardan 2 a 4 días en eclosionar (Sparks, 1979).

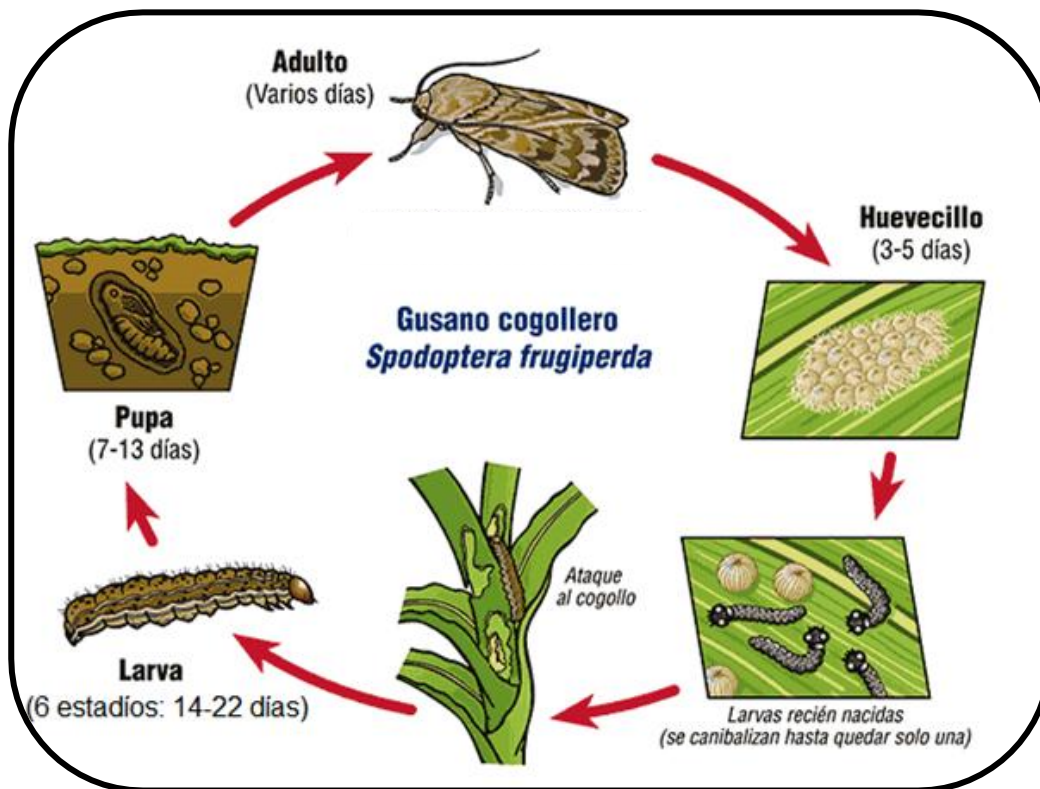


**Figura 2. Oviposición de *S. frugiperda*.** Masa de huevos ovipuesta por una hembra de *S. frugiperda* en el envés de una hoja de maíz (tomado de <http://www.agromonitoreo.com.ar/plagas/65/oruga-militar-tarda-spodoptera-frugiperda-presente-en-soja-y-maiz>).

En cuanto las larvas eclosionan, se alimentan de los anexos embrionarios y de la planta hospedadora, de la cual siguen alimentándose hasta el sexto estadio larval, luego



del cual empupan. El sexto estadio cae al suelo y se entierra a profundidades de 2,5 a 7,5 cm (Sparks, 1979). La pupa tarda 7 a 37 días en eclosionar en función de la temperatura media del suelo (Vickery, 1929). La totalidad del ciclo dura entre 28 y 90 días dependiendo de la temperatura ambiental (Sparks, 1979). El ciclo de vida completo de *S. frugiperda* se puede observar en la Figura 3.



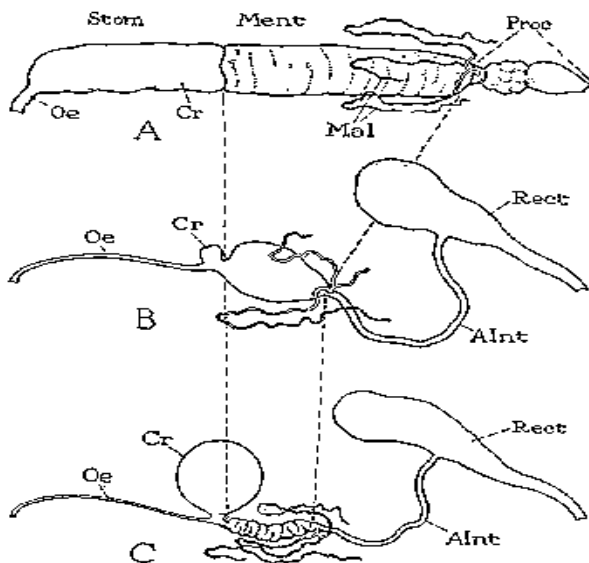
**Figura 3. Ciclo de vida de *S. frugiperda*** (Ilustración extraída de <https://www.croplifela.org/es/plagas/listado-de-plagas/gusano-cogollero>).

Existen al menos dos cepas o biotipos de GCM morfológicamente idénticas. El biotipo arroz, asociado al arroz, y el biotipo maíz, que predomina en maíz, sorgo y algodón, aunque esta especificidad con los hospedadores no es completamente exclusiva (Pashley, 1986; McMichael y Prowell, 1999; Virla *et al.*, 2008). Es fundamental tener en cuenta este aspecto a la hora de realizar el manejo y control de la plaga, dado que entre estas cepas existen diferencias fisiológicas y etológicas relacionadas con su resistencia a pesticidas, susceptibilidad a plantas transgénicas y adaptaciones nutricionales (Pashley,

1988a; Pashley, 1988b; Pashley *et al.*, 1995; Veenstra *et al.*, 1995; Adamczyk Jr. *et al.*, 1997).

### **Tracto digestivo de los insectos y membrana peritrófica**

El canal alimentario completo de los insectos tiene forma de tubo y se extiende a lo largo del cuerpo. Está constituido por tres secciones: el estomodeo o intestino anterior, el mesenterón o intestino medio, que es el estómago funcional, y el proctodeo o intestino posterior (Snodgrass, 1935). Durante la metamorfosis a menudo todo el tracto digestivo sufre alteraciones reconstructivas, tanto en su forma externa como en su estructura histológica (Fig. 4). Estos cambios permiten que jóvenes y adultos de una misma especie se adapten a los diferentes hábitos de alimentación (Snodgrass, 1935).



**Figura 4. Transformación del canal alimentario de un lepidóptero.** (A) Larva; (B) Pupa; (C) Imago o adulto. Stom, estomodeo; Ment, mesenterón; Proc, proctodeo; Oe, esófago; Cr, crop (parte posterior del esófago); Mal, túbulos de Malpighi; Rec, recto; AInt, intestino anterior (tomado de Snodgrass, 1935).

Mientras que los intestinos anterior y posterior de los insectos están protegidos por una capa de cutícula, en muchos insectos el epitelio del intestino medio está revestido por

una estructura semi-permeable llamada matriz o membrana peritrófica (MP). Entre las funciones cruciales que cumple la MP se encuentra la de proteger el epitelio intestinal del daño mecánico causado por las partículas de comida, del daño bacteriano, y de la invasión viral (Peters, 1992). En los insectos fitófagos la MP también puede protegerlos de los compuestos fenólicos tóxicos producidos por las plantas (Barbehenn, 2001). Se han descrito dos tipos de MP en insectos. La tipo I es sintetizada por todo el epitelio del intestino medio, y se encuentra mayormente en larvas de lepidópteros, aunque también se ha descrito en Coleoptera y Diptera (Barry *et al.*, 1999; Shen y Jacobs-Lorena, 1999; Tellam *et al.*, 1999; Bolognesi *et al.*, 2001; Shao *et al.*, 2001; Wijffels *et al.*, 2001; Hegedus *et al.*, 2009). La tipo II es sintetizada como una manga continua por el cardia (ubicado en la región anterior del intestino medio) (Tellam *et al.*, 1999), y se ha encontrado en Dermaptera, Isoptera, Embioptera, y larvas de Diptera (Ross *et al.*, 2000). La MP está compuesta por proteínas, proteoglicanos, glicoproteínas y quitina los cuales, en conjunto, conforman una estructura robusta y le aportan sus características semi-permeables y de protección (Wang y Granados, 2001). La quitina forma entre el 3-13% de la MP (De Mets y Jeuniaux, 1962; Zimmermann *et al.*, 1975; Becker, 1980), mientras que el resto está formado por una mezcla de proteínas, glicoproteínas y proteoglicanos. Las proteínas forman entre el 20-55% (De Mets y Jeuniaux, 1962; Ono y Kato, 1968; Zimmermann *et al.*, 1975; Becker, 1980; Adang y Spence, 1983), contribuyen a mantener las características estructurales y las funciones biológicas de la MP (Lehane y Billingsley, 1996; Tellam *et al.*, 1999), y se han clasificado en base al tipo de asociación que tienen con ella (Tellam *et al.*, 1999). Las proteínas tipo I y II están poco asociadas, se separan fácilmente con *buffers* a pH fisiológico y detergentes suaves, respectivamente, y probablemente corresponden a enzimas digestivas o a proteínas ingeridas. Las tipo III, conocidas también como peritrofinas, están fuertemente asociadas y sólo se separan mediante tratamientos con agentes caotrópicos fuertes, tales como urea o clorhidrato de guanidina, o detergentes

como dodecilsulfato sódico (SDS). En esta categoría también se encuentra la mucina intestinal de los insectos, que se ha descrito en al menos tres especies de lepidópteros, *Trichoplusia ni* (Wang y Granados, 1997b), *Plutella xylostella* (Sarauer *et al.*, 2003), y *Mamestra configurata* (Shi *et al.*, 2004). Por último, hay poca información sobre las proteínas tipo IV, aunque se sabe que permanecen unidas de manera covalente a la MP. En conclusión, cualquier alteración en la integridad de la MP puede resultar en efectos fisiológicos perjudiciales para el insecto e incluso puede causar su muerte, por lo cual esta estructura representa un blanco muy interesante para el biocontrol de plagas (Wang y Granados, 2001).

### ***Estrategias para el control de S. frugiperda***

El control de *S. frugiperda* en la actualidad se realiza principalmente con plaguicidas químicos, y plantas transgénicas que producen proteínas con propiedades insecticidas de *Bacillus thuringiensis* (*Bt*). Sin embargo, el prolongado uso de insecticidas ha hecho que *S. frugiperda* desarrolle resistencia a los mismos través de diversos mecanismos, incluyendo una mayor capacidad de detoxificación e insensibilidad del sitio diana (Yu *et al.*, 2003). A esto se suma el hecho de que las larvas están físicamente protegidas dentro del cogollo de la planta y generalmente tapadas con sus propios excrementos, por lo que los insecticidas las alcanzan con dificultad (García Roa *et al.*, 1999; Berta *et al.*, 2000; Clavijo y Greiner, 2000; Murúa *et al.*, 2009). Por otro lado, varias poblaciones nativas de *S. frugiperda* en Latinoamérica, incluyendo Argentina, han desarrollado resistencia al maíz transgénico *Bt* (Sosa y Vitti-Scarel, 2004; Storer *et al.*, 2010; Farias *et al.*, 2014; Monnerat *et al.*, 2015), por lo que los maíces transgénicos tampoco serían una solución para esta plaga. Adicionalmente, existe una creciente preocupación relacionada con el riesgo que conllevan los cultivos transgénicos en los ecosistemas naturales y los agroecosistemas (Groot y Dicke, 2002). En este sentido, se

desconocen los efectos que tienen los cultivos transgénicos sobre la dinámica poblacional de insectos no blanco (Virla *et al.*, 2009).

Una alternativa viable para el control de insectos plaga es la utilización de entomopatógenos, entre los cuales *Bt* es el más utilizado. Sin embargo, para el manejo de *S. frugiperda*, los productos comerciales a base de *Bt* tienen un efecto tóxico bajo a moderado (Maciel-Rosas *et al.*, 1994; del Rincón Castro *et al.*, 2006). Sumado a esto, los diferentes biotipos (arroz y maíz) presentan diferencias en su respuesta a insecticidas y/o *Bt* (Nagoshi y Meagher, 2004). En las poblaciones de *S. frugiperda* naturalmente se encuentran varios patógenos como virus, hongos, nematodos y protistas (Gardner *et al.*, 1984), pero sólo el baculovirus *Spodoptera frugiperda* Nucleopoliedrovirus (SfNPV) y algunos hongos (*Nomuraea rileyi*, *Entomophaga aulicae* y *Erynia radicans*) han causado epizootias naturales con alta morbilidad (Capinera, 1999). El más prevalente de estos agentes patógenos es SfNPV, aunque ha causado epizootias sólo esporádicamente y en zonas localizadas (Escribano *et al.*, 2000).

Entre los enemigos naturales de GCM se ha descrito una gran variedad de parasitoides en el área de Tucumán (Vera *et al.*, 1995; Virla *et al.*, 1999; Berta *et al.*, 2000; Murúa *et al.*, 2002; Murúa y Virla, 2003; Murúa *et al.*, 2006), que podrían resultar una valiosa estrategia de control, pero el uso generalizado de insecticidas químicos perjudica a todos los agentes de control biológico (Virla *et al.*, 1999). Entre los depredadores, la tijereta *Doru lineare* muestra una marcada preferencia por huevos y larvas de los primeros estadios de *S. frugiperda*, pero a partir del cuarto estadio la larva se defiende activamente impidiendo su depredación (Romero Sueldo De Escaño y Virla, 2009).

## ***Metatranscriptómica y transcriptómica: Herramientas para el desarrollo de agentes de biocontrol alternativos***

Las simbiosis que desarrollan los insectos con su microbiota intestinal resultan esenciales, ya que contribuyen a aumentar su viabilidad en el caso de dietas subóptimas, mejorar la eficiencia de digestión, adquirir enzimas digestivas, y proveer vitaminas, nitrógeno, aminoácidos específicos y esteroides (Cruden y Markovetz, 1987; Douglas, 1998). En el caso de los insectos fitófagos, los microorganismos contribuyen a superar las limitantes inherentes a la herbivoría (Jones, 1984; Berenbaum, 1988; Douglas, 1992), colaborando con la desintoxicación de aleloquímicos como flavonoides, taninos y alcaloides (Douglas, 1992; Bhat *et al.*, 1998). Los lepidópteros fitófagos representan uno de los taxones de insectos más extendidos y diversos, con más de 160.000 especies descritas (Krenn, 2010), y también son plagas importantes en la agricultura. A pesar de esto, hay bastante desconocimiento respecto de los microorganismos que establecen simbiosis con los lepidópteros, por lo que resulta difícil determinar el impacto que estos microorganismos podrían tener sobre su evolución y ecología (Chen *et al.*, 2016).

Debido al rápido desarrollo de las tecnologías de secuenciación de siguiente generación (SSG), un número cada vez mayor de estudios han confirmado la gran diversidad microbiana que se encuentra en el tracto digestivo, desde humanos (Huttenhower *et al.*, 2012) hasta hormigas (Poulsen y Sapountzis, 2012). Sin embargo, muy pocos análisis han evaluado los componentes metabólicamente activos de la microbiota intestinal (Shao *et al.*, 2014). Más aún, son más escasos los estudios que han integrado datos de expresión génica del hospedador con información de la microbiota asociada (McCarthy *et al.*, 2013; McCarthy *et al.*, 2015). Uno de estos análisis integrados utilizó la pirosecuenciación para estudiar los taxones asociados a *Lutzomyia longipalpis* (McCarthy *et al.*, 2011), vector de leishmaniasis visceral (LV), y para comparar los transcriptomas de diferentes especímenes adultos capturados en regiones endémica y no

endémica de LV (McCarthy *et al.*, 2013). Este secuenciamiento metatranscriptómico y transcriptómico proveyó el fundamento para analizar la significancia de posibles candidatos para el control biológico de este vector (McCarthy *et al.*, 2011; McCarthy *et al.*, 2013; Caligiuri *et al.*, 2014).

La transcriptómica permite identificar moléculas expresadas en un organismo entero o en un tejido particular. Más aún, en el caso de insectos plaga o vectores de enfermedades infecciosas, estos análisis no sólo permiten estudiar la biología del insecto, sino también identificar genes candidatos para su biocontrol. El análisis transcriptómico comparativo mencionado de especímenes de campo de *L. longipalpis* (McCarthy *et al.*, 2013), proveyó la primera descripción de genes expresados por este vector en su ambiente natural, y la estrategia utilizada permitió la comparación concomitante de datos de expresión génica con los taxones previamente encontrados y las condiciones ambientales. En particular, varios genes surgieron como posibles candidatos para control vectorial por ARN de interferencia (ARNi) (McCarthy *et al.*, 2013).

### ***ARN de interferencia como estrategia para el control de plagas***

El ARN de interferencia (ARNi) consiste en un mecanismo evolutivamente conservado que se desencadena por ARNs de doble cadena (ARNdc) y causa el silenciamiento de genes en forma secuencia específica (Hannon, 2002; Geley y Muller, 2004). El ARNdc es un atractivo y potencial bioinsecticida que no acarrea los efectos negativos de los insecticidas químicos. Específicamente, no presenta riesgos de acumulación en el ambiente dado que es rápidamente degradado por enzimas bacterianas ubicuas. Por otro lado, además de ser altamente secuencia-específico, puede ser diseñado para evitar su toxicidad hacia especies no blanco (Coy *et al.*, 2012). El proceso consiste en la aplicación exógena de ARNdc, el cual posteriormente es cortado en pequeños ARN de interferencia (siARN), los cuales hibridan con las regiones

complementarias del ARN mensajero endógeno (ARNm), causando su degradación e impidiendo de este modo que sea traducido a proteínas específicas (Mello y Conte, 2004). El silenciamiento de genes por ARNi puede inducirse experimentalmente mediante la aplicación de ARNdc por inyección, aplicación tópica o vía oral aunque, para el control de insectos, únicamente los métodos remotos (vía oral o aplicación tópica) son aplicables (Huvenne y Smagghe, 2010). Se han hecho varios estudios en diversos órdenes de insectos, incluyendo Lepidoptera (Mao *et al.*, 2007; Bautista *et al.*, 2009; Tian *et al.*, 2009), en los que el ARNdc se suministró oralmente con el objetivo de desarrollarlo como bioinsecticida. En otro estudio se demostró que el ARNdc puede ser aplicado en forma tópica como pesticida molecular en larvas de *Ostrinia furnalalis* (Wang *et al.*, 2011).



## **HIPÓTESIS**

Existen agentes candidatos para el control biológico de *S. frugiperda* que pueden ser identificados mediante análisis metatranscriptómico y transcriptómico de intestinos de larvas de esta plaga.

## **OBJETIVOS**

### ***Objetivo general***

Analizar el metatranscriptoma y transcriptoma de intestinos de larvas de *S. frugiperda*, principal plaga del maíz en Argentina, con el objetivo de identificar y analizar potenciales agentes de control biológico.

### ***Objetivos específicos***

1. Analizar el metatranscriptoma y el transcriptoma de intestinos de larvas de *S. frugiperda* provenientes de la provincia de Tucumán.
2. Identificar posibles candidatos de control biológico en el metatranscriptoma y en el transcriptoma de intestinos de larvas de *S. frugiperda*.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

En el laboratorio donde se desarrolló este trabajo (Laboratorio de Metagenómica de Microorganismos, CREG. FCE, UNLP), previamente se capturaron larvas de *S. frugiperda* de quinto estadio que se alimentaban de plantas de *S. halepense* a 495 m.s.n.m. (26° 49' 50"S, 65° 16' 59.4"O) en la provincia de Tucumán (Fig. 5). El ARN total extraído de los intestinos de estas larvas, fue sometido a un procedimiento de transcripción reversa y amplificación por PCR en un sólo paso modificado (Bohlander *et al.*, 1992; Sambade *et al.*, 2000). Posteriormente estas muestras fueron pirosecuenciadas (Margulies *et al.*, 2005) (Macrogen Inc., Corea) y las lecturas fueron pre-procesadas y ensambladas en *contigs* (McCarthy *et al.*, 2015). A partir de estos *contigs* se realizó el análisis taxonómico y funcional presentado en este trabajo.

5-A



5-B



**Figura 5. Sitio de captura de las larvas de *S. frugiperda*.** (A) La imagen muestra el lugar y el momento de captura de las larvas en la provincia de Tucumán. (B) Vista panorámica del lugar de captura.

Se realizaron búsquedas por homología utilizando BLAST (Altschul *et al.*, 1990), y estos resultados se procesaron con MEGAN (Huson *et al.*, 2011), versión 5\_7\_0. Este *software* utiliza los resultados obtenidos en las búsquedas por homología, para asignar unidades taxonómicas y funciones conocidas en base a la similitud de secuencia. MEGAN tiene como objetivo integrar el análisis taxonómico y funcional del conjunto de datos, permitiendo generar el perfil de expresión génica de la muestra.

Para llevar a cabo las búsquedas por homología, se descargaron localmente tres bases de datos nucleotídicas (nt: base de datos nucleotídica no redundante; 16S: 16S microbiana; y Lep: genomas completos (wgs) de lepidópteros secuenciados) y una base de datos proteica (nr: base de datos proteica no redundante) del NCBI. Las bases de datos nucleotídicas se unificaron en una única base de datos (nt+16S+Lep), y los *contigs* se analizaron con BLASTN (Altschul *et al.*, 1990) utilizando un *E-value* de  $1e-50$  como valor de corte. Para las búsquedas por homología contra la base de datos proteica (nr) se utilizó BLASTX (Altschul *et al.*, 1990), utilizando un *E-value* de  $1e-7$  como valor de corte. A

continuación se resume el flujo de trabajo llevado a cabo para analizar cada una de estas búsquedas por homología. Para facilitar su comprensión, la Figura 6 muestra un esquema de este flujo de trabajo:

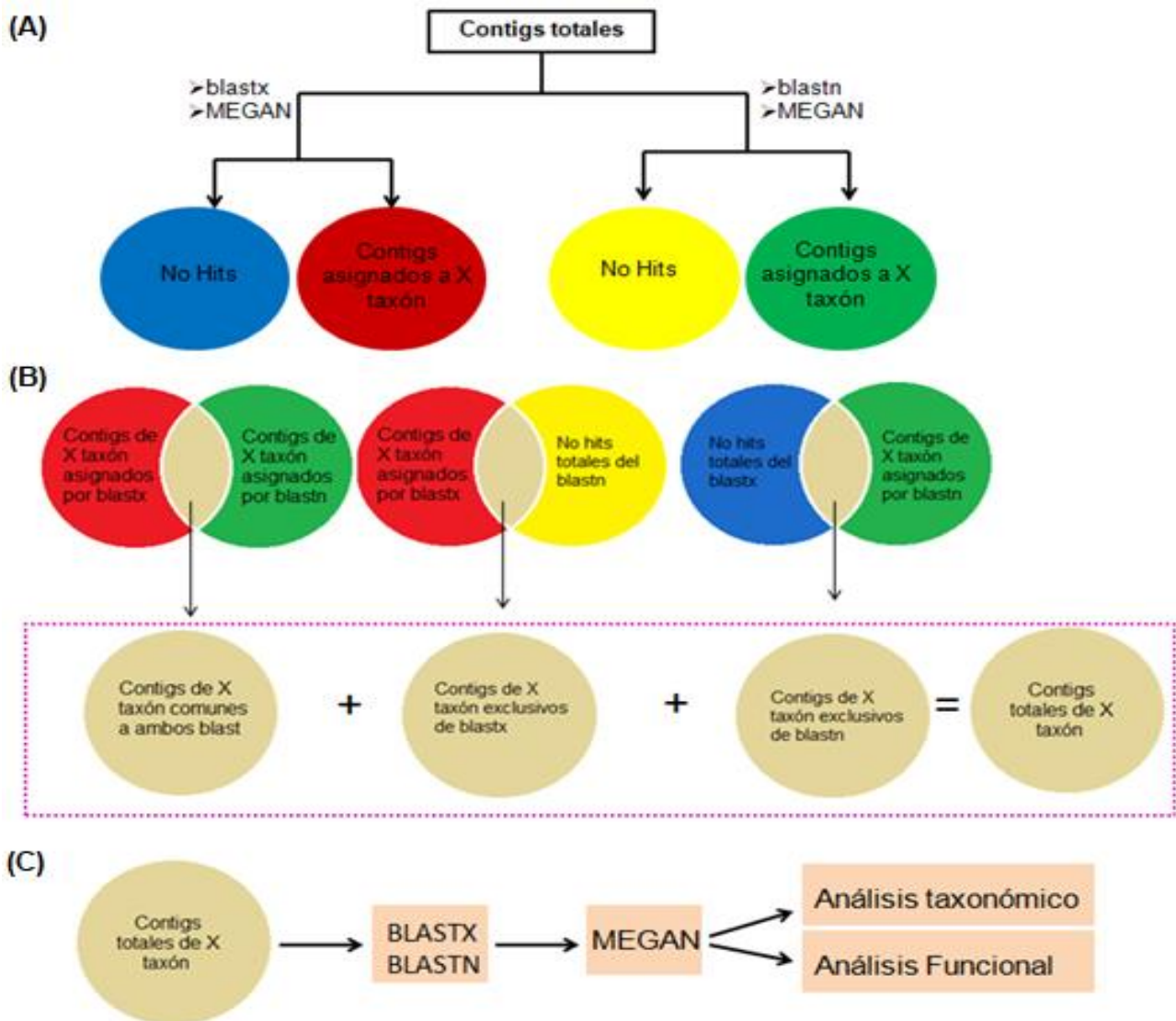
- 1- Los *contigs* asignados a cada taxón fueron extraídos con una función del MEGAN y luego comparados con un *script* hecho a medida (Wolfram Mathematica 7). En primer lugar se compararon los *contigs* asignados al mismo taxón en ambas búsquedas (BLASTN y BLASTX). Luego, se compararon los *contigs* asignados a ese taxón por BLASTN con la totalidad de los *contigs* para los que no se obtuvieron resultados con BLASTX (llamados *No hits*), y viceversa (Fig. 6-A).
- 2- Los *contigs* comunes obtenidos de estas tres comparaciones se sumaron, siendo éste el número de *contigs* totales para cada taxón (Fig. 6-B).
- 3- Finalmente, con los *contigs* totales de cada taxón se realizaron nuevas búsquedas por homología contra las bases de datos ya mencionadas. Estos resultados fueron procesados con MEGAN (Fig. 6-C).

Para realizar el análisis funcional se emplearon tres bases de datos de referencia, KEGG (Kanehisa *et al.*, 2008), COG (Tatusov *et al.*, 2003) y SEED (Overbeek *et al.*, 2005), las cuales se encuentran integradas a MEGAN. Debido a que las funciones asignadas por SEED, COG y KEGG no son las mismas, éstas fueron agrupadas manualmente en cuatro categorías para poder integrar el análisis funcional (Tabla 1):

- 1- Procesos celulares y ciclo celular;
- 2- Resistencia, estrés y respuesta ambiental;
- 3- Metabolismo y biosíntesis; y
- 4- Poco caracterizados.

La Tabla 1 indica cuál/es de las funciones pertenecientes a las tres bases de datos fue/ron incluída/s en cada una de estas categorías.





**Figura 6. Flujo de trabajo utilizado.** Esquema modificado a partir de Rozadilla (2016)

(A) La totalidad de los *contigs* fue sometida a búsquedas por homología utilizando BLAST. Los resultados obtenidos se procesaron con MEGAN.

(B) Los *contigs* asignados a cada taxón fueron extraídos y comparados, al igual que los *No hits*. Los *contigs* resultantes de las comparaciones, que son los de relevancia para el análisis, quedan representados en los gráficos como la intersección entre ambos grupos de *contigs* comparados. Éstos se suman y el resultado de esta suma constituye el total de *contigs* asignados a un taxón dado, el cual queda constituido entonces por:

- contigs de X taxón comunes a ambos BLAST: *contigs* que fueron asignados al mismo taxón por ambas búsquedas por homología (BLASTX y BLASTN);
- contigs de X taxón exclusivos de BLASTX: *contigs* que fueron asignados por BLASTX a un taxón, pero no pudieron ser asignados a un taxón por BLASTN (es decir, son *No Hit* en BLASTN);
- contigs de X taxón exclusivos de BLASTN: *contigs* que fueron asignados por BLASTN a un taxón, pero no pudieron ser asignados a un taxón por BLASTX (es decir, son *No Hit* en BLASTX).

(C) A cada uno de los grupos de *contigs* totales correspondientes a un X taxón determinado, se lo sometió a nuevas búsquedas por homología con BLASTX y BLASTN, y los resultados fueron nuevamente procesados con MEGAN, para así obtener el análisis taxonómico y funcional de cada grupo por separado.

**Tabla 1. Agrupamiento manual de las categorías funcionales.** Categorías funcionales en las que se agruparon manualmente las funciones anotadas por SEED, COG y KEGG, para poder integrar los resultados del análisis funcional.

<b>Categorías</b>	<b>SEED</b>	<b>COG</b>	<b>KEGG</b>
<b>Procesos celulares y ciclo celular</b>	<i>Cofactores, vitaminas, grupos prostéticos y pigmentos</i>	<i>Procesamiento y almacenamiento de información</i>	<i>Procesamiento de información genética</i>
	<i>Transporte de membrana</i>	<i>Procesos celulares y señalización</i>	<i>Procesos celulares</i>
	<i>Motilidad y quimotaxis</i>	-	<i>Sistemas orgánicos</i>
<b>Resistencia, estrés y respuesta ambiental</b>	<i>Virulencia, enfermedad y defensa</i>	-	<i>Enfermedades humanas</i>
	<i>Virulencia</i>	-	-
	-	-	<i>Procesamiento de información ambiental</i>
<b>Metabolismo y biosíntesis</b>	<i>Aminoácidos y derivados</i>	<i>Metabolismo</i>	<i>Metabolismo</i>
	<i>Metabolismo secundario</i>	-	-
	<i>Metabolismo de ARN</i>	-	-
	<i>Metabolismo de compuestos aromáticos</i>	-	-
	<i>Metabolismo de proteínas</i>	-	-
	<i>Fotosíntesis</i>	-	-
	<i>Pared celular</i>	-	-
	<i>Hidratos de carbono</i>	-	-
	<i>Respiración</i>	-	-
<b>Poco caracterizados</b>	<i>Misceláneo</i>	<i>Poco caracterizado</i>	-
	<i>Subsistemas basados en clustering</i>	-	-

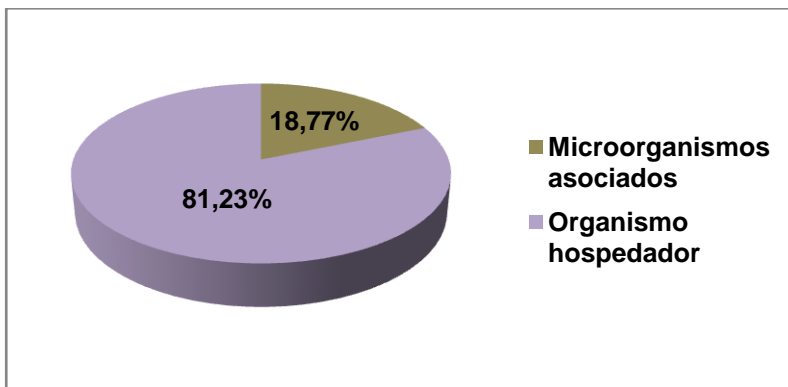
## **RESULTADOS**

La pirosecuenciación del ARN total extraído de intestinos de larvas de *S. frugiperda* generó un total de 168.786 lecturas (McCarthy *et al.*, 2015). El ensamblado posterior de estas lecturas dio como resultado un total de 420 *contigs*. Mediante el flujo de trabajo descrito se determinó que, del total de 420 *contigs*, no se obtuvieron resultados para 159 *contigs* en las búsquedas por homología (*No hits*; 37,86%), mientras que los 261 *contigs* restantes fueron asignados a diversos Phyla (62,14%) (Tabla 2) y, por lo tanto, se continuó el análisis con estos últimos.

**Tabla 2. Resultados generales de las búsquedas por homología con todos los *contigs*.**

<b><i>Contigs</i></b>	<b>Número de <i>contigs</i></b>	<b>Porcentaje (%)</b>
<b><i>Asignados</i></b>	261	62,14
<b><i>No Hits</i></b>	159	37,86
<b><i>Totales</i></b>	420	100

El análisis de los 261 *contigs* que fueron asignados taxonómicamente, permitió determinar que 212 de ellos (81,23%) presentaron homología con el Phylum Arthropoda y, por lo tanto, corresponden al transcriptoma del organismo hospedador (*S. frugiperda*). Los 49 *contigs* restantes (18,77%) mostraron homología con otros Phyla, y corresponden a los organismos asociados a *S. frugiperda* (su metatranscriptoma) (Gráfico 1).



**Gráfico 1.** Distribución general de los *contigs* asignados taxonómicamente.

### **I- Metatranscriptoma**

Esta sección incluye el análisis taxonómico y funcional de los *contigs* correspondientes a los taxones asociados a intestinos de *S. frugiperda*.

De los 49 *contigs* asignados al metatranscriptoma, 21 *contigs* (8,04%) correspondieron al Dominio Bacteria, y los 28 *contigs* restantes (10,73%) al Dominio Eukarya.

#### ***I-a. Dominio Bacteria***

El análisis taxonómico comparativo de los 21 *contigs* que presentaron homología con el Dominio Bacteria (Tabla 3), reveló que 8 de ellos (38,10%) correspondían al Phylum Firmicutes, 6 (28,57%) al Phylum Proteobacteria, 5 (23,81%) al Phylum Actinobacteria, y 2 (9,52%) a bacterias no cultivadas. Las bacterias se identificaron mayormente por homología a proteínas caracterizadas (11 *contigs*), en segundo lugar a proteínas hipotéticas o no caracterizadas (8 *contigs*) y por último a ARNr (2 *contigs*). La asignación funcional sólo se pudo realizar en base a los 11 *contigs* que mostraron homología con proteínas caracterizadas (ver más adelante).



En el Phylum Firmicutes se identificaron 7 tipos bacterianos diferentes, 6 de los cuales mostraron homología a nivel de especie: *Ruminococcus obeum* (proteína hipotética, *contig* 14), *Streptococcus mutans* (proteína hipotética, *contig* 394), *Heliobacterium modesticaldum* (proteína hipotética, *contig* 114), *Carnobacterium maltaromaticum* (23S ARNr, *contig* 216), *Enterococcus faecalis* (*manganese ABC transporter substrate-binding lipoprotein*, *contig* 272), *Streptococcus suis* (secuencias genómicas, *contig* 391), y 1 a nivel de familia: *Erysipelotrichaceae bacterium* (proteína no caracterizada, *contig* 17) (Tabla 3).

En el Phylum Proteobacteria se identificaron 5 tipos bacterianos diferentes, 4 de los cuales mostraron homología a nivel de especie: *Xanthomonas citri* (*exodeoxyribonuclease VII large subunit*, *contig* 151), *Escherichia coli* (secuencias genómicas, *contig* 189), *Xanthomonas fuscans* (*alpha-amylase*, *contig* 93), *Erwinia amylovora* (proteína hipotética, *contig* 53) y 1 a nivel de familia: *Nitrosomonadaceae bacterium* (*ammonia monooxygenase subunit A (amoA) gene*, *contigs* 233 y 252) (Tabla 3).

En el Phylum Actinobacteria se identificó un solo tipo bacteriano a nivel de especie, *Streptomyces rimosus*, en todos los casos por homología con proteínas caracterizadas (Tabla 3).

En cuanto a las dos bacterias no cultivadas, se identificaron por homología con una proteína caracterizada (*ammonia monooxygenase*, *contig* 257) y con ARNr (*contig* 141) (Tabla 3).

**Tabla 3. Análisis de los *contigs* que presentaron homología con el Dominio Bacteria.** La tercer y cuarta columnas muestran los resultados de las búsquedas por homología contra las bases de datos proteica (nr) y nucleotídica (nt+16S+Lep), respectivamente. Las celdas coloreadas en amarillo muestran los *hits* seleccionados en base a sus *E-value* (o porque una de las bases de datos no dio resultados significativos). La última columna muestra la categoría funcional a la cual fue asignado cada *contig* (los colores de cada categoría funcional se corresponden con los de la Tabla 1).

Phylum	Contig	Resultado BLASTX (Hit y E-value)	Resultado BLASTN (Hit y E-value)	Categoría funcional
Firmicutes (8)	14	ref WP_005421827.1  hypothetical protein [ <b>Ruminococcus</b> <i>obeum</i> ]; Expect = 2e-020	>gi 470485256 ref NR_07 6692.1  <i>Bacillus</i> <i>selenitireducens</i> MLS10 strain MLS10 23S ribosomal RNA; Expect = 5e-064	
	17	ref WP_022299945.1  uncharacterized protein [ <b>Erysipelotrichaceae</b> <i>bacterium</i> CAG:64]; Expect = 8e-012	No Hit	
	216	ref WP_005920085.1  hypothetical protein [ <b>Faecalibacterium</b> <i>prausnitzii</i> ]; Expect = 4e-028	>gi 485099165 ref NR_10 2559.1  <b>Carnobacterium</b> <i>maltaromaticum</i> LMA28 23S ribosomal RNA; Expect = 0.0	
	272	ref WP_016634792.1  manganese ABC transporter substrate- binding lipoprotein [ <b>Enterococcus</b> <i>faecalis</i> ]; Expect = 9e-011	No Hit	Resistencia, estrés y respuesta ambiental
	391	ref WP_009569271.1  hypothetical protein [ <b>Streptococcus</b> <i>intermedius</i> ]; Expect = 2e-034	>gi 556048476 gb CP006 246.1  <b>Streptococcus</b> <i>suis</i> T15, complete genome; Expect = 0.0	
	394	ref WP_002296576.1  hypothetical protein, partial [ <b>Streptococcus</b> <i>mutans</i> ]; Expect = 5e-009	No Hit	
	54	ref WP_002296576.1  hypothetical protein, partial [ <b>Streptococcus</b> <i>mutans</i> ]; Expect = 7e-011	No Hit	
	114	>gi 167630419 ref YP_0 01680918.1  hypothetical protein HM1_3149 [ <b>Heliobacterium</b> <i>modesticaldum</i> lce1]; Expect = 2e-011	>gi 59895272 gb AY8980 11.1  Uncultured organism clone MC0611c2 small subunit ribosomal RNA gene; Expect = 9e-151	
	151	ref WP_003485997.1  exodeoxyribonuclease VII large subunit [ <b>Xanthomonas</b> <i>citri</i> ]; Expect = 7e-052	>gi 471209079 gb CP003 778.1  <b>Xanthomonas</b> <i>citri</i> subsp. <i>citri</i> Aw12879, complete genome; Expect = 0.0	Procesos celulares y ciclo celular
	189	ref WP_021537165.1  hypothetical protein	>gi 557270520 emb HG7 38867.1  <b>Escherichia coli</b>	

Proteobacteria (6)		[ <i>Escherichia coli</i> ]; <b>Expect</b> = 6e-023	str. K-12 substr; <b>Expect</b> = 0.0	
	93	ref WP_007968731.1  alpha-amylase [ <i>Xanthomonas fuscans</i> ]; <b>Expect</b> = 1e-059	>gi 549143970 emb FO681494.1  <i>Xanthomonas fuscans</i> subsp. <i>fuscans</i> str. 4834-R, chromosome; <b>Expect</b> = 0.0	Metabolismo y biosíntesis
	53	ref NP_758764.1  hypothetical protein pEA28_01 [ <i>Erwinia amylovora</i> ATCC BAA-2158]; <b>Expect</b> = 1e-021	>gi 125971770 gb EF205336.1  Expression vector pASS2SUL, complete sequence; <b>Expect</b> = 4e-077	
	233	gb AGO18999.1  AmoA, partial [uncultured <i>Nitrosomonadaceae</i> bacterium]; <b>Expect</b> = 2e-037	gi 392600238 gb JQ865514.1 Uncultured ammonia - oxidizing bacterium clone TH0106073_813_M13F(-47) amoA gene, partial; <b>Expect</b> = 0.0	Procesos celulares y ciclo celular
	252	gb AGO19189.1  AmoA, partial [uncultured <i>Nitrosomonadaceae</i> bacterium]; <b>Expect</b> = 2e-068	gi 381144745 gb JQ277629.1  Uncultured bacterium clone TH0929980_2-48_M13F(-47) ammonia monooxygenase subunit A (amoA) gene, partial cds; <b>Expect</b> = 0.0	Procesos celulares y ciclo celular
Actinobacteria (5)	168	ref WP_003981095.1  acyl-CoA dehydrogenase [ <i>Streptomyces rimosus</i> ]; <b>Expect</b> = 2e-047	>gi 178462309 dbj AP009493.1  <i>Streptomyces griseus</i> subsp. <i>griseus</i> , complete genome; <b>Expect</b> = 1e-132	Metabolismo y biosíntesis
	317	ref WP_003982821.1  putative cytochrome P450 hydroxylase [ <i>Streptomyces rimosus</i> ]; <b>Expect</b> = 4e-013	No Hit	Resistencia, estrés y respuesta ambiental
	64	ref WP_003980926.1  amino acid adenylation protein [ <i>Streptomyces rimosus</i> ]; <b>Expect</b> = 1e-047	>gi 15029316 gb AF386507.1 AF386507 <i>Streptomyces lavendulae</i> complestatin biosynthetic gene cluster; <b>Expect</b> = 3e-059	Metabolismo y biosíntesis
	68	ref WP_003985150.1  3-ketoacyl-(acyl-carrier-protein) reductase [ <i>Streptomyces rimosus</i> ]; <b>Expect</b> = 1e-035	>gi 477542455 gb CP004370.1  <i>Streptomyces albus</i> J1074, complete genome; <b>Expect</b> = 6e-156	Metabolismo y biosíntesis
		ref WP_003982821.1	>gi 270504784 gb CP001	

	85	putative cytochrome P450 hydroxylase [Streptomyces rimosus]; <b>Expect</b> = 2e-023	814.1  Streptosporangium roseum, complete genome; <b>Expect</b> = 2e-063	<b>Resistencia, estrés y respuesta ambiental</b>
<b>Uncultured (2)</b>	257	gb AFM79274.1  ammonia monooxygenase subunit A, partial [uncultured ammonia-oxidizing bacterium]; <b>Expect</b> = 6e-040	>gi 430008140 gb JX879874.1  Uncultured ammonia-oxidizing bacterium clone 0716148_2-2-1-17 ammonia monooxygenase subunit A (amoA) gene, partial cds; <b>Expect</b> = 0.0	<b>Procesos celulares y ciclo celular</b>
	141	No Hit	>gi 301239469 gb HM702818.1  Uncultured bacterium clone GB7N87002EYSH0 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; <b>Expect</b> = 1e-059	

Los 11 *contigs* que mostraron homología con proteínas caracterizadas fueron asignados a una de las categorías funcionales (Materiales y Métodos, Tabla 1), como se observa en la última columna de la Tabla 3:

1- Procesos celulares y ciclo celular: 4 *contigs* (36,4%, Gráfico 2-A), 3 del Phylum Proteobacteria y 1 de bacterias no cultivadas.

2-Resistencia estrés y respuesta ambiental: 3 *contigs* (27,2%, Gráfico 2-A), 2 del Phylum Actinobacteria y 1 del Phylum Firmicutes.

3-Metabolismo y biosíntesis: 4 *contigs* (36,4%, Gráfico 2-A), 3 del Phylum Actinobacteria y 1 del Phylum Proteobacteria.

### ***I-b. Dominio Eukarya***

Los 28 *contigs* que presentaron homología con el Dominio Eukarya estuvieron distribuidos de la siguiente manera: 7 *contigs* del Reino Animalia (25%), 19 *contigs* del Reino Plantae (67,86%) y 2 *contigs* del Reino Fungi (7,14%).

### I-b-i. Reino Animalia

De los 7 *contigs* asignados al Reino Animalia (Tabla 4), 5 *contigs* correspondieron al Phylum Chordata y los 2 *contigs* restantes al Phylum Nematoda. Estos *contigs* se identificaron mayormente por homología a proteínas caracterizadas (6 *contigs*), y un sólo *contig* por homología a ARNr. La asignación funcional sólo se pudo realizar en base a los 6 *contigs* que mostraron homología con proteínas caracterizadas (ver más adelante).

En el caso del Phylum Chordata, 3 de los *contigs* mostraron identidad con la Clase Actinopteri, y 2 *contigs* con la Clase Aves. Las especies identificadas dentro de la Clase Actinopteri fueron *Neolamprologus brichardi* (enzima E2 de conjugación de ubiquitina, *contig* 177), *Oryzias latipes* (desmetilasa específica de lisina, *contig* 207) y *Chaetodon collare* (gen ARNr 28S, *contig* 163). Las especies identificadas dentro de la Clase Aves fueron *Melopsittacus undulatus* (miosina VI, *contig* 273) y *Anas platyrhynchos* (receptor olfativo, *contig* 379) (Tabla 4).

En el caso del Phylum Nematoda, los 2 *contigs* correspondieron a la especie *Brugia malayi* de la Clase Chromadorea (proteína de unión a un promotor de ARNr, *contigs* 58 y 82) (Tabla 4)

**Tabla 4. Análisis de los *contigs* que presentaron homología con el Reino Animalia.** La tercer y cuarta columnas muestran los resultados de las búsquedas por homología contra las bases de datos proteica (nr) y nucleotídica (nt+16S+Lep), respectivamente. Las celdas coloreadas en amarillo muestran los *hits* seleccionados en base a sus *E-value* (o porque una de las bases de datos no dio resultados significativos). La última columna muestra la categoría funcional a la cual fue asignado cada *contig* (los colores de cada categoría funcional se corresponden con los de la Tabla 1).

Phylum	Clase	Contig	blastx (Hit y E-value)	blastn (Hit y E-value)	Categoría funcional
Chordata (5)	Actinopteri (3)	177	>gi 410912280 ref XP_003969618.1  PREDICTED: ubiquitin-conjugating enzyme E2 Q2-like isoform 2; <b>Expect = 3e-042</b>	>gi 583968846 ref XM_006779811.1  Predicted: <b>Neolamprologus brichardi</b> ubiquitin-conjugating enzyme E2 Q2-like(LOC102789245), mRNA; <b>Expect = 0.0</b>	Procesos celulares y ciclo celular
		207	>gi 432879733 ref XP_004073531.1  PREDICTED: lysine-specific demethylase 3B-like [ <b>Oryzias latipes</b> ]; <b>Expect = 7e-042</b>	>gi 432879732 ref XM_004073483.1 Predicted: <b>Oryzias latipes</b> lysine-specific demethylase 3B-like (LOC101158953), mRNA; <b>Expect = 4e-177</b>	Procesos celulares y ciclo celular
		163	>gi 514765268 ref XP_005024173.1  PREDICTED: metabotropic glutamate receptor 5 [ <b>Anas platyrhynchos</b> ]; <b>Expect = 2e-012</b>	>gi 307603024 gb HM348754.1  <b>Chaetodon collare</b> voucher CcolV-NBFGFR-LKO 28S ribosomal RNA gene, partial sequence; <b>Expect = 0.0</b>	
	Aves (2)	273	>gi 527270542 ref XP_005153215.1  PREDICTED: unconventional myosin-VI isoform X2 [ <b>Melopsittacus undulatus</b> ]; <b>Expect = 1e-016</b>	No Hit	Procesos celulares y ciclo celular
		379	>gi 514735440 ref XP_005017309.1  PREDICTED: olfactory receptor 14C36-like [ <b>Anas platyrhynchos</b> ]; <b>Expect = 2e-013</b>	>gi 283826628 gb GU289229.1  <b>Oreochromis aureus</b> isolate Oau1-4 18S ribosomal RNA gene, internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, internal transcribed spacer 2, and 28S ribosomal RNA gene; <b>Expect = 9e-052</b>	Procesos celulares y ciclo celular
Nematoda (2)	Chromadorea (2)	58	>gi 170571624 ref XP_001891797.1  rRNA promoter binding protein [ <b>Brugia malayi</b> ]; <b>Expect = 2e-009</b>	No Hit	Metabolismo y biosíntesis
		82	>gi 170571877 ref XP_001891902.1  rRNA promoter binding protein [ <b>Brugia malayi</b> ]; <b>Expect = 2e-010</b>	No Hit	Metabolismo y biosíntesis

Los 6 *contigs* que mostraron homología con proteínas caracterizadas fueron asignados a las siguientes categorías funcionales (Tabla 4, última columna; Gráfico 2-B):

1- Procesos celulares y ciclo celular: 4 *contigs* (66,7%, Gráfico 2-B), todos del Phylum Chordata.

2- Metabolismo y biosíntesis: 2 *contigs*, todos del Phylum Nematoda (33,3%, Gráfico 2-B).

*I-b-ii. Reino Plantae*

Los 19 *contigs* del Reino Plantae correspondieron al Phylum Streptophyta, y se identificaron mayormente por homología a proteínas caracterizadas (10 *contigs*), seguido de proteínas no caracterizadas (5 *contigs*), y por último ARNr (4 *contigs*).

De las plantas identificadas, 16 mostraron homología a nivel de especie (*Zea mays*, *Sorghum timorense*, *Helianthus annuus*, *Nicotiana tabacum*, *Cucumis sativus*, *Medicago truncatula*, *Salvia miltiorrhiza*, *Glycine max*, *Vitis vinifera*, *Arabidopsis lyrata*, *Gossypium hirsutum*, *Camellia sinensis*, *Trifolium alexandrinum*, *Neoscortechinia kingii*, *Sorghum bicolor*, *Tetraplodon mnioide*, 1 a nivel de género (*Primula* sp.), y 1 a una Streptophyta no cultivable (Tabla 5).

**Tabla 5. Análisis de los *contigs* que presentaron homología con el Reino Plantae.** La tercer y cuarta columnas muestran los resultados de las búsquedas por homología contra las bases de datos proteica (nr) y nucleotídica (nt+16S+Lep), respectivamente. Las celdas coloreadas en amarillo muestran los *hits* seleccionados en base a sus *E-value* (o porque una de las bases de datos no dio resultados significativos). La última columna muestra la categoría funcional a la cual fue asignado cada *contig* (los colores de cada categoría funcional se corresponden con los de la Tabla 1).

Phylum	Contig	Resultado blastx ( <i>Hit</i> y <i>E-value</i> )	Resultado blastn ( <i>Hit</i> y <i>E-value</i> )	Categoría funcional
Streptophyta (19)	100	>gi 357488189 ref XP_003614382.1  hypothetical protein MTR_5g050970 [ <i>Medicago truncatula</i> ]; <b>Expect=5e-031</b>	>gi 391415363 gb BT065681.2  <b>Zea mays</b> full-length cDNA clone ZM_BFc0017K02 mRNA; <b>Expect = 0.0</b>	Poco caracterizados
	140	>gi 55168340 gb AAV44205.1  unknow protein [ <i>Oryza sativa</i> Japonica Group]; <b>Expect = 3e-035</b>	>gi 589387845 gb KF998272.1  <b>Sorghum timorense</b> chloroplast, complete genome; <b>Expect = 0.0</b>	
	144	>gi 195610700 gb ACG27180.1  hypothetical protein [ <i>Zea mays</i> ]; <b>Expect = 3e-012</b>	>gi 563582565 gb KF767534.1  <b>Helianthus annuus</b> external transcribed spacer, 18S ribosomal RNA gene, internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, internal transcribed spacer 2, and 26S ribosomal RNA gene; <b>Expect = 9e-178</b>	

145	>gi 1545805 dbj BAA10929.1  cytochrome P450 like_TBP [ <i>Nicotiana tabacum</i> ]; <b>Expect = 5e-029</b>	>gi 157689141 gb EU002153.1  <i>Manihot esculenta</i> 26S ribosomal RNA gene, partial sequence; <b>Expect = 2e-148</b>	Resistencia, estrés y respuesta ambiental
153	>gi 449475831 ref XP_004154564.1  PREDICTED: LOW QUALITY PROTEIN: CBS domain-containing protein CBSX3, mitochondrial-like [ <i>Cucumis sativus</i> ]; <b>Expect = 1e-012</b>	No Hit	Resistencia, estrés y respuesta ambiental
184	>gi 357514887 ref XP_003627732.1  ATP synthase subunit beta [ <i>Medicago truncatula</i> ]; <b>Expect = 8e-020</b>	>gi 311409146 gb HQ219383.1  Uncultured streptophyte clone AY2009A7 18S ribosomal RNA gene, internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene; <b>Expect = 0.0</b>	
193	>gi 357474569 ref XP_003607569.1  Menaquinone biosynthesis methyltransferase ubiE [ <i>Medicago truncatula</i> ]; <b>Expect = 2e-046</b>	No Hit	Metabolismo y biosíntesis
196	>gi 358346026 ref XP_003637074.1  Cell wall-associated hydrolase, partial [ <i>Medicago truncatula</i> ]; <b>Expect = 8e-046</b>	>gi 589387845 gb KF998272.1  <i>Sorghum timorense</i> chloroplast, complete genome; <b>Expect = 0.0</b>	
198	>gi 406869553 gb AFS65005.1  universal stress protein [ <i>Salvia miltiorrhiza</i> ]; <b>Expect = 6e-036</b>	>gi 406869552 gb JX416284.1  <i>Salvia miltiorrhiza</i> universal stress protein (USP) gene, complete; <b>Expect = 6e-061</b>	Resistencia, estrés y respuesta ambiental
204	>gi 356547964 ref XP_003542374.1  PREDICTED: probable pectin methyltransferase QUA2-like isoform 1 [ <i>Glycine max</i> ]; <b>Expect = 3e-023</b>	No Hit	Procesos celulares y ciclo celular
228	>gi 225453144 ref XP_002273909.1  PREDICTED: U-box domain-containing protein 4 [ <i>Vitis vinifera</i> ]; <b>Expect = 2e-012</b>	No Hit	Procesos celulares y ciclo celular
244	>gi 297829212 ref XP_002882488.1  AT-IMP [ <i>Arabidopsis lyrata</i> subsp. <i>lyrata</i> ]; <b>Expect = 1e-014</b>	No Hit	Procesos celulares y ciclo celular
280	>gi 357488203 ref XP_003614389.1  RRNA intron-encoded homing endonuclease [ <i>Medicago truncatula</i> ]; <b>Expect = 6e-038</b>	>gi 17028326 gb L49295.1 PMF RGE <i>Primula</i> sp. DES 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; <b>Expect = 0.0</b>	
285	>gi 211905343 gb ACJ11251.1  Ted2 [ <i>Gossypium hirsutum</i> ]; <b>Expect = 4e-031</b>	No Hit	Procesos celulares y ciclo celular
288	>gi 126012451 gb ABF47291.2  ATP sulfurylase [ <i>Camellia</i>	>gi 90856222 gb DQ444464.1  <i>Camellia sinensis</i> ATP-	Metabolismos y



		<i>sinensis</i> ]; Expect = 2e-030	sulfurylase mRNA, complete cds; Expect = 2e-067	<b>biosíntesis</b>
293	>gi 358348842 ref XP_003638451.1  hypothetical protein MTR_132s0010, partial [ <i>Medicago truncatula</i> ]; Expect = 3e-023	>gi 380739586 gb JF767681.1  <i>Trifolium alexandrinum</i> microsatellite TaSSR183 sequence; Expect = 4e-099		
319	>gi 357488217 ref XP_003614396.1  hypothetical protein MTR_5g051150 [ <i>Medicago truncatula</i> ]; Expect = 1e-028	>gi 133900040 gb EF135612.1  <i>Neoscortechinia kingii</i> 26S ribosomal RNA gene, partial sequence; Expect = 0.0		
378	>gi 253759964 ref XP_002488956.1  hypothetical protein SORBIDRAFT_1211s002020 [ <i>Sorghum bicolor</i> ]; Expect = 7e-021	>gi 74272796 gb DQ123003.1  <i>Passiflora tryphostemmatoides</i> 26S ribosomal RNA gene, partial; Expect = 7e-080		
294	No Hit	>gi 486172173 gb JX241522.1  <i>Tetraplodon mnioides</i> 25S ribosomal RNA gene; Expect = 3e-062		

Los 10 *contigs* que mostraron homología con proteínas caracterizadas fueron asignados a las siguientes categorías funcionales (Tabla 5, última columna; Gráfico 2-C):

1-Procesos celulares y ciclo celular: 4 *contigs* (40%; Gráfico 2-C).

2-Resistencia estrés y respuesta ambiental: 3 *contigs* (30%; Gráfico 2-C).

3- Metabolismo y biosíntesis: se asignaron 2 *contigs* (20%; Gráfico 2-C).

4-Poco caracterizados: 1 *contig* (10%; Gráfico 2-C).

### I-b-iii. Reino Fungi

Los 2 *contigs* asignados al Reino Fungi se identificaron por homología a ARNr, uno a nivel de especie, *Tricholoma matsutake* (Phylum Basidiomycota), y el otro a nivel de género (*Aspergillus* no cultivable, Phylum Ascomycota) (Tabla 6).

**Tabla 6. Análisis de los *contigs* que presentaron homología con el Reino Fungi.** La tercer y cuarta columnas muestran los resultados de las búsquedas por homología contra las bases de datos proteica (nr) y nucleotídica (nt+16S+Lep), respectivamente. Las celdas coloreadas en amarillo muestran los *hits* seleccionados en base a sus *E-value* (o porque una de las bases de datos no dio resultados significativos).

Phylum	Contig	Resultado blastx (Hit y E-value)	Resultado blastn (Hit y E-value)
Basidiomycota (1)	49	>gi 336362677 gb EGN91373.1  hypothetical protein SERLA73DRAFT_67532 [Serpula lacrymans var. lacrymans S7.3]; <b>Expect</b> = 5e-010	>gi 1490527 gb U62538.1 TMU62538 <i>Tricholoma matsutake</i> intergenic spacer 2, partial sequence, 18S ribosomal RNA gene, complete sequence and internal transcribed spacer 1, partial sequence; <b>Expect</b> = 0.0
Ascomycota (1)	395	No Hit	>gi 555948027 gb KF225863.1  Uncultured <i>Aspergillus</i> clone Leof74 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence; <b>Expect</b> = 6e-117

## II- Transcriptoma

Como ya se ha mencionado, del total de los 420 *contigs*, 212 correspondieron al transcriptoma del hospedador ya que tenían identidad con el Phylum Arthropoda. Estos 212 *contigs* mayormente mostraron homología con proteínas no caracterizadas (97 *contigs*), proteínas caracterizadas (65 *contigs*) y ARNr (50 *contigs*) (Tabla Suplementaria). Al igual que para el metatranscriptoma, únicamente los 65 *contigs* con homología a proteínas caracterizadas pudieron ser clasificados funcionalmente en las categorías que se mencionan a continuación (Tabla 7; Gráfico 2-D):

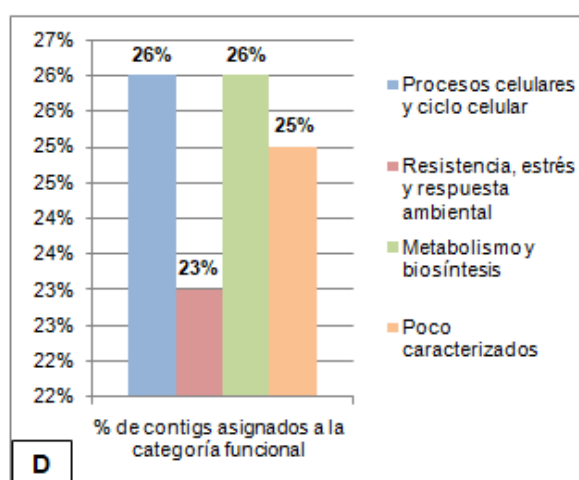
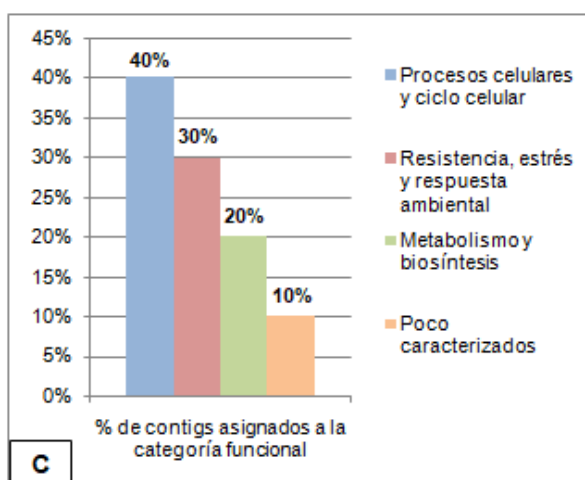
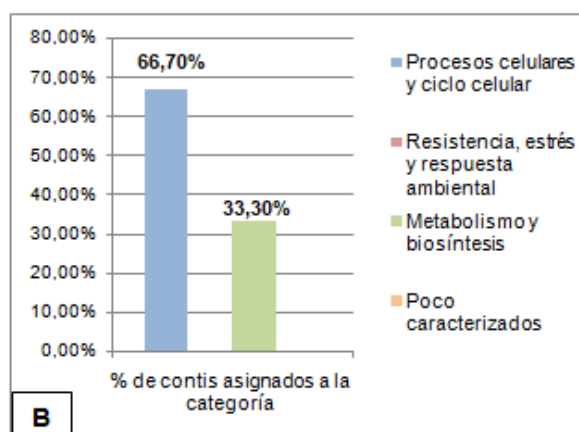
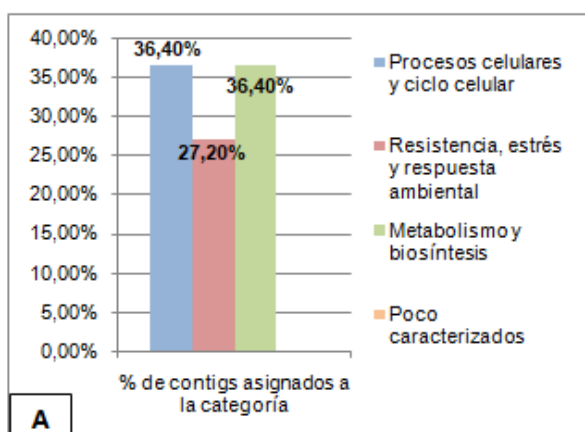
- 1- Procesos celulares y ciclo celular: 17 *contigs* (26%; Gráfico 2-D).
- 2- Resistencia, estrés y respuesta ambiental: 15 *contigs* (23%; Gráfico 2-D).
- 3- Metabolismo y biosíntesis: 17 *contigs* (26%; Gráfico 2-D).
- 4- Poco caracterizados: 16 *contigs* (25%; Gráfico 2-D).

**Tabla 7. Análisis funcional de los *contigs* que presentaron homología con el Phylum Arthropoda.** Las columnas 2 a 4 muestran los resultados de la búsqueda por homología contra la base de datos nucleotídica (nt+16S+Lep), y las columnas 5 a 7 los resultados de la búsqueda por homología contra la base de datos proteica (nr). La última columna muestra la categoría funcional a la cual fue asignado cada *contig* (los colores de cada categoría funcional se corresponden con los de la Tabla 1).

Contig	Acceso_nt	Hit_nt	E-value nt	Acceso_nr	Hit_nr	E-value nr	Categoría funcional	
18	>gij341592106	actin mRNA, complete cds	2E-134	>gij21260593	beta-actin	4E-16	<b>Procesos celulares y ciclo celular</b>	
43	>gij341592106	actin mRNA, complete cds	0.0	>gij506968385	Actin	2E-57		
104	>gij234204057	myosin heavy chain gene	0.0	>gij183979376	muscle myosin heavy chain	3E-32		
136	>gij229472622	myosin heavy chain mRNA	1E-156	>gij226903605	myosin heavy chain variant	2E-69		
249	>gij197322813	clone A myosin heavy chain mRNA	0.0	>gij197322814	myosin heavy chain	3E-32		
235		No hit		>gij512920980	PREDICTED: dynein heavy chain, cytoplasmic-like	2E-44		
90		No hit		>gij512892210	PREDICTED: proteoglycan 4-like	3E-53		
96	>gij429508146	troponin T isoform F (TnT) Mrna	0.0	>gij429508137	troponin T isoform A	6E-46		
146	>gij384357795	whole genome	2E-76	>gij512900637	PREDICTED: H(+)/Cl(-) exchange transporter 3-like	2E-37		
339		No hit		>gij512900637	PREDICTED: H(+)/Cl(-) exchange transporter 3-like	3E-43		
149		No hit		>gij512902724	PREDICTED: serine/threonine-protein kinase RIO2-like	7E-12		
417	>gij290955	17kDa H+-ATPase V-type subunit mRNA	2E-168		No hit			
220		No hit		>gij357611899	laccase 1	1E-40		
253		No hit		>gij512914193	Predicted: Low quality protein: protein lava lamp-like	5E-30		
258		No hit		>gij357622077	putative Toutatis	3E-22		
264		No hit		>gij357604880	putative beta chain spectrin	6E-25		
357		No hit		>gij512890376	PREDICTED: zinc finger protein 608-like	4E-30		
71	>gij383276189	mRNA, clone: fwd-02H12	2E-86	>gij116833209	cytochrome P450-like TBP	6E-09		<b>Resistencia, estrés y respuesta ambiental</b>
79	>gij116833208	cytochrome P450-like TBP mRNA, partial cds	8E-60	>gij148298685	fructose 1,6-bisphosphate aldolase	1E-26		
152	>gij383276189	mRNA, clone: fwd-02H12	1E-100	>gij116833209	cytochrome P450-like TBP	4E-17		
215	>gij383276189	mRNA, clone: fwd-02H12	6E-164	>gij116833209	cytochrome P450-like TBP	6E-17		
346	>gij383276189	mRNA, clone: fwd-02H12	2E-97	>gij116833209	cytochrome P450-like TBP	9E-14		
353	>gij383276189	mRNA, clone: fwd-02H12	2E-148	>gij116833209	cytochrome P450-like TBP	2E-14		
360	>gij383276189	mRNA, clone: fwd-02H12	0.0	>gij116833209	cytochrome P450-like TBP	2E-34		
72	>gij46370383	peritrophin membrane protein 1 mRNA, partial	1E-124	>gij46370384	peritrophin membrane protein 1	4E-37		
73	>gij46370383	peritrophin membrane protein 1 mRNA, partial	3E-79	>gij46370384	peritrophin membrane protein 1	2E-09		
128	>gij46370383	peritrophin membrane protein 1 mRNA, partial	4E-119	>gij46370384	peritrophin membrane protein 1	6E-26		
318	>gij46370383	peritrophin membrane protein 1 mRNA, partial	0.0	>gij46370384	peritrophin membrane protein 1	2E-85		
117	>gij41818393	chitin synthase mRNA, complete cds	0.0	>gij41818394	chitin synthase	6E-46		
132		No hit		>gij398359539	putative cuticle protein CPH45	1E-08		
254		No hit		>gij512935878	PREDICTED: mucin-	8E-14		

					2-like		
260	>gil301070143	heat shock protein 70 cognate (Hsc70) mRNA	0.0	>gil241153675	heat shock protein, putative	1E-19	
28	>gil28627568	translation elongation factor 2 mRNA	8E-80	>gil28627569	translation elongation factor 2	5E-24	<b>Metabolismo y biosíntesis</b>
30	>gil28627568	translation elongation factor 2 mRNA	3E-63	>gil501290941	elongation factor 2	5E-13	
31	>gil28627568	translation elongation factor 2 mRNA	2E-111	>gil28627569	translation elongation factor 2	7E-12	
32	>gil28627568	translation elongation factor 2 mRNA	1E-105	>gil193690671	PREDICTED: elongation factor 2-like	3E-27	
328	>gil28627568	translation elongation factor 2 mRNA	1E-62		<i>No hit</i>		
282		<i>No hit</i>		>gil157116712	translation initiation factor 3, subunit S9, putative	3E-37	
116		<i>No hit</i>		>gil389608621	cryptocephal	2E-18	
169	>gil114052461	glutamate dehydrogenase (LOC692939), Mrna	5E-156	>gil114052462	glutamate dehydrogenase	2E-48	
208	>gil389611254	mRNA for leukotriene a-4 hydrolase, complete	1E-56	>gil389611255	leukotriene a-4 hydrolase	4E-45	
225	>gil291201244	Spodoptera frugiperda BAC, egg DNA	1E-126	>gil512922521	PREDICTED: glutaminase kidney isoform	6E-42	
232	>gil291201238	Spodoptera frugiperda BAC, egg DNA	6E-100	>gil37788336	midgut class 1 aminopeptidase N	1E-18	
266	>gil291201238	Spodoptera frugiperda BAC, egg DNA	4E-87	>gil37788336	midgut class 1 aminopeptidase N	3E-31	
274		<i>No hit</i>		>gil385655181	neutral lipase	3E-44	
275		<i>No hit</i>		>gil397910056	trypsin, partial	9E-27	
50		<i>No hit</i>		>gil543888330	salivary maltase precursor, partial	3E-46	
332		<i>No hit</i>		>gil357620397	alpha amylase	1E-32	
227		<i>No hit</i>		>gil512907388	PREDICTED: 2-oxoglutarate dehydrogenase	1E-31	
9	>gil383276189	mRNA, clone: fwd-02H12	2E-64	>gil512938235	PREDICTED: uncharacterized protein LOC101742759	2E-12	<b>Poco caracterizados</b>
124	>gil383276189	mRNA, clone: fwd-02H12	0.0	>gil512938235	PREDICTED: uncharacterized protein LOC101742759	4E-33	
135	>gil383276189	mRNA, clone: fwd-02H12	0.0	>gil512938235	PREDICTED: uncharacterized protein LOC101742759	4E-34	
162	>gil383276189	mRNA, clone: fwd-02H12	9E-121	>gil512938235	PREDICTED: uncharacterized protein LOC101742759	5E-28	
265	>gil383276189	mRNA, clone: fwd-02H12	0.0	>gil512938235	PREDICTED: uncharacterized protein LOC101742759	8E-28	
345	>gil383276189	mRNA, clone: fwd-02H12	8E-64	>gil512938235	PREDICTED: uncharacterized protein LOC101742759	9E-14	

366	>gi 383276189	mRNA, clone: fwd-02H12	3E-50	>gi 512938235	PREDICTED: uncharacterized protein LOC101742759	1E-12
65	>gi 383276189	mRNA, clone: fwd-02H12	3E-101	>gi 307174634	Uncharacterized protein ART2	5E-17
89	>gi 383276189	mRNA, clone: fwd-02H12	4E-109	>gi 189242281	PREDICTED: similar to CG41536 CG41536-PA	6E-20
113	>gi 383276189	mRNA, clone: fwd-02H12	1E-85	>gi 189242281	PREDICTED: similar to CG41536 CG41536-PA	9E-08
281	>gi 383276189	mRNA, clone: fwd-02H12	9E-148	>gi 189242281	PREDICTED: similar to CG41536 CG41536-PA	3E-29
411	>gi 383276189	mRNA, clone: fwd-02H12	9E-113	>gi 189242281	PREDICTED: similar to CG41536 CG41536-PA	8E-20
107	>gi 383276189	mRNA, clone: fwd-02H12	0.0	>gi 242012026	conserved hypothetical protein	1E-29
137	>gi 383276189	mRNA, clone: fwd-02H12	1E-149	>gi 403334965	hypothetical protein OXYTRI_13058	3E-08
186	>gi 383276189	mRNA, clone: fwd-02H12	1E-105	>gi 403334965	hypothetical protein OXYTRI_13058	7E-18
183	>gi 383276189	mRNA, clone: fwd-02H12	6E-67		No hit	



**Gráfico 2. Porcentaje de contigs asignados a cada una de las categorías funcionales en los distintos grupos taxonómicos. (A) Bacteria; (B) Animalia; (C) Plantae; (D) Arthropoda.**

## **DISCUSIÓN**

Este es el primer estudio en integrar datos de expresión génica de intestinos de larvas de *S. frugiperda* capturadas sobre una fuente de alimentación alternativa (*Sorghum halepense*), con los de su metatranscriptoma asociado. Para ello, el enfoque utilizado incluyó la extracción de ARN total, amplificación independiente de secuencia, y pirosecuenciación. Con el fin de enriquecer la interpretación de los resultados de este trabajo, en esta discusión se realizará una comparación con un trabajo de referencia que utilizó el mismo enfoque para analizar intestinos de larvas de *S. frugiperda* capturadas sobre una plantación de maíz orgánico en altura (2,283 m.s.n.m.) (Rozadilla, 2016).

El análisis de las lecturas ensambladas en *contigs* reveló que, de manera algo diferente a lo que encontró Rozadilla (2016), el porcentaje de *contigs* que pudieron ser asignados taxonómicamente fue bastante más bajo en nuestro estudio ( $\approx 62\%$  vs  $\approx 70\%$ ) y, consecuentemente, en nuestro caso fue mayor el porcentaje de *contigs* para los cuales no se obtuvieron resultados significativos en las búsquedas por homología (*No hits*) ( $\approx 38\%$  vs  $\approx 30\%$ ) (Tabla 2). Por otro lado, de los *contigs* asignados taxonómicamente (Gráfico 1), en nuestro estudio hubo un mayor porcentaje asignado al metatranscriptoma asociado ( $\approx 19\%$  vs  $\approx 8\%$ ) y, contrariamente, un menor porcentaje asignado al transcriptoma del hospedador ( $\approx 81\%$  vs  $\approx 92\%$ ).

### ***I- Metatranscriptoma***

En el metatranscriptoma asociado se identificaron secuencias pertenecientes a los Dominios Bacteria y Eukarya, al igual que Rozadilla (2016). Sin embargo, a diferencia del mencionado estudio, aquí no encontramos secuencias que tuvieran homología con el Dominio Archaea. A continuación se analizarán ambos Dominios por separado.

## ***I-a. Dominio Bacteria***

En el Dominio Bacteria, se identificaron 3 Phyla (Firmicutes, Proteobacteria y Actinobacteria) y bacterias no cultivadas. El Phylum más representado fue Firmicutes ( $\approx 38\%$ ), seguido de Proteobacteria ( $\approx 29\%$ ) y Actinobacteria (24%) y, en último lugar, las bacterias no cultivadas ( $\approx 9\%$ ). Respecto de esta composición taxonómica, nuestros resultados concuerdan con los de Rozadilla (2016), quien además identificó el Phylum Planctomycetes. Sin embargo, estos autores encontraron un orden de abundancia diferente, a saber (de mayor a menor): Proteobacteria, Actinobacteria, Firmicutes, bacterias no cultivadas y Planctomycetes. Dado que la metodología y el enfoque son iguales en ambos estudios, las diferencias podrían deberse a las diferentes fuentes de alimentación (*S. halepense* vs *Z. mays*) y condiciones ambientales (495 m.s.n.m. vs 2283 m.s.n.m.). Por otro lado, en un trabajo realizado sobre la microbiota intestinal de larvas de *Musca domestica* (Díptera), se encontró que los Phyla predominantes eran, en primer lugar, Proteobacteria y, en segundo lugar, Firmicutes (Zhao *et al.*, 2017). Sin embargo, las diferencias con este último estudio se pueden deber a que Zhao *et al.* (2017) realizaron SSG del gen 16S ADNr, mientras que en este estudio se realizó SSG al azar del transcriptoma y metatranscriptoma.

En contraste con la abundancia a nivel taxonómico, fue el Phylum Actinobacteria el que tuvo la mayor asignación funcional, ya que todos los *contigs* de este Phylum fueron asignados funcionalmente (3 *contigs* a “Metabolismo y biosíntesis”, y 2 *contigs* a “Resistencia, estrés y respuesta ambiental”) (Tabla 3; Gráfico 2). El segundo lugar lo ocupó el Phylum Proteobacteria (4 de los 6 *contigs* fueron asignados funcionalmente, 3 a “Procesos celulares y ciclo celular”, y 1 a “Metabolismo y biosíntesis”), y el tercero correspondió a bacterias no cultivadas (1 de los 2 *contigs* fue asignado a “Procesos celulares y ciclo celular”). Por último se encontró el Phylum Firmicutes, donde uno sólo de

los 8 *contigs* fue asignado funcionalmente (a “Resistencia, estrés y respuesta ambiental”) (Tabla 3; Gráfico 2).

#### *I-a-i. Phylum Firmicutes*

En el Phylum Firmicutes se identificaron 7 tipos bacterianos *Ruminococcus obeum* (proteína hipotética, *contig* 14), *Erysipelotrichaceae bacterium* (proteína no caracterizada, *contig* 17), *Carnobacterium maltaromaticum* (ARNr 23S, *contig* 216), *Streptococcus suis* (genoma completo, *contig* 319), *Streptococcus mutans* (proteínas hipotética, *contigs* 394 y 54) y *Heliobacterium modesticaldum* (proteína hipotética, *contig* 114), mayormente por homología a proteínas no caracterizadas, y de los cuales sólo uno (*S. mutans*, *contigs* 394 y 54; Tabla 3) coincidió con lo encontrado por Rozadilla (2016) para este Phylum. Por otro lado, *E. faecalis* fue la única especie asignada funcionalmente (*contig* 272; “Resistencia, estrés y respuesta ambiental”), y mostró homología con una lipoproteína del transportador ABC (Tabla 3; Gráfico 2).

La especie *Ruminococcus obeum* fue aislada de heces humanas (Drasar y Duerden, 1991; Wren, 1991), y hasta la fecha no se había encontrado evidencia de su presencia en intestinos de insectos. Sin embargo, el género *Ruminococcus* está constituido por cocos Gram-positivos anaeróbicos obligados que colonizan el rumen, intestino grueso o ciego de muchos animales y humanos (Wang *et al.*, 1997). *R. obeum* se caracteriza por la producción de grandes cantidades de acetato con etanol, hidrógeno y monóxido de carbono (Moore *et al.*, 1976) y, en general, sus productos de fermentación son principalmente ácido acético y fórmico, a veces junto con pequeñas cantidades de ácidos láctico y succínico (Moore *et al.*, 1976).

En cuanto a la familia *Erysipelotrichaceae*, la mayoría de las cepas se han aislado de ambientes intestinales, mientras que otras son patógenos que causan enfermedades infecciosas (Verborg *et al.*, 2014). Por otro lado, diversos estudios indican que son



abundantes en los tractos digestivos de mamíferos (Han *et al.*, 2010; Greiner y Bäckhed, 2011; Alcaide *et al.*, 2012) y de insectos (Egert *et al.*, 2003; Köhler *et al.*, 2012; Schauer *et al.*, 2012), sugiriendo que forman parte de su microbiota intestinal. De hecho, recientemente se aislaron miembros de esta familia del tracto digestivo de una cucaracha (*Shelfordella lateralis*) y de la larva de un escarabajo (*Pachnoda ehippiata*) (Tegtmeier *et al.*, 2016).

*Carnobacterium maltaromaticum* es una especie que posee muchas características de particular interés. Fue aislada del intestino medio de un lepidóptero (Shannon *et al.*, 2001), y frecuentemente se la encuentra en el ambiente y en las comidas (Leisner *et al.*, 2007). Codifica genes que le confieren resistencia a algunos componentes del sistema inmune (Iskandar *et al.*, 2017), y una hidrolasa de las sales biliares (Iskandar *et al.*, 2017) que le permitiría sobrevivir en el tracto gastrointestinal. Asimismo, se han encontrado adhesinas putativas que le permitirían adherirse a la mucosa intestinal (Iskandar *et al.*, 2017). Más aún, esta especie es capaz de catabolizar carbohidratos, entre ellos la quitina, lo cual explica su aislamiento a partir del intestino medio de la larva de un lepidóptero (Shannon *et al.*, 2001). Expresa la ruta de la arginina deiminasa, en la que se produce amonio a partir de la arginina (Collins *et al.*, 1987; Leisner *et al.*, 1994; Schillinger y Holzapfel, 1995; Collins *et al.*, 2002). La arginina podría representar una fuente de energía adicional para el crecimiento y la supervivencia cuando los carbohidratos son escasos, y también ofrecer protección contra el estrés ácido (Marquis *et al.*, 1987). Adicionalmente, algunas especies del género *Carnobacterium* poseen la capacidad de producir péptidos antimicrobianos y bacteriocinas (Lewus *et al.*, 1991; Coventry *et al.*, 1997) y, en particular, una cepa de *C. maltaromaticum* produce al menos tres bacteriocinas (Leisner *et al.*, 2007). Por último, cabe mencionar que cuando esta especie se inyectó en el tórax de *Drosophila melanogaster* fue patogénica (Jensen *et al.*, 2007), pero se cree que esto fue el resultado de una infección oportunista (Leisner *et al.*, 2007).

Se identificaron dos especies del género *Streptococcus*, *S. suis* y *S. mutans*. Como ya se ha mencionado, previamente se identificaron transcriptos de *S. mutans* en el tracto digestivo de *S. frugiperda* (Rozadilla, 2016). Esta especie se encuentra comúnmente en la cavidad oral de humanos y es uno de los odontopatógenos que causan las caries (Loesche, 1986). Por su parte, *S. suis* es un importante patógeno de cerdos y el agente causal de una enfermedad zoonótica, ya que puede ser transmitido de cerdos a humanos (Sriskandan y Slater, 2006). Esta especie se encuentra en el tracto respiratorio superior, particularmente las amígdalas y cavidad nasal, y en los tractos digestivo y genital (Gottschalk, 2012).

*Heliobacterium modesticaldum* es una bacteria fototrófica fijadora de nitrógeno que puede crecer fotoheterotróficamente o quimiotróficamente, pero no fotoautotróficamente (Tang *et al.*, 2010). Fue aislada de los tapices microbianos que se encuentran en las fuentes termales y suelos volcánicos en Islandia (Kimble *et al.*, 1995), y es uno de los dos fotótrofos anoxigénicos conocidos que pueden fijar nitrógeno a temperaturas mayores a 50°C (el otro es *Chlorobaculum tepidum*) (Wahlund y Madigan, 1993; Madigan, 1995).

*Enterococcus faecalis*, la única bacteria del Phylum Firmicutes que fue asignada funcionalmente, fue reportada previamente en dos dípteros: *Musca domestica*, en donde representaba una de las especies más abundantes, portando genes de resistencia a varios antibióticos (Macovei y Zurek, 2006), y en el intestino medio de *Anastrepha ludens* (Kuzina *et al.*, 2001). Por otro lado, se han encontrado otras especies de este mismo género, *E. gallinarum* y *E. mundtii*, en el intestino medio del lepidóptero *Anticarsia gemmatalis* (Visôto *et al.*, 2009).

En conclusión, dado que la mayoría de las bacterias identificadas de este Phylum se han descrito previamente en el tracto digestivo de lepidópteros o de otros animales, es muy probable que formen parte de la microbiota intestinal de *S. frugiperda*. En cuanto a

*H. modesticaldum*, que es una bacteria fototrófica fijadora de nitrógeno, su presencia posiblemente está relacionada con la necesidad de metabolizar las importantes cantidades de nitrógeno asimiladas por las larvas, debido a su gran voracidad.

#### *I-a-ii. Phylum Proteobacteria*

En el Phylum Proteobacteria se identificaron 5 tipos bacterianos (*Xanthomonas citri*, *X. fuscans*, *E. coli*, *Erwinia amylovora* y Nitrosomonadaceae bacterium), mayormente por homología a proteínas caracterizadas (4 de los 6 *contigs*; Tabla 3), y de los cuales únicamente los de la Familia Nitrosomonadaceae coincidieron con los identificados por Rozadilla (2016) para este mismo Phylum. Los tipos bacterianos asignados funcionalmente correspondieron a *X. citri* (*contig* 151; exodeoxiribonucleasa VII), *X. fuscans* (*contig* 93; alfa amilasa), y Nitrosomonadaceae bacterium (*contigs* 233 y 252; amonio monooxigenasa) (Tabla 3; Gráfico 2). Las especies *E. coli* (*contig* 189) y *E. amylovora* (*contig* 53) mostraron homología con proteínas no caracterizadas (Tabla 3).

Las bacterias del género *Xanthomonas* están asociadas a plantas y no se encuentran en otros ambientes (con excepción de *X. maltophilia* que tiene una distribución cosmopolita) (Hayward, 1993). La mayoría son patógenos de plantas, incluyendo las dos especies identificadas aquí, *X. citri* y *X. fuscans* (Hayward, 1993).

*E. coli* es un anaerobio facultativo Gram-negativo no esporulante, que habita el tracto digestivo y las heces de animales de sangre caliente y de reptiles (Berg, 1996; Gordon y Cowling, 2003). Tiene la particularidad de ser tanto un comensal ubicuo del tracto digestivo de vertebrados como un patógeno versátil (Kosek *et al.*, 2003; Russo y Johnson, 2003).

*E. amylovora* es un patógeno de plantas que afecta a un amplio rango de hospedadores de la Familia Rosaceae, y que es una amenaza mundial para la producción comercial de manzanas y peras (Piqué *et al.*, 2015).

Como ya se ha mencionado, previamente se habían identificado bacterias de la familia Nitrosomonadaceae en intestinos de larvas de *S. frugiperda* (Rozadilla, 2016). Se han aislado miembros de esta familia de diversos ambientes terrestres y acuáticos (Watson, 1974). Son proteobacterias oxidantes de amonio que forman parte de las bacterias nitrificantes y juegan un rol importante en el ciclo biogeoquímico del nitrógeno (Belser, 1979).

Resumiendo, las proteobacterias identificadas en este estudio son ubicuas en el ambiente donde se capturaron estas larvas (plantas y suelo). Por ello, posiblemente son indicativas de los patrones de comportamiento y los hábitos alimenticios de *S. frugiperda*, y probablemente forman parte de su microbiota intestinal transitoria. En cuanto a las bacterias nitrificantes que se identificaron, y que también fueron encontradas por Rozadilla (2016), su presencia probablemente se debe a que, por la gran voracidad de las larvas, éstas asimilan importantes cantidades de nitrógeno que deben ser metabolizadas.

#### *I-a-iii. Phylum Actinobacteria*

En el Phylum Actinobacteria se identificó una única especie, *Streptomyces rimosus*, y ésta mostró homología a diversas proteínas caracterizadas (Tabla 3; Gráfico 2). Los *contigs* fueron asignados funcionalmente a “Metabolismo y biosíntesis” (*contigs* 168, 64 y 68, Tabla 3), y a “Resistencia estrés y respuesta ambiental” (*contigs* 317 y 85, Tabla 3). Los *contigs* presentaron homología con acil-CoA deshidrogenasa (*contig* 168, Tabla 3), citocromo P450 (*contig* 317 y 85, Tabla 3), proteína de adenilación de aminoácido (*contig* 64, Tabla 3), y 3-cetoacil-reductasa (*contig* 68, Tabla 3). Rozadilla (2016) identificó otra especie de este mismo género en *S. frugiperda* (*S. chartreusis*), pero a diferencia de

nuestro trabajo, donde sólo se identificó *S. rimosus*, halló dos especies más del Phylum Actinobacteria, *Rubrobacter xylanophilus* y *Janibacter hoylei*.

*S. rimosus* originalmente fue aislada del suelo y es utilizada para producir oxitetraciclina a nivel industrial (Finley *et al.*, 1950). En sentido más amplio, las bacterias del género *Streptomyces* son ubicuas en el suelo, y tienen un rol importante en el ciclo de la materia orgánica. Producen numerosos metabolitos secundarios que son usados en medicina humana como anti-infectivos, antitumorales y drogas inmunosupresivas (Challis y Hopwood, 2003). Más recientemente se ha comenzado a ver que estas bacterias están bien adaptadas a vivir en simbiosis con los invertebrados, donde mayormente tienen un rol protector, produciendo antibióticos que son utilizados para defender a las larvas del hospedador o la fuente alimenticia de infecciones por patógenos (Kaltenpoth, 2009). Por ello, es muy probable que la presencia de *S. rimosus* en el intestino medio de *S. frugiperda* esté indicando que existe una relación simbiótica entre ambos.

#### *I-a-iv. Bacterias no cultivadas*

Se identificaron 2 bacterias no cultivadas por homología a una proteína caracterizada (*contig 257*; amonio monooxigenasa) (Tabla 3; Gráfico 2) y a ARNr (*contig 141*; Tabla 3). Estos resultados fueron similares a los de Rozadilla (2016), quien identificó 2 bacterias no cultivadas oxidantes de amonio.

Resumiendo, la presencia de otra bacteria nitrificante más estaría confirmando la necesidad de la larva de metabolizar las grandes cantidades de nitrógeno asimiladas durante su alimentación.

#### ***I-b. Dominio Eukarya***

Respecto al Dominio Eukarya, se encontró la misma distribución taxonómica que en el trabajo de referencia (Rozadilla, 2016): Reinos Animalia, Plantae y Fungi. Sin

embargo, en el presente trabajo fue menor el número de *contigs* asignado al Reino Animalia (7 vs 15), mayor el asignado al Reino Plantae (19 vs 12), y similar para el Reino Fungi (2 vs 1) (Tabla 4) (Rozadilla, 2016).

#### *I-b-i. Reino Animalia*

Los *contigs* asignados al Reino Animalia pertenecen a los Phyla Chordata y Nematoda, al igual que en el trabajo de Rozadilla (2016). Todos los *contigs* asignados a este Reino (excepto el *contig* 163; Tabla 4) fueron clasificados funcionalmente en las categorías “Procesos celulares y ciclo celular” (*contigs* 177, 207, 273 y 379), y “Metabolismo y biosíntesis” (*contigs* 58 y 82) (Tabla 4, Gráfico 2-B). Los *contigs* presentaron homología con, por ejemplo, la enzima E2 que conjuga ubiquitina, una desmetilasa específica de lisina, una miosina VI, un receptor olfatorio, y a una proteína de unión a un promotor de ARNr, entre otros. Ya que carecería de sentido la presencia de secuencias de peces y aves en el intestino de una larva de lepidóptero, es muy probable que estos *contigs* correspondan a genes de *S. frugiperda* que aún no han sido secuenciados y, debido a que aún no se encuentran en las bases de datos, en las búsquedas por homología muestran identidad con otros organismos (en este caso, cordados). Esto se debe a las limitaciones inherentes del método, dado que las búsquedas por homología se ven restringidas al número y a la calidad de las secuencias presentes en las bases de datos al momento de realizar el análisis.

En lo que respecta al Phylum Nematoda, se identificó la especie *Brugia malayi*, nematodo que causa filariasis en humanos (Cross, 1996), por homología con una proteína de unión al promotor de ARNr (*contigs* 58 y 82, Tabla 4). Estos resultados fueron similares a los de Rozadilla (2016), que también identificó la misma especie, aunque en ese trabajo además se encontró *Trichinella spiralis*. Cabe mencionar que se ha aislado una especie de nematodo parásito de larvas de *S. frugiperda* (Ruiz-Nájera *et al.*, 2013).

### *I-b-ii. Reino Plantae*

Todos los *contigs* fueron asignados al Phylum Streptophyta y, de las especies identificadas (Tabla 5), varias correspondieron a hospederos de *S. frugiperda*, a saber (en orden decreciente de importancia en Argentina): maíz (*Zea mays*), soja (*Glycine max*), algodón (*Gossypium hirsutum*), sorgo forrajero (*Sorghum bicolor*), girasol (*Helianthus annuus*), tabaco (*Nicotiana tabacum*) y pepino (*Cucumis sativus*) (Casmuz *et al.*, 2010). El resto de las plantas identificadas (Tabla 5) no figura en el listado de hospederos de esta plaga (*Sorghum timorense*, *Medicago truncatula*, *Salvia miltiorrhiza*, *Vitis vinifera*, *Arabidopsis lyrata*, *Camellia sinensis*, *Trifolium alexandrinum*, *Neoscortechinia kingii*, *Tetraplodon mnioides* y *Primula* sp.) (Casmuz *et al.*, 2010). Sin embargo, dado que las larvas que se usaron para este análisis únicamente se estaban alimentando de sorgo de Alepo (*S. halepense*), concluimos que todos los *contigs* corresponden a transcriptos de este hospedero que no se encontraban en las bases de datos al momento de realizar las búsquedas por homología. Por otro lado, Rozadilla (2016) encontró algo similar ya que, aunque las larvas que se utilizaron en ese estudio se estaban alimentando exclusivamente de maíz orgánico (*Zea mays*), esta especie no fue identificada. En ese trabajo se encontraron otras especies, algunas coincidentes con las halladas aquí (*Helianthus annuus*, *Vitis vinifera* y *Medicago truncatula*) y otras que no fueron identificadas en nuestro análisis (*Allium cepa*, *Cicer arietinum*, y *Citrus sinensis*).

### *I-b-iii. Reino Fungi*

Se identificaron dos tipos de hongos, *Tricholoma matsutake* (*contig* 49, Tabla 6) y *Aspergillus* no cultivable (*contig* 395, Tabla 6), a diferencia de Rozadilla (2016) donde se identificó una única especie (*Aspergillus penicillioides*). Sin embargo, en ambos trabajos los hongos fueron identificados por homología con genes de ARNr. *Tricholoma matsutake* pertenece al Phylum Basidiomycota y es una especie de hongo ectomicorrícico que crece

en relación simbiótica con *Pinus densiora* (Guerin-Laguette *et al.*, 2004; Ding y Hou, 2012). Por otro lado, el género *Aspergillus* ya había sido identificado en intestinos de *S. frugiperda* (Rozadilla, 2016), y en *S. littorales* (Ismail y Abdel-Sater, 1993) se encontró en todos los estadios de vida del insecto (Ismail y Abdel-Sater, 1993). Este género está ampliamente distribuido, encontrándose además en el suelo, productos forrajeros, productos alimenticios, polvo, desechos orgánicos y materia en descomposición (Gugnani, 2003). Las especies del género *Aspergillus* tienen la capacidad de degradar componentes orgánicos como azúcares, ácidos grasos, proteínas, celulosa, pectina y xileno (Fogarty, 1994).

En conclusión, una de las especies identificadas, *Tricholoma matsutake*, que hace simbiosis con otra planta (Guerin-Laguette *et al.*, 2004; Ding y Hou, 2012), probablemente es indicativa del hábito alimenticio de *S. frugiperda*. Mientras que el *Aspergillus* no cultivable, género que ya ha sido identificado en dos especies de *Spodoptera* (Ismail y Abdel-Sater, 1993; Rozadilla, 2016), probablemente forma parte de su microbiota intestinal permanente.

## **II- Transcriptoma**

El otro objetivo de este trabajo consistió en caracterizar el perfil transcriptómico de las larvas de *S. frugiperda* capturadas sobre una fuente de alimentación alternativa (*S. halepense*). Del total de *contigs* correspondientes al hospedador (212), sólo alrededor del 31% pudo ser asignado funcionalmente (65 *contigs*), ya que el resto correspondió a proteínas no caracterizadas (97 *contigs*; ≈46%) y ARNr (50 *contigs*; ≈24%). Del total de *contigs* asignados funcionalmente, la mayor cantidad correspondió a las categorías “Procesos celulares y ciclo celular” y “Metabolismo y biosíntesis” (17 *contigs* cada uno; Tabla 7; Gráfico 2). Entre los *contigs* asignados a “Procesos celulares y ciclo celular” se encontró una ATPasa H<sup>+</sup> tipo V (*contig* 417; Tabla 7), y entre los asignados a



“Metabolismo y biosíntesis” se identificó una aminopeptidasa N de clase I del intestino medio (*contigs* 232 y 266; Tabla 7). En segundo lugar se encontraron los *contigs* asignados a “Poco caracterizados” (16 *contigs*; Tabla 7), y por último los asignados a “Resistencia, estrés y respuesta ambiental” (15 *contigs*; Tabla 7), cuyos *contigs* presentaron homología con una citocromo P450, una proteína de la membrana peritrófica, una quitina sintasa, una proteína de la cutícula CPH45, y una mucina tipo II, entre otros. Como se puede apreciar, la caracterización del perfil transcriptómico de *S. frugiperda* permitió identificar genes que contribuyen con su digestión y desintoxicación, y entre ellos a posibles candidatos de control biológico a ser utilizados en estrategias de ARNi. Por ello, y para focalizar la interpretación de los resultados, a continuación se analizarán en profundidad únicamente los genes relacionados en este sentido.

- *Citocromo P450* (*contigs* 71, 79, 152, 215, 346, 353 y 360; Tabla 7): En *Aedes aegypti*, una actividad incrementada de la citocromo P450 está asociada con la resistencia a piretroides (Bariami *et al.*, 2012). Por otro lado, en un coleóptero (*Hypothenemus hampei*), el silenciamiento de estos genes por administración oral de ARNdc afectó significativamente su mortalidad (64% y 52%), y causó un retraso en el crecimiento de las larvas (Aguilera *et al.*, 2011). Por ello, este transcrito es un potencial blanco de silenciamiento génico para *S. frugiperda*.
- *Membrana peritrófica* (MP): Varios estudios han utilizado el ARNi para interrumpir la formación de la MP en insectos mediante el silenciamiento de genes que sintetizan o modifican la quitina (Arakane *et al.*, 2005; Kato *et al.*, 2006; Toprak *et al.*, 2013; Jin *et al.*, 2015; Kelkenberg *et al.*, 2015), o de proteínas estructurales (Toprak *et al.*, 2013; Agrawal *et al.*, 2014), todas necesarias para la síntesis e integridad física de la matriz. En este sentido, varios *contigs* mostraron homología con una proteína de la MP (*contigs* 72, 73, 128 y 318; Tabla 7), y uno de los *contigs* presentó homología con una mucina tipo II (MII) (*contig* 254, Tabla 7). Las mucinas

intestinales son proteínas de la MP que poseen alta afinidad por la quitina y que se han hallado en larvas de lepidópteros (Wang y Granados, 2001). Más aún, la MII identificada en larvas de *T. ni* es la proteína más abundante de la MP (Wang y Granados, 1997a; Wang y Granados, 1997b).

Otro *contig* mostró homología con una quitina sintasa (*contig* 117, Tabla 7). Existen dos clases de quitina sintasa (QS): clase A (QS-A), responsable de la síntesis de la quitina cuticular, y clase B (QS-B), encargada de producir la quitina asociada con la MP (Kumar *et al.*, 2008). Recientemente se demostró que la administración oral de ARNdc del gen QS-B, incrementó significativamente la susceptibilidad a insecticidas de una termita, *Reticulitermes flavipes* (Sandoval-Mojica y Scharf, 2016).

- *Proteínas de la cutícula* (CPs): La cutícula es esencial para darle forma al cuerpo del insecto, para mantener su actividad normal durante el desarrollo, y como mecanismo de resistencia a los insecticidas reduciendo su penetración (Wood *et al.*, 2010). Los principales componentes de la cutícula son la quitina y las CPs (Moussian, 2010). Las CPs que conforman la cutícula varían grandemente en función del estado de desarrollo y del tejido del insecto (Andersen *et al.*, 1986; Andersen *et al.*, 1995; Missios *et al.*, 2000; Okamoto *et al.*, 2008; Liang *et al.*, 2010; Dittmer *et al.*, 2012). Las CPs son componentes vitales de la cutícula del insecto, permitiendo su movimiento, y protegiéndolo de los patógenos y las condiciones ambientales adversas (Delon y Payre, 2004; Moussian *et al.*, 2005). En este estudio se encontró un *contig* con homología a la CPH45 (*contig* 132, Tabla 7), que pertenece a una familia de CPs hipotéticas (CPH) (Futahashi *et al.*, 2008).
- *Aminopeptidasa N* (APN) de clase 1 (*contigs* 232 y 266, Tabla 7): Esta enzima hidroliza aminoácidos (preferentemente neutrales) del extremo N-terminal de proteínas u oligopéptidos. Está ampliamente distribuída dentro de los Reinos

Plantae y Animalia. En animales, APN es más abundante en la membrana microvilar del intestino, y está involucrada en la digestión de las proteínas. Adicionalmente, es uno de los principales candidatos para receptor de la toxina Cry de *Bacillus thuringiensis* en el intestino medio de insectos (Nakanishi *et al.*, 2002). En este sentido, se ha demostrado que la administración oral a larvas de *S. litura* de ARNdc contra este gen reduce su expresión, disminuyendo su sensibilidad a la toxina Cry1C (Rajagopal *et al.*, 2002). En base a todo lo mencionado, si bien está demostrado que la APN puede ser silenciada en los intestinos de insectos mediante ARNdc, una reducción en su expresión se asocia con una menor susceptibilidad a las toxinas Cry, lo que se traduce en una mayor supervivencia de las larvas tratadas (Rajagopal *et al.*, 2002; Yang *et al.*, 2010).

- *ATPasa H<sup>+</sup> de clase V (V-ATPasa) (contig 417, Tabla 7)*: Esta enzima utiliza ATP y, mediante el transporte activo de H<sup>+</sup>, transforma la energía liberada por la hidrólisis del ATP en potenciales electroquímicos diferenciales a lo largo de diversas membranas biológicas. Dado su involucramiento en mecanismos celulares básicos, las V-ATPasas son componentes esenciales de las células eucarióticas. Más aún, es necesario que la V-ATPasa esté intacta para que el aparato de Golgi, el retículo endoplasmático, las vacuolas, y las vesículas endocíticas y exocíticas funcionen normalmente (Beyenbach y Wieczorek, 2006). En este sentido, en *Drosophila* se demostró que la inactivación de los genes que codifican para la subunidad B de esta enzima produce fenotipos letales (Davies *et al.*, 1996). En otro estudio donde se alimentaron larvas de *Diabrotica virgifera virgifera* (Coleoptera) con ARNdc dirigido contra la V-ATPasa A, se observó una supresión dramática del ARNm de la V-ATPasa A endógena, y una disminución significativa de la masa larval después de 3 días de alimentación (Baum *et al.*, 2007). Un dato interesante de este estudio es que, a pesar de ser una enzima ubicua en los eucariotas, fue posible diseñar

ARNdc que fueran específicos para diferentes especies de coleópteros (Baum *et al.*, 2007). Por ello, este gen podría ser un candidato interesante en estrategias de control por ARNi.

## **CONCLUSIONES**

El análisis integrador y comparativo llevado a cabo en este trabajo permitió realizar una asignación taxonómica y funcional del transcriptoma de intestinos de larvas de *S. frugiperda* capturadas sobre una fuente de alimentación alternativa (*S. halepense*), y del metatranscriptoma de los microorganismos asociados.

En el metatranscriptoma se identificaron secuencias de los Dominios Bacteria y Eukarya. Entre las bacterias se identificó un primer grupo que podría estar estableciendo relaciones simbióticas con el hospedador y que, por ende, formaría parte de la microbiota intestinal permanente del hospedador. El segundo grupo provendría del ambiente circundante (plantas y suelos) y, por ende, formaría parte de su microbiota intestinal transitoria. En el primer grupo se encontrarían las bacterias nitrificantes (del Phylum Proteobacteria y no cultivables) y la bacteria fijadora de nitrógeno del Phylum Firmicutes (*H. modesticaldum*), el resto de las bacterias identificadas del Phylum Firmicutes (*R. obeum*, *Erysipelotrichaceae bacterium*, *C. maltaromaticum*, *S. suis*, *S. mutans* y *E. faecalis*), y la única bacteria identificada del Phylum Actinobacteria (*S. rimosus*). En el segundo grupo se encontraría la mayoría de la proteobacterias identificadas (*X. citri*, *X. fuscans*, *E. coli*, y *Er. amylovora*), que mayormente corresponden a patógenos de plantas. En cuanto al Dominio Eukarya, se identificaron secuencias de los Reinos Animalia, Plantae y Fungi, que mayormente son indicativas del hábito alimenticio de *S. frugiperda*. Sin embargo, la identificación del género *Aspergillus* probablemente indique que forma parte de su microbiota intestinal, ya que previamente fue encontrado en dos especies del género *Spodoptera* (Ismail y Abdel-Sater, 1993; Rozadilla, 2016).

El sorgo de Alepo produce cianuro de hidrógeno (HCN) y se cree que, entre otros, la planta utilizaría este veneno como un mecanismo de defensa contra la depredación por insectos. Esto último se vió reflejado en el perfil transcriptómico del intestino de estas

larvas, ya que la mayoría de los genes sobre-representados (dos o más *contigs* con homología a un determinado gen) pertenecían a la categoría “Resistencia, estrés y respuesta ambiental” (Tabla 7). Entre estos cabe mencionar a la citocromo P450, que está involucrada en la eliminación de xenobióticos (drogas y toxinas) del cuerpo (McDowall, 2006), que estuvo representada por 7 *contigs* (Tabla 7). Por otro lado, como ya se ha mencionado, la MP no sólo protege el epitelio intestinal del daño mecánico causado por las partículas de comida, del daño bacteriano, y de la invasión viral (Peters, 1992), sino que, en los insectos fitófagos, también protege de los compuestos tóxicos producidos por las plantas (Barbehenn, 2011). En este sentido, se identificó una proteína de la MP que estuvo representada por 4 *contigs*, una quitina sintasa y una mucina tipo II (Tabla 7). Si bien estas últimas estuvieron representadas por un *contig* cada una, su presencia también indicaría una actividad incrementada de la MP, probablemente debida al HCN producido por *S. halepense*. Por último, entre los genes identificados en el transcriptoma, que contribuyen con la digestión y desintoxicación de la larva, hay posibles candidatos de control biológico para ser utilizados en estrategias de ARNi.

En conclusión, en el metatranscriptoma se identificaron microorganismos que estarían estableciendo relaciones simbióticas con *S. frugiperda* y que, por ende, formarían parte de su microbiota intestinal permanente. En su mayoría, no han sido reportados previamente en esta plaga. Por otro lado, en el transcriptoma se identificaron genes que proveen información acerca de los potenciales efectos que estarían teniendo la fuente alimenticia (*S. halepense*) y las condiciones ambientales sobre las larvas. Más aún, algunos de estos genes representan blancos para control biológico vía ARNi. En estudios posteriores se analizará la efectividad de diferentes dsRNAs por vía tópica y oral contra los genes blanco identificados aquí, con el objetivo de evaluar el ARNi como estrategia de biocontrol para esta plaga.

## **BIBLIOGRAFÍA**

- Adamczyk Jr., J. J., J. W. Holloway, B. R. Leonard and J. B. Graves (1997). "Susceptibility of fall armyworm collected from different plant hosts to selected insecticides and transgenic Bt cotton." J. Cotton Sci. **1**: 21-28.
- Adang, M. J. and K. A. Spence (1983). "Permeability of the peritrophic membrane of the Douglas fir tussock moth (*Orygia pseudotsugata*)." Comp. Biochem. Physiol. **75A**: 233-238.
- Agrawal, S., M. Kelkenberg, K. Begum, L. Steinfeld, C. E. Williams, K. J. Kramer, R. W. Beemant, Y. Parkc, S. Muthukrishnana and H. Merzendorfer (2014). "Two essential peritrophic matrix proteins mediate barrier functions in the insect midgut." Insect Biochem. Mol. Biol. **49**: 24-34.
- Aguilera, C., B. E. Padillah, C. P. Flórezr, J. D. Rubiog and J. R. Acuñaaz (2011). "ARN interferente: Potenciales usos en genómica funcional y control genético de *Hypothenemus hampei* (Coleoptera: Scolytinae)." Revista Colombiana de Entomología **37**(2): 167-172
- Alcaide, M., E. Messina, M. Richter, R. Bargiela, J. Peplies, S. A. Huws, C. J. Newbold, P. N. Golyshin, M. A. Simón, G. López, M. M. Yakimov and M. Ferrer (2012). "Gene sets for utilization of primary and secondary nutrition supplies in the distal gut of endangered *Iberian lynx*." PLoS ONE **7**: e51521.
- Altschul, S. F., W. Gish, W. Miller, E. W. Myers and D. J. Lipman (1990). "Basic local alignment search tool." J. Mol. Biol. **215**(3): 403-410.
- Andersen, S. O., P. Hojrup and P. Roepstorff (1986). "Characterization of cuticular proteins from the migratory locust, *Locusta migratoria*." Insect Biochem. **16**: 441-447.
- Andersen, S. O., K. Rafn, T. N. Krogh, P. Hojrup and P. Roepstorff (1995). "Comparison of larval and pupal cuticular proteins in *Tenebrio molitor*." Insect Biochem. Mol. Biol. **25**: 177-187.
- Arakane, Y., S. Muthukrishnan, K. J. Kramer, C. A. Specht, Y. Tomoyasu, M. D. Lorenzen, M. Kanost and R. W. Beeman (2005). "The *Tribolium* chitin synthase genes TcCHS1 and TcCHS2 are specialized for synthesis of epidermal cuticle and midgut peritrophic matrix respectively." Insect Mol. Biol. **14**: 453-463.
- Barbehenn, R. V. (2001). "Roles of peritrophic membranes in protecting herbivorous insects from ingested plant allelochemicals." Arch Insect Biochem Physiol **47**(2): 86-99.
- Bariami, V., C. M. Jones, R. Poupardin, J. Vontas and H. Ranson (2012). "Gene amplification, ABC transporters and cytochrome P450s: unraveling the molecular basis of pyrethroid resistance in the dengue vector, *Aedes aegypti*." PLoS Negl. Trop. Dis. **6** (6): e1692.
- Barry, M. K., A. A. Triplett and A. C. Christensen (1999). "A peritrophin-like protein expressed in the embryonic tracheae of *Drosophila melanogaster*." Insect Biochem Mol Biol **29**(4): 319-327.

- Baum, J. A., T. Bogaert, W. Clinton, G. R. Heck, P. Feldmann, O. Ilagan, S. Johnson, G. Plaetinck, T. Munyikwa, M. Pleau, T. Vaughn and J. Roberts (2007). "Control of coleopteran insect pests through RNA interference." Nat Biotechnol **25**(11): 1322-1326.
- Bautista, M. A., T. Miyata, K. Miura and T. Tanaka (2009). "RNA interference-mediated knockdown of a cytochrome P450, CYP6BG1, from the diamondback moth, *Plutella xylostella*, reduces larval resistance to permethrin." Insect Biochem Mol Biol **39**(1): 38-46.
- Becker, B. (1980). "Effects of polyoxin D on *in vitro* synthesis of peritrophic membranes in *Calliphora erythrocephala*." Insect Biochem. **10**: 101–106.
- Belser, L. W. (1979). "Population ecology of nitrifying bacteria." Annual reviews in microbiology **33**: 309-333.
- Berenbaum, M. R. (1988). Micro-organisms as mediators of intertrophic and intratrophic interactions. Novel Aspects of Insect-Plant Interactions. Wiley. New York, P Barbosa, DK Letourneau: 91-123.
- Berg, R. D. (1996). "The indigenous gastrointestinal microflora " Trends Microbiol. **4**: 430-435.
- Berta, C. D., E. G. Virla, M. V. Colomo and L. Valverde (2000). "Efecto en el parasitoide *Campoletis grioti* de un insecticida usado para el control de *Spodoptera frugiperda* y aportes a la bionomía del parasitoide." Manejo Integrado de Plagas (Costa Rica) **57**: 65-70.
- Beyenbach, K. W. and H. Wiczorek (2006). "The V-type H<sup>+</sup> ATPase: molecular structure and function, physiological roles and regulation." Experimental Biology **209**: 577-589
- Bhat, T. K., B. Singh and O. P. Sharma (1998). "Microbial degradation of tannins-a current perspective." Biodegradation **9**: 343-357.
- Bhatti, A. G., J. E. Endrizzi and R. G. Reeves (1960). "Origin of Johnsongrass." Journal of Heredity: 107-110.
- Bohlander, S. K., R. Espinosa, 3rd, M. M. Le Beau, J. D. Rowley and M. O. Diaz (1992). "A method for the rapid sequence-independent amplification of microdissected chromosomal material." Genomics **13**(4): 1322-1324.
- Bolognesi, R., A. F. Ribeiro, W. R. Terra and C. Ferreira (2001). "The peritrophic membrane of *Spodoptera frugiperda*: secretion of peritrophins and role in immobilization and recycling digestive enzymes." Arch Insect Biochem Physiol **47**(2): 62-75.
- Bretschneider, G., J. Mattera and E. Salado (2011). Intoxicación del ganado con Ácido Cianhídrico. Rafaela, Santa Fe, Argentina, INTA.
- Burkart, A. (1969). Flora Ilustrada de Entre Ríos. Tomo VI, Parte II Gramíneas.: 551.
- Caligiuri, L. G., S. A. Acardi, M. Soledad Santini, O. D. Salomon and C. B. McCarthy (2014). "Polymerase chain reaction-based assay for the detection and identification



of sand fly gregarines in *Lutzomyia longipalpis*, a vector of visceral leishmaniasis." J Vector Ecol **39**(1): 83-93.

- Capinera, J. L. (1999). Fall Armyworm, *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Insecta: Lepidoptera: Noctuidae). U. I. E. Department of Entomology and Nematology. Gainesville, Florida. **EENY098**.
- Casmuz, A., M. L. Juárez, M. G. Socías, M. G. Murúa, S. Prieto, S. Medina, E. Willink and G. Gastaminza (2010). "Revisión de los hospederos del gusano cogollero del maíz, *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae)." Rev. Soc. Entomol. Argent. **69** (3-4): 209-231.
- Clavijo, S. and G. P. Greiner (2000). Protección y sanidad vegetal. Insectos plagas del maíz. H. y. C. G. N. F. Nieves. Caracas, Venezuela, Fundación Polar. **2**: 345-361.
- Collins, M. D., J. A. E. Farrow, B. A. Phillips, S. Ferusu and D. Jones (1987). "Classification of *Lactobacillus divergens*, *Lactobacillus piscicola*, and some catalase-negative, asporogenous, rod-shaped bacteria from poultry in a new genus, *Carnobacterium*." Int. J. System Bacteriol. **37**: 310–316.
- Collins, M. D., R. A. Hutson, G. Foster, E. Falsen and N. Weiss (2002). "*Isobaculum melis* gen. nov., sp. nov., a *Carnobacterium*-like organism isolated from the intestine of a badger." Int. J. System Evol. Microbiol. **52**: 207–210.
- Coventry, M. J., J. B. Gordon, A. Wilcock, K. Harmark, B. E. Davidson, M. W. Hickey, A. J. Hillier and J. Wan (1997). "Detection of bacteriocins of lactic acid bacteria isolated from foods and comparison with pediocin and nisin." Appl. Microbiol. **83**: 248–258.
- Coy, M. R., N. D. Sanscrainte, K. C. Chalaire, A. Inberg, I. Maayan, E. Glick and e. al. (2012). "Gene silencing in adult *Aedes aegypti* mosquitoes through oral delivery of double-stranded RNA." J. Appl. Entomol. **136**: 741-748.
- Cross, J. H. (1996). Filarial Nematodes. Baron's Medical Microbiology (4th ed.). S. e. a. Baron. Texas, Univ of Texas Medical Branch.
- Cruden, D. L. and A. J. Markovetz (1987). "Microbial ecology of the cockroach gut." Annu. Rev. Microbiol. **413**: 617-643.
- Challis, G. L. and D. A. Hopwood (2003). "Synergy and contingency as driving forces for the evolution of multiple secondary metabolite production by *Streptomyces* species." P. Natl. Acad. Sci. **100**: 14555–14561.
- Chen, B., B. S. Teh, C. Sun, S. Hu, X. Lu, W. Boland and Y. Shao (2016). "Biodiversity and Activity of the Gut Microbiota across the Life History of the Insect Herbivore *Spodoptera littoralis*." Sci Rep **6**: 29505.
- Davies, S. A., S. F. Goodwin, D. C. Kelly, Z. Wang, M. A. Sozen, K. Kaiser and J. A. Dow (1996). "Analysis and inactivation of *vha55*, the gene encoding the vacuolar ATPase B-subunit in *Drosophila melanogaster* reveals a larval lethal phenotype." J. Biol. Chem. **271**: 30677-30684.
- De Mets, R. and C. Jeuniaux (1962). "Sur les substances organiques constituant la membrane peritrophique des insectes." Archs. Int. Physiol. Biochem. **70**: 93–96.

- del Rincón Castro, M. C., J. M. Lozano and J. E. Ibarra (2006). "Caracterización de Cepas nativas de *Bacillus thuringiensis* con actividad hacia el gusano cogollero del maíz *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera:Noctuidae)." Folia Entomologic Mexicana **45**(2): 157-164.
- Delon, I. and F. Payre (2004). "Evolution of larval morphology in flies: get in shape with shavenbaby." Trends Genet. **20**: 305-313.
- Ding, X. and Y. L. Hou (2012). "Identification of genetic characterization and volatile compounds of *Tricholoma matsutake* from different geographical origins." Biochem. Syst. Ecol. **44**: 233-239.
- Dittmer, N. T., Y. Hiromasa, J. M. Tomich, N. Lu, R. W. Beeman, K. J. Kramer and M. R. Kanost (2012). "Proteomic and transcriptomic analyses of rigid and membranous cuticles and epidermis from the elytra and hindwings of the red flour beetle, *Tribolium castaneum*." J. Proteome Res. **11**: 269-278.
- Douglas, A. E. (1992). Microbial brokers of insect-plant interactions. Proc. 8th Int. Symp. Insect-Plant Relationships. Dordrecht, Neth, Kluwer: 329–336.
- Douglas, A. E. (1998). "Nutritional interactions in insect-microbial symbioses: aphids and their symbiotic bacteria Buchnera." Annu. Rev. Entomol. **43**: 17-37.
- Drasar, B. S. and B. I. Duerden (1991). Anaerobes in the normal flora of man. Anaerobes in Human Disease. B. I. Duerden and B. S. Draser. New York, Wiley-Liss: 162–179.
- Egert, M., B. Wagner, T. Lemke, A. Brune and M. W. Friedrich (2003). "Microbial community structure in midgut and hindgut of the humus-feeding larva of *Pachnoda ephippiata* (Coleoptera: Scarabaeidae)." Appl. Environ. Microbiol. **69**: 6659-6668.
- Escribano, A., T. Williams, D. Goulson, R. Cave and P. Caballero (2000). "Parasitoid-Pathogen-Pest Interactions of *Chelonus insularis*, *Campoletis sonorensis*, and a Nucleopolyhedrovirus in *Spodoptera frugiperda* Larvae." Biological Control **19**: 265-273.
- Farias, J., D. Andow, R. Horikoshi, R. Sorgatto, P. Fresia, A. d. Santos and C. Omoto (2014). "Field-evolved resistance to Cry1F maize by *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) in Brazil." Crop Prot. **64**: 150-158.
- Finley, A. C., G. L. Hobby, S. Y. P'an, P. P. Regna, J. B. Routien, D. B. Seeley, G. M. Schull, B. A. Sobin, I. A. Solomons, J. W. Vinson and J. H. Kane (1950). "Terramycin, a new antibiotic." Science (111): 85.
- Fogarty, W. M. (1994). Enzymes of the genus *Aspergillus*. Aspergillus. e. J. E. Smith. New York, Plenum Press: 177–218.
- Futahashi, R., S. Okamoto, H. Kawasaki, Y.-S. Zhong, M. Iwanaga, K. Mita and H. Fujiwara (2008). "Genome-wide identification of cuticular protein genes in the silkworm, *Bombyx mori*." Insect Biochem. Mol. Biol. **38**: 1138-1146.
- García Roa, F., A. T. Mosquera, C. Vargas and L. Rojas (1999). "Manejo integrado del gusano cogollero del maíz *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith)." CORPOICA Bol. Téc. Palmira (Colombia) **7**: 8pp.

- Gardner, W. A., R. Noblet and R. D. Schwehr (1984). "The potential of microbial agents in managing populations of the fall armyworm. ." Florida Entomologist, Gainesville **67**(3): 325-332.
- Geley, S. and C. Muller (2004). "RNAi: ancient mechanism with a promising future." Exp Gerontol **39**(7): 985-998.
- Giordani, C. and M. Miguens (1978). Cuadernos de Actualización Técnica 22. Sorgo de Alepo. A. A. d. C. R. d. E. A. (AACREA). Buenos Aires.
- Gordon, D. M. and A. Cowling (2003). "The distribution and genetic structure of *Escherichia coli* in Australian vertebrates: host and geographic effects." Microbiology **149**: 3575–3586.
- Gottschalk, M. (2012). Streptococcosis. Diseases of Swine. J. J. Zimmerman, L. A. Karriker, A. Ramirez, K. J. Schwartz and G. W. Stevenson, John Wiley & Sons: 843.
- Greiner, T. and F. Bäckhed (2011). "Effects of the gut microbiota on obesity and glucose homeostasis." Trends Endocrinol. Metab. **22**: 117–123.
- Groot, A. T. and M. Dicke (2002). "Insect-resistant transgenic plants in a multi-trophic context." Plant J. **31**: 387–406.
- Guerin-Laguette, A., K. Shindo, N. Matsushita, K. Suzuki and F. Lapeyrie (2004). "The mycorrhizal fungus *Tricholoma matsutake* stimulates *Pinus densiflora* seedling growth in vitro." Mycorrhiza **14**: 397-400.
- Gugnani, H. C. (2003). "Ecology and taxonomy of pathogenic Aspergilli." Frontiers in Bioscience **8**: s346-357.
- Han, I., S. Congeevaram, D. W. Ki, B. T. Oh and J. Park (2010). "Bacterial community analysis of swine manure treated with autothermal thermophilic aerobic digestion." Appl. Microbiol. Biotechnol. **89**: 835–842.
- Hannon, G. J. (2002). "RNA interference." NATURE **418**(6894): 244-251.
- Hayward, A. C. (1993). The hosts of *Xanthomonas*. Xanthomonas. J. G. Swings and E. L. Civerolo. Dordrecht, Springer.
- Hegedus, D., M. Erlandson, C. Gillott and U. Toprak (2009). "New insights into peritrophic matrix synthesis, architecture, and function." Annu Rev Entomol **54**: 285-302.
- Holm, L., D. L. Plucknett, J. V. Pancho and J. P. Herberger (1977). *Sorghum halepense* (L.). The World's Worst Weeds: Distribution and Biology. Honolulu, Hawaii, University Press.: 64-61.
- Huson, D. H., A. F. Auch, J. Qi and S. C. Schuster (2007). "MEGAN analysis of metagenomic data." Genome Res **17**(3): 377-386.
- Huson, D. H., S. Mitra, H. J. Ruscheweyh, N. Weber and S. C. Schuster (2011). "Integrative analysis of environmental sequences using MEGAN4." Genome Res **21**(9): 1552-1560.

- Huttenhower, C., D. Gevers, R. Knight, S. Abubucker, J. Badger, A. Chinwalla and e. al. (2012). "Structure, function and diversity of the healthy human microbiome." Nature **486**(7402): 207-214.
- Huvenne, H. and G. Smagge (2010). "Mechanisms of dsRNA uptake in insects and potential of RNAi for pest control: a review." J Insect Physiol **56**(3): 227-235.
- Iskandar, C. F., F. Borges, B. Taminiau, G. Daube, M. Zagorec, B. Remenant, J. J. Leisner, M. A. Hansen, S. J. Sørensen, C. Mangavel, C. Cailliez-Grimal and A.-M. Revol-Junelles (2017). "Comparative Genomic Analysis Reveals Ecological Differentiation in the Genus *Carnobacterium*." Frontiers in Microbiology **8**: 357.
- Ismail, M. A. and M. A. Abdel-Sater (1993). "Fungi associated with the Egyptian cotton leafworm *Spodoptera littoralis* Boisdoval." Mycopathologia **124**: 79-86.
- Jensen, R. L., K. S. Pedersen, V. Loeschcke, H. Ingmer and J. J. Leisner (2007). "Limitations in the use of *Drosophila melanogaster* as a model host for Gram positive bacterial infection." Lett. Appl. Microbiol. **44**: 218–223.
- Jin, S., N. D. Singh, L. Li, X. Zhang and H. Daniell (2015). "Engineered chloroplast dsRNA silences cytochrome p450 monooxygenase, V-ATPase and chitin synthase genes in the insect gut and disrupts *Helicoverpa armigera* larval development and pupation." Plant Biotechnol J **13**: 435-446.
- Jones, C. G. (1984). Microorganisms as mediators of plant resource exploitation by insect herbivores. A New Ecology: Novel Approaches to Interactive Systems. Wiley. New York, PW Price, CN Slobodchikoff, WS Graud: 53-99.
- Kaltenpoth, M. (2009). "Actinobacteria as mutualists: general healthcare for insects? ." Trends Microbiol. **17**: 529-535.
- Kanehisa, M., M. Araki, S. Goto, M. Hattori, M. Hirakawa, M. Itoh, T. Katayama, S. Kawashima, S. Okuda, T. Tokimatsu and Y. Yamanishi (2008). "KEGG for linking genomes to life and the environment." Nucleic Acids Res **36**(Database issue): D480-484.
- Kato, H., J. M. Anderson, S. Kamhawi, F. Oliveira, P. G. Lawyer, V. M. Pham, C. S. Sangare, S. Samake, I. Sissoko, M. Garfield, L. Sigutova, P. Volf, S. Doumbia and J. G. Valenzuela (2006). "High degree of conservancy among secreted salivary gland proteins from two geographically distant *Phlebotomus duboscqi* sandflies populations (Mali and Kenya)." BMC Genomics **7**: 226.
- Kelkenberg, M., J. Odman-Naresh, S. Muthukrishnan and H. Merzendorfer (2015). "Chitin is a necessary component to maintain the barrier function of the peritrophic matrix in the insect midgut " Insect Biochem. Mol. Biol. **56**: 21-28.
- Kimble, L., K. L. Mandelco, C. R. Woese and M. T. Madigan (1995). "*Heliobacterium modesticaldum*, sp. nov., a thermophilic heliobacterium of hot springs and volcanic soils " Arch. Microbiol. **163**: 259-267
- Köhler, T., C. Dietrich, R. H. Scheffrahn and A. Brune (2012). "High-resolution analysis of gut environment and bacterial microbiota reveals functional compartmentation of the

- gut in wood-feeding higher termites *Nasutitermes* spp. ." Appl. Environ. Microbiol. **78**: 4691-4701.
- Kosek, M., C. Bern and R. L. Guerrant (2003). "The global burden of diarrhoeal disease, as estimated from studies published between 1992 and 2000." Bull. World Health Organ **81**: 197-204.
- Krenn, H. W. (2010). "Feeding mechanisms of adult Lepidoptera: structure, function, and evolution of the mouthparts." Annu Rev Entomol **55**: 307-327.
- Kumar, N. S., B. Tang, X. Chen, H. Tian and W. Zhang (2008). "Molecular cloning, expression pattern and comparative analysis of chitin synthase gene B in *Spodoptera exigua*." Comparative Biochemistry and Physiology **149**: 447–453.
- Kuzina, L. V., J. J. Peloquin, D. C. Vacek and T. A. Miller<sup>1</sup> (2001). "Isolation and Identification of Bacteria Associated with Adult Laboratory Mexican Fruit Flies, *Anastrepha ludens* (Diptera: Tephritidae)." Current Microbiology **42**: 290–294.
- Leguizamón, E. S. (2006). Sorghum halepense. L. Pers. (Sorgo de Alepo): base de conocimientos para su manejo en sistemas de producción. Zavalla, Santa Fe, Facultad de Ciencias Agrarias, UNR.
- Lehane, M. and P. Billingsley (1996). The Biology of the Insect Midgut. London, UK, Chapman and Hall.
- Leisner, J. J., B. G. Laursen, H. Prévost, D. Drider and P. Dalgaard (2007). "Carnobacterium: positive and negative effects in the environment and in foods." FEMS Microbiol. Rev. **31**: 592–613.
- Leisner, J. J., J. Tidemand and L. M. Larsen (1994). "Catabolism of arginine by *Carnobacterium* spp. isolated from vacuum-packed sugar-salted fish " Curr. Microbiol. **29**: 95-99.
- Leiva, P. (2014). Oruga militar tardía *Spodoptera frugiperda*, una plaga de los maíces tardíos. Pergamino, Provincia Buenos Aires, INTA.
- Lewus, C. B., A. Kaiser and T. J. Montville (1991). "Inhibition of foodborne bacterial pathogens by bacteriocins from lactic acid bacteria isolated from meat." Appl. Environ. Microbiol. **57**: 1683–1688.
- Liang, J., L. Zhang, Z. Xiang and N. He (2010). "Expression profile of cuticular genes of silkworm, *Bombyx mori*." BMC genomics **11**: 173.
- Loesche, W. J. (1986). "Role of *Streptococcus mutans* in Human Dental Decay." Microbiol. Rev. **50**(4): 353-380.
- Maciel-Rosas, A. M., V. M. Juárez-Pérez, L. Aguilar-Hennonín and J. E. Ibarra (1994). "Aislamiento y caracterización de una cepa nueva de *Bacillus thuringiensis*, esencialmente inmóvil y altamente tóxica a *Manduca sexta* (Lepidoptera: Sphingidae)." Vedalia **1**: 3-12.
- Macovei, L. and L. Zurek (2006). "Ecology of Antibiotic Resistance Genes: Characterization of Enterococci from Houseflies Collected in Food Settings." Applied and Environmental Microbiology **72**(6): 4028-4035.

- Madigan, M. T. (1995). Microbiology of nitrogen fixation by anoxygenic photosynthetic bacteria. Anoxygenic Photosynthetic Bacteria. R. E. Blankenship, M. T. Madigan and C. E. Bauer. Dordrecht, The Netherlands, Kluwer Academic Publishers: 915-928.
- Mao, Y. B., W. J. Cai, J. W. Wang, G. J. Hong, X. Y. Tao, L. J. Wang, Y. P. Huang and X. Y. Chen (2007). "Silencing a cotton bollworm P450 monooxygenase gene by plant-mediated RNAi impairs larval tolerance of gossypol." Nat Biotechnol **25**(11): 1307-1313.
- Margulies, M., M. Egholm, W. E. Altman, S. Attiya, J. S. Bader, L. A. Bembien, J. Berka, M. S. Braverman, Y. J. Chen, Z. Chen, S. B. Dewell, L. Du, J. M. Fierro, X. V. Gomes, B. C. Godwin, W. He, S. Helgesen, C. H. Ho, G. P. Irzyk, S. C. Jando, M. L. Alenquer, T. P. Jarvie, K. B. Jirage, J. B. Kim, J. R. Knight, J. R. Lanza, J. H. Leamon, S. M. Lefkowitz, M. Lei, J. Li, K. L. Lohman, H. Lu, V. B. Makhijani, K. E. McDade, M. P. McKenna, E. W. Myers, E. Nickerson, J. R. Nobile, R. Plant, B. P. Puc, M. T. Ronan, G. T. Roth, G. J. Sarkis, J. F. Simons, J. W. Simpson, M. Srinivasan, K. R. Tartaro, A. Tomasz, K. A. Vogt, G. A. Volkmer, S. H. Wang, Y. Wang, M. P. Weiner, P. Yu, R. F. Begley and J. M. Rothberg (2005). "Genome sequencing in microfabricated high-density picolitre reactors." Nature **437**(7057): 376-380.
- Marquis, R. E., G. R. Bender, D. R. Murray and A. Wong (1987). "Arginine deiminase system and bacterial adaptation to acid environments." Appl. Environ. Microbiol. **53**: 198-200.
- McCarthy, C. B., N. A. Cabrera and E. G. Virla (2015). "Metatranscriptomic analysis of larval guts from field-collected and laboratory-reared *Spodoptera frugiperda* from the South American subtropical region." Genome announcements **3**: e00777-00715.
- McCarthy, C. B., L. A. Diambra and R. V. Rivera Pomar (2011). "Metagenomic analysis of taxa associated with *Lutzomyia longipalpis*, vector of visceral leishmaniasis, using an unbiased high-throughput approach." PLOS Negl. Trop. Dis. **5**(9): e1304.
- McCarthy, C. B., M. S. Santini, P. F. Pimenta and L. A. Diambra (2013). "First Comparative Transcriptomic Analysis of Wild Adult Male and Female *Lutzomyia longipalpis*, Vector of Visceral Leishmaniasis." PLoS One **8**(3): e58645.
- McDowall, J. (2006). "Cytochrome P450." Molecule of the Month: Cytochrome P450, from [https://www.ebi.ac.uk/interpro/potm/2006\\_10/Page1.htm](https://www.ebi.ac.uk/interpro/potm/2006_10/Page1.htm).
- McMichael, M. and D. P. Prowell (1999). "Differences in amplified fragment-length polymorphisms in fall armyworm (Lepidoptera: Noctuidae) host strains." Ann. Entomol. Soc. America **92**: 175-181.
- Mello, C. C. and D. Conte (2004). "Revealing the world of RNA interference." NATURE **431**: 338-342.
- Missios, S., H. C. Davidson, D. Linder, L. Mortimer, A. O. Okobi and J. S. Doctor (2000). "Characterization of cuticular proteins in the red flour beetle, *Tribolium castaneum*." Insect Biochem. Mol. Biol. **30**: 47-56.
- Monnerat, R., E. Martins, C. Macedo, P. Queiroz, L. Praca, C. M. Soares, H. Moreira, I. Grisi, J. Silva, M. Soberon and A. Bravo (2015). "Evidence of field-evolved resistance

of *Spodoptera frugiperda* to Bt corn expressing Cry1F in Brazil that is still sensitive to modified Bt toxins." PLoS One **10**(4): e0119544.

- Moore, W. E. C., J. L. Johnson and L. V. Holdeman (1976). "Emendation of *Bacteroidaceae* and *Butyrivibrio* and Descriptions of *Desulfomonas* gen. nov. and Ten New Species in the Genera *Desulfomonas*, *Butyrivibrio*, *Eubacterium*, *Clostridium*, and *Ruminococcus*." Int. J. Syst. Bacteriol **26**(2): 238-252.
- Moussian, B. (2010). "Recent advances in understanding mechanisms of insect cuticle differentiation." Insect Biochem. Mol. Biol. **40**: 363-375.
- Moussian, B., H. Schwarz, S. Bartoszewski and C. Nüsslein-Volhard (2005). "Involvement of chitin in exoskeleton morphogenesis in *Drosophila melanogaster*." J. Morphol. **264**: 117-130.
- Murúa, G., J. Molina-Ochoa and C. Coviella (2006). "Population dynamics of the fall armyworm, *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) and its parasitoids in northwestern Argentina." Florida Entomologist **89**(2): 175-182.
- Murúa, G. and E. G. Virla (2003). "Evaluación de cuatro dietas artificiales para la cría de *Spodoptera frugiperda* (Lep.: Noctuidae) destinada a mantener poblaciones experimentales de himenópteros parasitoides." Bol. San. Veg. Plagas **29**: 43-51.
- Murúa, G., E. G. Virla and P. Fidalgo (2002). Relevamiento de los parasitoides de *Spodoptera frugiperda* (Lep., Noctuidae) en distintas zonas maiceras del Noroeste Argentino. V Congreso Argentino de Entomología, Buenos Aires.
- Murúa, M. G., M. L. Juárez, S. Prieto and E. Willink (2009). "Distribución temporal y espacial de poblaciones de *Spodoptera frugiperda* (Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) en diferentes hospederos en provincias del norte de Argentina." Rev. Ind. y Agríc. de Tucumán **86** (1): 25-36.
- Nagoshi, R. N. and R. L. Meagher (2004). "Behavior and distribution of the two fall armyworm host strains in Florida." Florida Entomologist **87**(4): 440-449.
- Nakanishi, K., K. Yaoi, Y. Nagino, H. Hara, M. Kitami, S. Atsumi, N. Miura and R. Sato (2002). "Aminopeptidase N isoforms from the midgut of *Bombyx mori* and *Plutella xylostella* – their classification and the factors that determine their binding specificity to *Bacillus thuringiensis* Cry1A toxin." FEBS Lett. **519**: 215-220.
- Okamoto, S., R. Futahashi, T. Kojima, K. Mita and H. Fujiwara (2008). "Catalogue of epidermal genes: genes expressed in the epidermis during larval molt of the silkworm *Bombyx mori*." BMC genomics **9**: 396.
- Ono, M. and S. Kato (1968). "Studies on the dissolution of peritrophic membrane in the silkworm, *Bombyx mori* L. II. On the bacterial enzyme, which decomposes peritrophic membrane, obtained from the culture of *Aeromonas* " Bull. Sericult. Exp. Stn. Jpn. **23**: 28–34.
- Overbeek, R., T. Begley, R. M. Butler, J. V. Choudhuri, H. Y. Chuang, M. Cohoon, V. de Crecy-Lagard, N. Diaz, T. Disz, R. Edwards, M. Fonstein, E. D. Frank, S. Gerdes, E. M. Glass, A. Goessmann, A. Hanson, D. Iwata-Reuyl, R. Jensen, N. Jamshidi, L. Krause, M. Kubal, N. Larsen, B. Linke, A. C. McHardy, F. Meyer, H. Neuweger, G.

- Olsen, R. Olson, A. Osterman, V. Portnoy, G. D. Pusch, D. A. Rodionov, C. Ruckert, J. Steiner, R. Stevens, I. Thiele, O. Vassieva, Y. Ye, O. Zagnitko and V. Vonstein (2005). "The subsystems approach to genome annotation and its use in the project to annotate 1000 genomes." Nucleic Acids Res **33**(17): 5691-5702.
- Pashley, D. P. (1986). "Host-associated genetic differentiation in fall armyworm (Lepidoptera: Noctuidae): a sibling species complex?" Ann. Entomol. Soc. America **79**: 898-904.
- Pashley, D. P. (1988a). "Current status of fall armyworm host strains." Florida Entomologist **71**: 227-234.
- Pashley, D. P. (1988b). "Quantitative genetics, development, and physiological adaptation in host strains of fall armyworm." Evolution **42**: 93-102.
- Pashley, D. P., T. N. Hardy and A. M. Hammond (1995). "Host effects on developmental and reproductive traits in fall armyworm strains (Lepidoptera: Noctuidae)." Ann. Entomol. Soc. America **88**: 748- 755.
- Peters, W. (1992). Peritrophic Membranes. Berlin/Heidelberg, Germany, Springer-Verlag.
- Piqué, N., D. Miñana-Galbis, S. Merino and J. M. Tomás (2015). "Virulence Factors of *Erwinia amylovora*: A Review." Int. J. Mol. Sci. **16**: 12836-12854.
- Poulsen, M. and P. Sapountzis (2012). "Behind every great ant, there is a great gut." Mol. Ecol. **21**(9): 2054-2057.
- Rajagopal, R., S. Sivakumar, N. Agrawal, P. Malhotra and R. K. Bhatnagar (2002). "Silencing of midgut aminopeptidase N of *Spodoptera litura* by double-stranded RNA establishes its role as *Bacillus thuringiensis* toxin receptor." J Biol Chem **277**(49): 46849-46851.
- Romero Sueldo De Escaño, M. and E. G. Virla (2009). "*Doru lineare* (Dermaptera: Forficulidae), insecto benéfico en cultivos de maíz del norte argentino: preferencias alimenticias y tasas de consumo." Bol. San. Veg. Plagas **35**(39-47).
- Ross, L., C. E. Tellam, C. Rosanne and P. Roger (2000). "The intrinsic peritrophic matrix protein peritrophin-95 from larvae of *Lucilia cuprinis* synthesised in the cardia and regurgitated or excreted as a highly immunogenic protein." Insect Biochem. Mol. Biol. **30**: 9-17.
- Rozadilla, G. (2016). Análisis taxonómico y funcional del metagenoma asociado al tracto digestivo de *Spodoptera frugiperda*, plaga de interés agrícola. 54. C. B. McCarthy. Universidad Nacional de La Plata.
- Ruiz-Nájera, R. E., R. A. Ruiz-Estudillo, J. M. Sánchez-Yáñez, J. Molina-Ochoa, S. R. Skoda, R. Coutiño-Ruiz, R. Pinto-Ruiz, F. Guevara-Hernández and J. E. Foster (2013). "Occurrence of Entomopathogenic Fungi and Parasitic Nematodes on *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) Larvae Collected in Central Chiapas, México." Florida Entomological **96**(2): 498-503.
- Russo, T. A. and J. R. Johnson (2003). "Medical and economic impact of extraintestinal infections due to *Escherichia coli*: focus on an increasingly important endemic problem." Microbes Infect. **5**: 449-456



- Sambade, A., S. Martin, A. Olmos, M. L. Garcia, M. Cambra, O. Grau, J. Guerri and P. Moreno (2000). "A fast one-step reverse transcription and polymerase chain reaction (RT-PCR) amplification procedure providing highly specific complementary DNA from plant virus RNA." J Virol Methods **87**(1-2): 25-28.
- Sandoval-Mojica, A. F. and M. E. Scharf (2016). "Silencing gut genes associated with the peritrophic matrix of *Reticulitermes flavipes* (Blattodea: Rhinotermitidae) increases susceptibility to termiticides " Insect Molecular Biology **25**: 734–744.
- Sarauer, B. L., C. Gillott and D. D. Hegedus (2003). "Characterization of an intestinal mucin from the peritrophic matrix of the diamondback moth, *Plutella xylostella*." Insect Mol. Biol. **12**: 333-343.
- Schauer, C., C. L. Thompson and A. Brune (2012). "The bacterial community in the gut of the cockroach *Shelfordella lateralis* reflects the close evolutionary relatedness of cockroaches and termites." Appl. Environ. Microbiol. **78**: 2758-2767.
- Schillinger, U. and W. H. Holzapfel (1995). The genus Carnobacterium. The Genera of Lactic Acid Bacteria. B. J. B. Wood and W. H. Holzapfel. London, Blackie Academic & Professional: 307–326.
- Shannon, A. L., G. Attwood, D. H. Hopcroft and J. T. Christeller (2001). "Characterization of lactic acid bacteria in the larval midgut of the keratinophagous lepidopteran *Hofmannophila pseudospretella*." Lett Appl. Microbiol. **32**: 36-41.
- Shao, L., M. M. Devenport and M. Jacobs-Lorena (2001). "The peritrophic matrix of hematophagous insects." Arch. Insect Biochem. Physiol. **47**: 119–125.
- Shao, Y., E. Arias-Cordero, H. Guo, S. Bartram and W. Boland (2014). "In vivo Pyro-SIP assessing active gut microbiota of the cotton leafworm, *Spodoptera littoralis*." PLoS One **9**(1): e85948.
- Shen, Z. and M. Jacobs-Lorena (1999). "Evolution of chitin-binding proteins in invertebrates." J. Mol. Evol. **48**: 341–347.
- Shi, X., M. Chamankhah, S. Visal-Shah, S. M. Hemmingsen, M. Erlandson, L. Braun, M. Alting-Mees, G. G. Khachatourians, M. O'Grady and D. D. Hegedus (2004). "Modeling the structure of the Type I peritrophic matrix: Characterization of a *Mamestra configurata* intestinal mucin and a novel peritrophin containing 19 chitin binding domains." Insect Biochem. Mol. Biol. **34**: 1101–1115.
- Snodgrass, R. E. (1935). The alimentary canal. Principles of insect morphology. New York, McGraw-Hill: 280-312.
- Sosa, M. A. and D. E. Vitti-Scarel (2004). Impacto del gusano cogollero (*Spodoptera frugiperda* Smith) en maíces Bt en el norte santafesino. Reunión de Comunicaciones Científicas y Tecnológicas 2004. Facultad Ciencias Agrarias, UNNE, Resistencia, Chaco. , INTA E.E.A. Reconquista.
- Sparks, A. N. (1979). "A review of the biology of the fall armyworm." Florida Entomologist **62** (2): 82-87.
- Sriskandan, S. and J. D. Slater (2006). "Invasive Disease and Toxic Shock due to Zoonotic *Streptococcus suis*: An Emerging Infection in the East?" PLoS Medicine **3**(5): e187.

- Storer, N., J. Babcock, M. Schlenz, T. Meade, G. Thompson, J. Bing and R. Huckaba (2010). "Discovery and characterization of field resistance to Bt maize: *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) in Puerto Rico." J. Econ. Entomol. **103**: 1031-1038.
- Tang, K.-H., H. Yue and R. E. Blankenship (2010). "Research article Energy metabolism of *Heliobacterium modesticaldum* during phototrophic and chemotrophic growth." BMC Microbiology **10**: 150.
- Tatusov, R. L., N. D. Fedorova, J. D. Jackson, A. R. Jacobs, B. Kiryutin, E. V. Koonin, D. M. Krylov, R. Mazumder, S. L. Mekhedov, A. N. Nikolskaya, B. S. Rao, S. Smirnov, A. V. Sverdlov, S. Vasudevan, Y. I. Wolf, J. J. Yin and D. A. Natale (2003). "The COG database: an updated version includes eukaryotes." BMC Bioinformatics **4**: 41.
- Tegtmeier, D., C. Riese, O. Geissinger, R. Radek and A. Brune (2016). "*Breznakia blatticola* gen. nov. sp. nov. and *Breznakia pachnodae* sp. nov., two fermenting bacteria isolated from insect guts, and emended description of the family *Erysipelotrichaceae*." Syst. Appl. Microbiol. **39**: 319–329.
- Tellam, R. L., G. Wijffels and P. Willadsen (1999). "Peritrophic matrix proteins." Insect Biochem. Mol. Biol. **29**: 87-101.
- Tian, H., H. Peng, Q. Yao, H. Chen, Q. Xie, B. Tang and W. Zhang (2009). "Developmental control of a lepidopteran pest *Spodoptera exigua* by ingestion of bacteria expressing dsRNA of a non-midgut gene." PLoS ONE **4**(7): e6225.
- Toprak, U., D. Baldwin, M. Erlandson, C. Gillott, S. Harris and D. D. Hegedus (2013). "In vitro and in vivo application of RNA interference for targeting genes involved in peritrophic matrix synthesis in a lepidopteran system." Insect Sci. **20**: 92–100.
- Veenstra, K. H., P. P. D. and J. A. Ottea (1995). "Host-plant adaptation in fall armyworm host strains: comparison of food consumption, utilization, and detoxication enzyme activities." Ann. Entomol. Soc. America **88**: 80-91.
- Vera, M., L. Valverde, S. B. Popich and Z. A. d. Toledo (1995). "Evaluación preliminar de los enemigos naturales de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera:Noctuidae) en Tucumán, Argentina." Acta Entomológica Chilena **19**: 135-141.
- Verbag, S., M. Göker, S. Scheuner, P. Schumann and E. Stackebrandt (2014). The families *Erysipelotrichaceae* emend., *Coprobacillaceae* fam. nov., and *Turicibacteraceae* fam. nov. The Prokaryotes. E. Rosenberg, E. F. DeLong, S. Lory, E. Stackebrandt and F. Thompson. Berlin, Springer: 79-105.
- Vickery, R. A. (1929). " Studies of the fall armyworm in the Gulf coast region of Texas." USDA Tech. Bull. **138**: 64p.
- Virla, E. G., A. Alvarez, F. Loto, L. M. Pera and M. Baigori (2008). "Fall armyworm strains (Lepidoptera: Noctuidae) in Argentina, their associate host plants and response to different mortality factors in laboratory." Florida Entomologist **91**: 63-69.

- Virla, E. G., M. V. Colomo, D. C. Berta and L. Valverde (1999). "El complejo de parasitoides del "gusano cogollero" del maíz, *Spodoptera frugiperda*, en la República Argentina (Insecta, Lepidoptera)." Neotrópica **45**: 3-12.
- Virla, E. G., G. Moya-Raygoza and J. A. Rafael (2009). "First record of *Eudorylas schreiteri* (Shannon) (Diptera: Pipunculidae) as a parasitoid of the corn leafhopper (Hemiptera: Cicadellidae) in Argentina, with a table of pipunculid-host associations in the neotropical region." Neotrop Entomol **38**(1): 898-900.
- Visôto, L. E., M. G. A. Oliveira, A. O. B. Ribon, T. R. Mares-Guia and R. N. C. Guedes (2009). "Characterization and Identification of Proteolytic Bacteria from the Gut of the *Velvetbean Caterpillar* (Lepidoptera: Noctuidae)." Environmental Entomology **38**(4): 1078-1085.
- Wahlund, T. M. and M. T. Madigan (1993). "Nitrogen fixation by the thermophilic green sulfur bacterium *Chlorobium tepidum*." J. Bacteriology **175**: 474-478.
- Wang, P. and R. R. Granados (1997a). "An intestinal mucin is the target substrate for a baculovirus enhancer." Proc. Natl. Acad. Sci. USA **94**: 6977–6982.
- Wang, P. and R. R. Granados (1997b). "Molecular cloning and sequencing of a novel invertebrate intestinal mucin cDNA." J. Biol. Chem. **272**: 16663–16669.
- Wang, P. and R. R. Granados (2001). "Molecular Structure of the Peritrophic Membrane (PM): Identification of Potential PM Target Sites for Insect Control." Archives of Insect Biochemistry and Physiology **47**: 110–118.
- Wang, R.-F., W.-W. Cao and C. E. Cerniglia (1997). "PCR detection of *Ruminococcus* spp. in human and animal faecal samples." Molecular and Cellular Probes **11**: 259–265.
- Wang, Y., H. Zhang, H. Li and X. Miao (2011). "Second-generation sequencing supply an effective way to screen RNAi targets in large scale for potential application in pest insect control." PLoS ONE **6**(4): e18644.
- Watson, S. W. (1974). Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. Baltimore, Williams and Wilkins.
- Wijffels, G., C. Eisemann, G. Riding, R. Pearson, A. Jones, P. Willadsen and R. Tellam (2001). "A novel family of chitin-binding proteins from insect type 2 peritrophic matrix." J. Biol. Chem. **276**: 15527–15536.
- Wood, O., S. Hanrahan, M. Coetzee, L. Koekemoer and B. Brooke (2010). "Cuticle thickening associated with pyrethroid resistance in the major malaria vector *Anopheles funestus*." Parasit. Vectors **3**: 1-7.
- Wren, M. W. D. (1991). Laboratory diagnosis of anaerobic infection. Anaerobes in Human Disease. B. I. Duerden and B. S. Drasar. New York, Wiley-Liss.: 180–196.
- Yang, Y., Y. C. Zhu, J. Ottea, C. Husseneder, B. R. Leonard, C. Abel and F. Huang (2010). "Molecular characterization and RNA interference of three midgut aminopeptidase N isozymes from *Bacillus thuringiensis*-susceptible and -resistant strains of

- sugarcane borer, *Diatraea saccharalis*." Insect Biochemistry and Molecular Biology **40**: 592–603.
- Yu, S. J., S. N. Nguyen and G. E. Abo-Elghar (2003). "Biochemical characteristics of insecticide resistance in the fall armyworm, *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith)." Pesticide Biochemistry and Physiology **77**: 1-11.
- Zhao, Y., W. Wang, F. Zhu, X. Wang, X. Wang and C. Lei (2017). "The gut microbiota in larvae of the housefly *Musca domestica* and their horizontal transfer through feeding." AMB Expr **7**: 147.
- Zimmermann, U., D. Mehlan and W. Peters (1975). "Investigations on the transport function and structure of peritrophic membranes of the blowfly *Calliphora erythrocephala*." Mg. Comp. Biochem. Physiol. **51B**: 181–186.

## **ANEXO**

**Tabla Suplementaria.** Análisis de todos los *contigs* que presentaron homología con el Phylum Arthropoda. Las columnas 2 a 4 muestran los resultados de la búsqueda por homología contra la base de datos proteica (nr), y las columnas 5 a 7 los resultados de la búsqueda por homología contra la base de datos nucleotídica (nt+16S+Lep). Los primeros 97 *contigs* mostraron homología con proteínas no caracterizadas (celdas coloreadas en celeste), los siguientes 65 *contigs* con proteínas caracterizadas (celdas coloreadas en verde), y los últimos 50 *contigs* con ARNr (celdas coloreadas en violeta).

<i>Contig</i>	Acceso nr	<i>Hit_nr</i>	<i>E-value</i> nr	Acceso nt	<i>Hit_nt</i>	<i>E-value</i> nt
2		No hit		gi 357626426	Danaus plexippus, whole genome	1E-176
6	gi 307185262	hypothetical protein EAG_03557 [Camponotus floridanus]	3E-15	gi 357626426	Danaus plexippus, whole genome	6E-85
13		No hit		gi 357626426	Danaus plexippus, whole genome	6E-89
19	gi 307185262	hypothetical protein EAG_03557 [Camponotus floridanus]	2E-14	gi 384080938	Papilio xuthus genes for 18S rRNA, ITS1, 5.8S rRNA, ITS2, 28S rRNA	1E-61
23		No hit		gi 357626426	Danaus plexippus, whole genome	1E-150
24		No hit		gi 357626426	Danaus plexippus, whole genome	1E-137
25	gi 403334965	hypothetical protein OXYTRI_13058 [Oxytricha trifallax]	6E-15	gi 378871187	Heliconius melpomene melpomene	9E-131
26		No hit		gi 27450407	Attacus ricini ribosomal DNA repeat unit, complete sequence	5E-83
27		No hit		gi 357626426	Danaus plexippus, whole genome	8E-127
38	gi 307185262	hypothetical protein EAG_03557 [Camponotus floridanus]	6E-16	gi 357626426	Danaus plexippus, whole genome	0.0
39	gi 403334965	hypothetical protein OXYTRI_13058 [Oxytricha trifallax]	7E-32	gi 27450407	Attacus ricini ribosomal DNA repeat unit, complete sequence	3E-142
41	gi 170048439	GLP_748_1200_211 [Culex quinquefasciatus]	1E-11	gi 378871187	Heliconius melpomene melpomene	1E-160
42	gi 307185262	hypothetical protein EAG_03557 [Camponotus floridanus]	4E-16	gi 357626426	Danaus plexippus, whole genome	0.0
45	gi 512938235	PREDICTED: uncharacterized protein LOC101742759 [Bombyx mori]	2E-13		No hit	

55		No hit		gi 384358128	Manduca sexta Contig810, whole genome	7E-72
56	gi 312381177	hypothetical protein AND_06574 [Anopheles darlingi]	1E-32		No hit	
62	gi 307185262	hypothetical protein EAG_03557 [Camponotus floridanus]	3E-13		No hit	
66	gi 403334965	GLP_748_1200_211 [Culex quinquefasciatus]	8E-15	gi 378871187	Heliconius melpomene melpomene	3E-140
75	gi 307185262	hypothetical protein EAG_03557 [Camponotus floridanus]	3E-16	gi 357626426	Danaus plexippus, whole genome	5E-119
87	gi 512935237	uncharacterized protein LOC101745012 [Bombyx mori]	5E-24		No hit	
88	gi 403334965	hypothetical protein OXYTRI_13058 [Oxytricha trifallax]	1E-24	gi 378871187	Heliconius melpomene melpomene	2E-177
95		No hit		gi 378871187	Heliconius melpomene melpomene	2E-92
97	gi 307185262	hypothetical protein EAG_03557 [Camponotus floridanus]	1E-15	gi 357626426	Danaus plexippus, whole genome	5E-93
98	gi 307185262	hypothetical protein EAG_03557 [Camponotus floridanus]	4E-16	gi 357626426	Danaus plexippus, whole genome	3E-132
99	gi 307185262	hypothetical protein EAG_03557 [Camponotus floridanus]	4E-15	gi 357626426	Danaus plexippus, whole genome	1E-93
101	gi 307185262	hypothetical protein EAG_03557 [Camponotus floridanus]	3E-15	gi 357626426	Danaus plexippus, whole genome	3E-162
103	gi 170048439	GLP_748_1200_211 [Culex quinquefasciatus]	2E-17	gi 378871187	Heliconius melpomene melpomene	7E-168
105		No hit		gi 357626426	Danaus plexippus, whole genome	3E-136
108	gi 307185262	hypothetical protein EAG_03557 [Camponotus floridanus]	4E-19	gi 357626426	Danaus plexippus, whole genome	0.0
109		No hit		gi 357626426	Danaus plexippus, whole genome	4E-105
110		No hit		gi 378871217	Heliconius melpomene melpomene	7E-144
111	gi 170048439	GLP_748_1200_211 [Culex quinquefasciatus]	2E-18	gi 357626426	Danaus plexippus, whole genome	1E-156
112	gi 307185262	hypothetical protein	4E-16	gi 357626426	Danaus plexippus, whole	3E-147

		EAG_03557 [Camponotus floridanus]			genome	
119	gi 60687936	unknown [Schistosoma japonicum]	2E-23	gi 378871187	Heliconius melpomene melpomene	0.0
127	gi 307185262	hypothetical protein EAG_03557 [Camponotus floridanus]	6E-18	gi 357626426	Danaus plexippus, whole genome	2E-143
129	gi 403334965	hypothetical protein OXYTRI_13058 [Oxytricha trifallax]	9E-24	gi 357626426	Danaus plexippus, whole genome	0.0
131	gi 307185262	hypothetical protein EAG_03557 [Camponotus floridanus]	4E-16	gi 357626426	Danaus plexippus, whole genome	2E-159
134		No hit		gi 357626426	Danaus plexippus, whole genome	2E-107
147	gi 403334965	hypothetical protein OXYTRI_13058 [Oxytricha trifallax]	6E-31	gi 357626426	Danaus plexippus, whole genome	0.0
155	gi 403334965	hypothetical protein OXYTRI_13058 [Oxytricha trifallax]	1E-24	gi 378871217	Heliconius melpomene melpomene	5E-174
156		No hit		gi 357626426	Danaus plexippus, whole genome	4E-136
158		No hit		gi 27450407	Attacus ricini ribosomal DNA repeat unit, complete sequence	3E-79
160	gi 307185262	hypothetical protein EAG_03557 [Camponotus floridanus]	3E-14	gi 357626426	Danaus plexippus, whole genome	2E-143
165		No hit		gi 357626426	Danaus plexippus, whole genome	3E-110
166	gi 307185262	hypothetical protein EAG_03557 [Camponotus floridanus]	0,0000000 4	gi 357626426	Danaus plexippus, whole genome	2E-154
167	gi 512889986	PREDICTED: uncharacterized protein LOC101738644 [Bombyx mori]	5E-12		No hit	
170	gi 403334965	hypothetical protein OXYTRI_13058 [Oxytricha trifallax]	4E-31	gi 378871187	Heliconius melpomene melpomene	7E-178
171	gi 403334965	hypothetical protein OXYTRI_13058 [Oxytricha trifallax]	1E-24	gi 357626426	Danaus plexippus, whole genome	0.0
172	gi 307185262	hypothetical protein EAG_03557 [Camponotus floridanus]	7E-16	gi 357626426	Danaus plexippus, whole genome	4E-150
173	gi 403334965	hypothetical protein OXYTRI_13058 [Oxytricha trifallax]	5E-22	gi 378871187	Heliconius melpomene melpomene	1E-150
174	gi 307185262	hypothetical protein EAG_03557	8E-17	gi 357626426	Danaus plexippus, whole genome	2E-128

		[Camponotus floridanus]				
181	gi 403334965	hypothetical protein OXYTRI_13058 [Oxytricha trifallax]	5E-32	gi 357626426	Danaus plexippus, whole genome	0.0
182		No hit		gi 357626426	Danaus plexippus, whole genome	4E-58
187	gi 307185262	hypothetical protein EAG_03557 [Camponotus floridanus]	2E-13	gi 357626426	Danaus plexippus, whole genome	0.0
190	gi 307185262	hypothetical protein EAG_03557 [Camponotus floridanus]	6E-17	gi 357626426	Danaus plexippus, whole genome	2E-149
199	gi 380030558	PREDICTED: uncharacterized protein LOC100865248 [Apis florea]	6E-51	gi 186628459	Bombyx mori DNA, contig: Bm_scaf791_contig4458 8,	0.0
202		No hit		gi 357626426	Danaus plexippus, whole genome	2E-81
211	gi 403334965	hypothetical protein OXYTRI_13058 [Oxytricha trifallax]	1E-24	gi 378871187	Heliconius melpomene melpomene	4E-165
212	gi 512938235	PREDICTED: uncharacterized protein LOC101742759 [Bombyx mori]	2E-11		No hit	
213	gi 403334965	hypothetical protein OXYTRI_13058 [Oxytricha trifallax]	2E-24	gi 357626426	Danaus plexippus, whole genome	0.0
224	gi 307185262	hypothetical protein EAG_03557 [Camponotus floridanus]	2E-15	gi 357626426	Danaus plexippus, whole genome	0.0
229		No hit		gi 357626426	Danaus plexippus, whole genome	5E-88
230	gi 170048439	GLP_748_1200_211 [Culex quinquefasciatus]	2E-18	gi 357626426	Danaus plexippus, whole genome	0.0
234	gi 307185262	hypothetical protein EAG_03557 [Camponotus floridanus]	3E-14	gi 357626426	Danaus plexippus, whole genome	5E-136
236	gi 403334965	hypothetical protein OXYTRI_13058 [Oxytricha trifallax]	6E-23	gi 357626426	Danaus plexippus, whole genome	0.0
238	gi 357624306	hypothetical protein KGM_21558 [Danaus plexippus]	2E-15	gi 291201230	60F14_SfBAC_fin, Spodoptera frugiperda BAC, egg DNA	0.0
240		No hit		gi 512938234	PREDICTED: Bombyx mori uncharacterized LOC101742759	8E-59
243	gi 328705767	hypothetical protein LOC100570593 [Acyrtosiphon pisum]	5E-18		No hit	
250		No hit		gi 357626426	Danaus plexippus, whole	8E-133



					genome	
263	gi 512935003	uncharacterized protein LOC101736424 isoform X1 [Bombyx mori]	7E-29		No hit	
268		No hit		gi 291201238	41F05_SfBAC_fin, Spodoptera frugiperda BAC, egg DNA	1E-87
269		No hit		gi 357626426	Danaus plexippus, whole genome	1E-109
270		No hit		gi 357626426	Danaus plexippus, whole genome	7E-118
271	gi 307185262	hypothetical protein EAG_03557 [Camponotus floridanus]	4E-16	gi 357626426	Danaus plexippus, whole genome	3E-131
276	gi 512921453	PREDICTED: uncharacterized protein LOC101741680 [Bombyx mori]	7E-16		No hit	
278	gi 512938235	PREDICTED: uncharacterized protein LOC101742759 [Bombyx mori]	5E-13	gi 357626426	Danaus plexippus, whole genome	4E-155
283	gi 512915356	PREDICTED: uncharacterized protein LOC101738347 [Bombyx mori]	2E-50		No hit	
300		No hit		gi 378871217	Heliconius melpomene melpomene	2E-59
305		No hit		gi 378871187	Heliconius melpomene melpomene	2E-113
308		No hit		gi 357626426	Danaus plexippus, whole genome	2E-77
309	gi 403334966	hypothetical protein OXYTRI_13059 [Oxytricha trifallax]	7E-14	gi 589913102	Corcyra cephalonica 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	3E-73
320		No hit		gi 357626426	Danaus plexippus, whole genome	4E-79
322	gi 307185262	hypothetical protein EAG_03557 [Camponotus floridanus]	1E-17	gi 357626426	Danaus plexippus, whole genome	1E-124
326	gi 403334965	hypothetical protein OXYTRI_13058 [Oxytricha trifallax]	6E-31	gi 357626426	Danaus plexippus, whole genome	0.0
327	gi 512938235	PREDICTED: uncharacterized protein LOC101742759 [Bombyx mori]	4E-13		No hit	
329		No hit		gi 357626426	Danaus plexippus, whole genome	3E-59
342	gi 512938235	PREDICTED: uncharacterized	8E-09		No hit	

		protein LOC101742759 [Bombyx mori]				
351	gi 403334965	hypothetical protein OXYTRI_13058 [Oxytricha trifallax]	7E-40	gi 357626426	Danaus plexippus, whole genome	0.0
354		No hit		gi 357626426	Danaus plexippus, whole genome	2E-112
355	gi 307185262	hypothetical protein EAG_03557 [Camponotus floridanus]	6E-18	gi 357626426	Danaus plexippus, whole genome	0.0
356	gi 307185262	hypothetical protein EAG_03557 [Camponotus floridanus]	3E-15	gi 357626426	Danaus plexippus, whole genome	1E-149
359	gi 403334965	hypothetical protein OXYTRI_13058 [Oxytricha trifallax]	4E-23	gi 357626426	Danaus plexippus, whole genome	0.0
361	gi 512938235	PREDICTED: uncharacterized protein LOC101742759 [Bombyx mori]	5E-13	gi 357626426	Danaus plexippus, whole genome	4E-150
362		No hit		gi 378871187	Heliconius melpomene melpomene	3E-75
363	gi 403334965	hypothetical protein OXYTRI_13058 [Oxytricha trifallax]	6E-09	gi 378871217	Heliconius melpomene melpomene	2E-118
373		No hit		gi 357626426	Danaus plexippus, whole genome	4E-95
406		No hit		gi 378871187	Heliconius melpomene melpomene	7E-66
9	gi 512938235	PREDICTED: uncharacterized protein LOC101742759 [Bombyx mori]	2E-12	gi 383276189	Bombyx mori mRNA, clone: fwd-02H12	2E-64
18	gi 21260593	beta-actin [Culex pipiens pallens]	4E-16	gi 341592106	Spodoptera frugiperda actin mRNA, complete cds	2E-134
28	gi 28627569	translation elongation factor 2 [Spodoptera exigua]	5E-24	gi 28627568	Spodoptera exigua translation elongation factor 2 mRNA	8E-80
30	gi 501290941	elongation factor 2 [Riptortus pedestris]	5E-13	gi 28627568	Spodoptera exigua translation elongation factor 2 mRNA	3E-63
31	gi 28627569	translation elongation factor 2 [Spodoptera exigua]	7E-12	gi 28627568	Spodoptera exigua translation elongation factor 2 mRNA	2E-111
32	gi 193690671	PREDICTED: elongation factor 2-like [Acyrtosiphon pisum];	3E-27	gi 28627568	Spodoptera exigua translation elongation factor 2 mRNA	1E-105
43	gi 506968385	actin [Coptotermes formosanus]	2E-57	gi 341592106	Spodoptera frugiperda actin mRNA, complete cds	0.0
50	gi 543888330	salivary maltase precursor, partial [Spodoptera litura]	3E-46		No hit	

65	gi 307174634	Uncharacterized protein ART2 [Camponotus floridanus]	5E-17	gi 383276189	Bombyx mori mRNA, clone: fwd-02H12	3E-101
71	gi 116833209 	cytochrome P450-like TBP [Helicoverpa armigera]	6E-09	gi 383276189	Bombyx mori mRNA, clone: fwd-02H12	2E-86
72	gi 46370384	peritrophin membrane protein 1 [Spodoptera frugiperda]	4E-37	gi 46370383	Spodoptera frugiperda peritrophin membrane protein 1 mRNA, partial	1E-124
73	gi 46370384	peritrophin membrane protein 1 [Spodoptera frugiperda]	2E-09	gi 46370383	Spodoptera frugiperda peritrophin membrane protein 1 mRNA, partial	3E-79
79	gi 148298685	fructose 1,6-bisphosphate aldolase[Bombyx mori]	1E-26	gi 116833208	Helicoverpa armigera cytochrome P450-like TBP mRNA, partial cds	8E-60
89	gi 189242281	PREDICTED: similar to CG41536 CG41536-PA [Tribolium castaneum]	6E-20	gi 383276189	Bombyx mori mRNA, clone: fwd-02H12	4E-109
90	gi 512892210	PREDICTED: proteoglycan 4-like [Bombyx mori]	3E-53		No hit	
96	gi 429508137	troponin T isoform A [Spodoptera frugiperda]	6E-46	gi 429508146	Spodoptera frugiperda troponin T isoform F (TnT) Mrna	0.0
104	gi 183979376	muscle myosin heavy chain [Papilio xuthus]	3E-32	gi 234204057	Bombyx mori myosin heavy chain gene, partial cds, alternatively Spliced	0.0
107	gi 242012026	conserved hypothetical protein [Pediculus humanus corporis]	1E-29	gi 383276189	Bombyx mori mRNA, clone: fwd-02H12	0.0
113	gi 189242281	PREDICTED: similar to CG41536 CG41536-PA [Tribolium castaneum]	0,0000000 9	gi 383276189	Bombyx mori mRNA, clone: fwd-02H12	1E-85
116	gi 389608621	cryptocephal [Papilio xuthus]	2E-18		No hit	
117	gi 41818394	chitin synthase [Spodoptera frugiperda]	6E-46	gi 41818393	Spodoptera frugiperda chitin synthase mRNA, complete cds	0.0
124	gi 512938235	PREDICTED: uncharacterized protein LOC101742759 [Bombyx mori]	4E-33	gi 383276189	Bombyx mori mRNA, clone: fwd-02H12	0.0
128	gi 46370384	peritrophin membrane protein 1 [Spodoptera frugiperda]	6E-26	gi 46370383	Spodoptera frugiperda peritrophin membrane protein 1 mRNA, partial	4E-119
132	gi 398359539	putative cuticle protein CPH45 [Antheraea yamamai]	0,0000000 1		No hit	
135	gi 512938235	PREDICTED: uncharacterized protein LOC101742759 [Bombyx mori]	4E-34	gi 383276189	Bombyx mori mRNA, clone: fwd-02H12	0.0
136	gi 226903605	myosin heavy chain variant [Bombyx mori]	2E-69	gi 229472622	Bombyx mandarina myosin heavy chain	1E-156

					mRNA, partial cds, alternatively spliced	
137	gi 403334965	hypothetical protein OXYTRI_13058 [Oxytricha trifallax]	0,00000003	gi 383276189	Bombyx mori mRNA, clone: fwd-02H12	1E-149
146	gi 512900637	PREDICTED: H(+)/Cl(-) exchange transporter 3-like [Bombyx mori]	2E-37	gi 384357795	Manduca sexta Contig1143, whole genome	2E-76
149	gi 512902724	serine/threonine-protein kinase RIO2-like [Bombyx mori]	7E-12		No hit	
152	gi 116833209	cytochrome P450-like TBP [Helicoverpa armigera]	4E-17	gi 383276189	Bombyx mori mRNA, clone: fwd-02H12	1E-100
162	gi 512938235	uncharacterized protein LOC101742759 [Bombyx mori]	5E-28	gi 383276189	Bombyx mori mRNA, clone: fwd-02H12	9E-121
169	gi 114052462	glutamate dehydrogenase [Bombyx mori]	2E-48	gi 114052461	Bombyx mori glutamate dehydrogenase (LOC692939), Mrna	5E-156
183		No hit		gi 383276189	Bombyx mori mRNA, clone: fwd-02H12	6E-67
186	gi 403334965	hypothetical protein OXYTRI_13058 [Oxytricha trifallax]	7E-18	gi 383276189	Bombyx mori mRNA, clone: fwd-02H12	1E-105
208	gi 389611255	leukotriene a-4 hydrolase [Papilio polytes]	4E-45	gi 389611254	Papilio polytes mRNA for leukotriene a-4 hydrolase, complete	1E-56
215	gi 116833209	cytochrome P450-like TBP [Helicoverpa armigera]	6E-17	gi 383276189	Bombyx mori mRNA, clone: fwd-02H12	6E-164
220	gi 357611899	laccase 1 [Danaus plexippus]	1E-40		No hit	
225	gi 512922521	PREDICTED: glutaminase kidney isoform, mitochondrial-like	6E-42	gi 291201244	78G03_SfBAC_fin, Spodoptera frugiperda BAC, egg DNA	1E-126
227	gi 512907388	2-oxoglutarate dehydrogenase, mitochondrial-like isoform X1 [B. mori]	1E-31		No hit	
232	gi 37788336	midgut class 1 aminopeptidase N [Spodoptera exigua]	1E-18	gi 291201238	41F05_SfBAC_fin, Spodoptera frugiperda BAC, egg DNA	6E-100
235	gi 512920980	PREDICTED: dynein heavy chain, cytoplasmic-like [Bombyx mori]	2E-44		No hit	
249	gi 197322814	myosin heavy chain [Bombyx mori]	3E-32	gi 197322813	Bombyx mori clone A myosin heavy chain mRNA, partial cds, alternatively	0.0
253	gi 512914193	LOW QUALITY PROTEIN: protein lava lamp-like [Bombyx mori]	5E-30		No hit	
254	gi 512935878	PREDICTED: mucin-2-like [Bombyx mori]	8E-14		No hit	

258	gi 357622077	putative Toutatis [Danaus plexippus]	3E-22		No hit	
260	gi 241153675	heat shock protein, putative [Ixodes scapularis]	1E-19	gi 301070143	Spodoptera litura heat shock protein 70 cognate (Hsc70) mRNA	0.0
264	gi 357604880	putative beta chain spectrin [Danaus plexippus]	6E-25		No hit	
265	gi 512938235	PREDICTED: uncharacterized protein LOC101742759 [Bombyx mori]	8E-28	gi 383276189	Bombyx mori mRNA, clone: fwd-02H12	0.0
266	gi 37788336	midgut class 1 aminopeptidase N [Spodoptera exigua]	3E-31	gi 291201238	41F05_SfBAC_fin, Spodoptera frugiperda BAC, egg DNA	4E-87
274	gi 385655181	neutral lipase [Helicoverpa armigera]	3E-44		No hit	
275	gi 397910056	trypsin, partial [Heliothis virescens]	9E-27		No hit	
281	gi 189242281	PREDICTED: similar to CG41536 CG41536- PA [Tribolium castaneum]	3E-29	gi 383276189	Bombyx mori mRNA, clone: fwd-02H12	9E-148
282	gi 157116712	translation initiation factor 3, subunit S9, putative [Aedes aegypti]	3E-37		No hit	
318	gi 46370384	peritrophin membrane protein 1 [Spodoptera frugiperda]	2E-85	gi 46370383	Spodoptera frugiperda peritrophin membrane protein 1 mRNA, partial	0.0
328		No hit		gi 28627568	Spodoptera exigua translation elongation factor 2 mRNA	1E-62
332	gi 357620397	alpha amylase [Danaus plexippus]	1E-32		No hit	
339	gi 512900637	PREDICTED: H(+)/Cl(-) exchange transporter 3-like [Bombyx mori]	3E-43		No hit	
345	gi 512938235	PREDICTED: uncharacterized protein LOC101742759 [Bombyx mori]	9E-14	gi 383276189	Bombyx mori mRNA, clone: fwd-02H12	8E-64
346	gi 116833209	cytochrome P450-like TBP [Helicoverpa armigera]	9E-14	gi 383276189	Bombyx mori mRNA, clone: fwd-02H12	2E-97
353	gi 116833209	cytochrome P450-like TBP [Helicoverpa armigera]	2E-14	gi 383276189	Bombyx mori mRNA, clone: fwd-02H12	2E-148
357	gi 512890376	PREDICTED: zinc finger protein 608-like [Bombyx mori]	4E-30		No hit	
360	gi 116833209	cytochrome P450-like TBP [Helicoverpa armigera]	2E-34	gi 383276189	Bombyx mori mRNA, clone: fwd-02H12	0.0
366	gi 512938235	PREDICTED: uncharacterized protein	1E-12	gi 383276189	Bombyx mori mRNA, clone: fwd-02H12	3E-50

		LOC101742759 [Bombyx mori]				
411	gi 189242281	PREDICTED: similar to CG41536 CG41536- PA [Tribolium castaneum]	8E-20	gi 383276189	Bombyx mori mRNA, clone: fwd-02H12	9E-113
417		No hit		gi 290955	HELATPASEV Heliothis virescens 17kDa H+- ATPase V-type subunit mRNA	2E-168
4	gi 307185262	hypothetical protein EAG_03557 [Camponotus floridanus]	1E-13	gi 384080938	Papilio xuthus genes for 18S rRNA, ITS1, 5.8S rRNA, ITS2, 28S rRNA	2E-57
20		No hit		gi 560190490	Bombyx mori isolate AVVMTKB1 18S ribosomal RNA gene, partial	5E-114
21	gi 403334966	hypothetical protein OXYTRI_13059 [Oxytricha trifallax]	2E-11	gi 407188116	Amsacta albistriga isolate 10 18S ribosomal RNA gene, partial	3E-111
22		No hit		gi 472403159	Comibaena delicatior clone J_728 18S ribosomal RNA gene, partial	2E-77
57		No hit		gi 363548108	Spodoptera litura 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	1E-60
67	gi 307185262	hypothetical protein EAG_03557 [Camponotus floridanus]	7E-15	gi 384080938	Papilio xuthus genes for 18S rRNA, ITS1, 5.8S rRNA, ITS2, 28S rRNA	5E-74
83	gi 328722403	PREDICTED: hypothetical protein LOC100572577 [Acyrtosiphon pisum]	9E-24	gi 21654739	Bombyx mori 28S large subunit ribosomal RNA gene, partial sequence	0.0
86		No hit		gi 300391024	Gasteruption sp. JMH- 2010 28S ribosomal RNA gene, partial sequence	4E-83
94	gi 403334965	hypothetical protein OXYTRI_13058 [Oxytricha trifallax]	6E-26	gi 21654739	Bombyx mori 28S large subunit ribosomal RNA gene, partial sequence	0.0
123		No hit		gi 297613771	Antheraea pernyi internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene	8E-87
125		No hit		gi 300391038	Parnips nigripes 28S ribosomal RNA gene, partial sequence	3E-70
126	gi 60687936	unknown [Schistosoma japonicum]	1E-22	gi 21654739	Bombyx mori 28S large subunit ribosomal RNA gene, partial sequence	7E-156
157	gi 170048439	GLP_748_1200_211 [Culex quinquefasciatus]	5E-15	gi 402170150	Mantispidae sp. NKU-006 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	7E-90
159		No hit		gi 297613771	Antheraea pernyi internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene	4E-110

161		No hit		gi 110289923	Theresimima ampellophaga partial 18S rRNA gene, specimen voucher	5E-90
164	gi 307185262	hypothetical protein EAG_03557 [Camponotus floridanus]	2E-14	gi 384080938	Papilio xuthus genes for 18S rRNA, ITS1, 5.8S rRNA, ITS2, 28S rRNA	2E-74
197	gi 321451286	hypothetical protein DAPPUDRAFT_11963 6 [Daphnia pulex]	7E-17	gi 297613771	Antheraea pernyi internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal	7E-120
201	gi 403334965	hypothetical protein OXYTRI_13058 [Oxytricha trifallax]	2E-21	gi 297613771	Antheraea pernyi internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene	7,00E-120
203		No hit		gi 300391038	Parnips nigripes 28S ribosomal RNA gene, partial sequence	1E-83
210	gi 403334965	hypothetical protein OXYTRI_13058 [Oxytricha trifallax]	1E-12	gi 297613771	Antheraea pernyi internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal ARN gene	3E-124
214	gi 512938235	PREDICTED: uncharacterized protein LOC101742759 [Bombyx mori]	2E-15	gi 384080938	Papilio xuthus genes for 18S rRNA, ITS1, 5.8S rRNA, ITS2, 28S	2E-137
217	gi 241998968	secreted protein [Ixodes scapularis]	0,00000009	gi 472403247	Lepidoptera sp. 02 JHY-2013 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	0.0
222		No hit		gi 472403247	Lepidoptera sp. 02 JHY-2013 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	0.0
226		No hit		gi 334086768	Ceroplastes ceriferus 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	1E-72
241		No hit		gi 260066198	Spodoptera frugiperda cell-line Sf9 18S ribosomal RNA gene	0.0
242	gi 403334965	hypothetical protein OXYTRI_13058 [Oxytricha trifallax]	4E-20	gi 163962980	Spodoptera frugiperda 28S ribosomal RNA gene, partial sequence	0.0
248	gi 170048439	GLP_748_1200_211 [Culex quinquefasciatus]	2E-18	gi 300391038	Parnips nigripes 28S ribosomal RNA gene, partial sequence	3E-115
251	gi 170048439	GLP_748_1200_211 [Culex quinquefasciatus]	4E-15	gi 21654739	Bombyx mori 28S large subunit ribosomal RNA gene, partial sequence	1E-136
255	gi 60687936	unknown [Schistosoma japonicum]	5E-19	gi 384080938	Papilio xuthus genes for 18S rRNA, ITS1, 5.8S rRNA, ITS2, 28S rRNA	7E-127
262	gi 403334966	hypothetical protein OXYTRI_13059 [Oxytricha trifallax]	1E-14	gi 472403196	Plutella xylostella clone J_080 18S ribosomal RNA gene, partial	0.0
313	gi 242009491	conserved hypothetical protein [Pediculus humanus corporis]	4E-13	gi 18766078	Hyles lineata 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	0.0
314		No hit		gi 156073244	Helicoverpa assulta 18S ribosomal RNA gene,	2E-128



					complete sequence	
330	gi 403334965	hypothetical protein OXYTRI_13058 [Oxytricha trifallax]	6E-34	gi 18765999	Hemileuca sp. L6 isolate L6 28S ribosomal RNA gene, partial sequence	0.0
337		No hit		gi 384080938	Papilio xuthus genes for 18S rRNA, ITS1, 5.8S rRNA, ITS2, 28S rRNA	2E-71
338	gi 170048439	GLP_748_1200_211 [Culex quinquefasciatus]	2E-14	gi 402170150	Mantispidae sp. NKU-006 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	3E-89
347	gi 403334965	hypothetical protein OXYTRI_13058 [Oxytricha trifallax]	4E-26	gi 384080938	Papilio xuthus genes for 18S rRNA, ITS1, 5.8S rRNA, ITS2, 28S rRNA	0.0
348		No hit		gi 299819551	Deoptilia heptadeta isolate G97AK 18S ribosomal RNA gene, partial	1E-72
352	gi 403334965	hypothetical protein OXYTRI_13058 [Oxytricha trifallax]	1E-22	gi 384080938	Papilio xuthus genes for 18S rRNA, ITS1, 5.8S rRNA, ITS2, 28S	4E-87
364	gi 60687936	unknown [Schistosoma japonicum]	4E-23	gi 384080938	Papilio xuthus genes for 18S rRNA, ITS1, 5.8S rRNA, ITS2, 28S rRNA	2E-131
365	gi 403334965	hypothetical protein OXYTRI_13058 [Oxytricha trifallax]	2E-29	gi 297613771	Antheraea pernyi internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal	5E-123
367	gi 358399225	hypothetical protein TRIATDRAFT_255346 [Trichoderma atroviride]	7E-09	gi 451039901	Conogethes punctiferalis 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	2E-121
375	gi 321451878	hypothetical protein DAPPUDRAFT_67127 [Daphnia pulex]	2E-25	gi 560190490	Bombyx mori isolate AVVMTKB1 18S ribosomal RNA gene, partial	0.0
376		No hit		gi 472403196	Plutella xylostella clone J_080 18S ribosomal RNA gene, partial	3E-57
385		No hit		gi 260064853	Calesia nigriventris voucher BMNH:671536 28S ribosomal RNA gene,	9E-152
390	gi 488225368	hypothetical protein, partial [Streptococcus mutans]	8E-09	gi 402170150	Mantispidae sp. NKU-006 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	1E-53
393		No hit		gi 442797145	Spodoptera litura isolate TTP1 28S ribosomal RNA gene	0.0
415	gi 307185262	hypothetical protein EAG_03557 [Camponotus floridanus]	3E-15	gi 384080938	Papilio xuthus genes for 18S rRNA, ITS1, 5.8S rRNA, ITS2, 28S rRNA	2E-60
416		No hit		gi 449326038	Lymantria dispar 18S ribosomal RNA gene, complete sequence	4E-58
418	gi 189242281	PREDICTED: similar to CG41536 CG41536- PA [Tribolium castaneum]	1E-13	gi 425869737	Nannochorista sp. BMW- 2012 28S ribosomal RNA gene, partial sequence	2E-54
419	gi 403334965	hypothetical protein	6E-10	gi 386696170	Brachychthoniidae gen.	3E-52



		OXYTRI_13058 [Oxytricha trifallax]			sp. 3 AD1301 28S ribosomal RNA gene, partial	
--	--	---------------------------------------	--	--	--	--