

Orius laevigatus (Fieber) (Hemiptera: Anthocoridae) microbial community and its involvement in non-prey feeding tolerance.

Caracterización simbiogenética de *Orius laevigatus* (Fieber) (Hemiptera: Anthocoridae) y sus implicaciones en la tolerancia a la alimentación sin presa.

J.E. Mendoza^{*1}, V. Balanza¹, X. Chen², M. D. Hitchings², P. D. Facey², R. del Sol², P. Bielza¹

¹Departamento de Producción Vegetal, Escuela Técnica Superior de Ingeniería Agronómica, Universidad Politécnica de Cartagena (UPCT), Paseo Alfonso XIII, 48, 30203, Cartagena, Spain.

²Institute of Life Science, College of Medicine, Swansea University, SA2 8PP-Swansea, United Kingdom.

Abstract

Orius laevigatus ability to survive under prey-scarce conditions is a key for its long-term settlement in the crop. However, other *Orius* species show a greater tolerance when they are fed on pollen, such as *O. majusculus* and *O. pallidicornis*. Considering an insect microbiome as a crucial aspect of its ecology, some culturable bacteria from various *O. laevigatus* Mediterranean populations and other *Orius* species were isolated on a nutrient-rich medium and sequenced. Two different types of colony were isolated in almost every *O. laevigatus* sample: a small pale colony, identified *in silico* as a Microbacteriaceae; and a large one, white-coloured, related to *Serratia*. Instead, the isolates for other *Orius* species were totally different. A high presence of carbohydrate metabolism-related bacteria in *O. pallidicornis*, as is the case of *Acinetobacter* or *Corynebacterium*, should also be noted. This study will serve to optimize *O. laevigatus* capability to settle in the agrosystem and so improving its efficiency as a biological control agent.

Keywords: pollen; endosymbionts; sequencing; enhanced natural enemies.

Resumen

La capacidad de *Orius laevigatus* para sobrevivir en situaciones de escasez de presas es clave para su establecimiento en el cultivo. Sin embargo, existen especies con una tolerancia más alta a la alimentación a base de polen, como *O. majusculus* y sobre todo *O. pallidicornis*. Además, al constituir la microbiota de un insecto un aspecto fundamental de su ecología, se decidió aislar en medio rico las bacterias cultivables del microbioma de diez poblaciones mediterráneas de *O. laevigatus*, así como las de estas otras especies de *Orius*, secuenciando a continuación su genoma. Prácticamente en todas las poblaciones de *O. laevigatus* se observaron dos tipos de colonias: unas de pequeño tamaño, identificadas *in silico* como una Microbacteriaceae; y otras más grandes, próximas a *Serratia*. En cambio, las bacterias aisladas para las otras dos especies de *Orius* fueron muy diferentes. Cabe destacar la presencia en *O. pallidicornis* de dos colonias identificadas como dos bacterias implicadas en el metabolismo de carbohidratos: *Acinetobacter* y *Corynebacterium*. Este estudio servirá de base para optimizar la capacidad de *O. laevigatus* para establecerse en el cultivo a largo plazo, incrementando su eficacia como agente de control biológico.

Palabras clave: polen; endosimbiontes; secuenciación; mejora de enemigos naturales.

* E-mail: enrique.menriv@gmail.com

1. INTRODUCCIÓN

Normalmente, los agricultores manejan sus cultivos con la intención de conseguir una producción eficiente, sin prestar mucha atención a las necesidades de los insectos que atacan a las plagas. Sin embargo, es muy frecuente que los cultivos constituyan ambientes desfavorables para algunos enemigos naturales, como es el caso de *Orius laevigatus* (Fieber) (Hemiptera: Anthocoridae). Este depredador, muy común en la cuenca Mediterránea y el norte de Europa [1], presenta una gran eficacia en el control de *Frankliniella occidentalis* (Pergande) (Thysanoptera: Thripidae) [2], pero su fecundidad se reduce drásticamente cuando se realiza una liberación temprana en el invernadero, a pesar de su capacidad para sobrevivir alimentándose del polen de las flores del cultivo [3]. Por lo tanto, mejorar la fecundidad del insecto en estas condiciones permitiría su liberación en el cultivo en una fase en la que la plaga aún no se haya extendido.

Para ello, este artículo ahonda en el hecho de que hay otras especies de *Orius* con mayor tolerancia al polen, como *O. majusculus* (Reuter) y sobre todo *O. pallidicornis* (Reuter), que basa su dieta en el polen de *Ecballium elaterium* (L.) (Richard) (Cucurbitales: Cucurbitaceae) [4-5]. Además, al existir una clara relación entre la dieta de un insecto y la flora que alberga su sistema digestivo [6-7], el objeto de este estudio consistió en caracterizar simbiogenéticamente una serie de poblaciones mediterráneas de *O. laevigatus*, *O. pallidicornis* y *O. majusculus* mediante el aislamiento y la secuenciación de las bacterias cultivables, con el fin de hallar algún patrón que nos permita dilucidar las implicaciones del microbioma en el éxito de la tolerancia al polen.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Recolección de las poblaciones de *Orius*.

El material biológico para este estudio se obtuvo de la cría artificial de insectos a partir de poblaciones silvestres recolectadas en distintas áreas de clima mediterráneo. El mantenimiento y la multiplicación, a 26 °C y con fotoperiodo 16:8 (L:O), se realizaron en la Finca Experimental Tomás Ferro de La Palma (Cartagena, Murcia). Para *O. laevigatus*, se estudiaron las poblaciones Samaria (Grecia), Cazorla (Jaén), Hellín (Albacete), Policoro y Acate (ambas en Italia), Portonovo (Pontevedra), Cabrils (Barcelona), Cabo de Gata (Almería), Carmona (Sevilla) y Ruidera (Ciudad Real); la población de *O. pallidicornis* se recolectó en Cartagena, y la de *O. majusculus* fue cedida por el Institut de Recerca i Tecnologia Agroalimentàries (IRTA) de Cabrils (Barcelona).

2.2 Aislamiento, secuenciación e identificación *in silico* de las bacterias cultivables.

Cinco adultos de cada población se congelaron a -20 °C y se enviaron al Institute of Life Science de la Swansea University (Reino Unido), donde se esterilizaron externamente mediante un protocolo ya publicado [8], se trituraron y homogeneizaron en tampón 1xTE, se realizaron diluciones seriadas y se sembraron en agar nutritivo, incubando a 30 °C durante toda la noche. Los distintos tipos de colonias se aislaron según su morfología en caldo nutritivo, extrayendo a continuación el ADN bacteriano mediante el QIAmp Mini Kit (Qiagen®) para su secuenciación mediante la tecnología Illumina®. Las secuencias obtenidas se procesaron para eliminar los fragmentos de baja calidad (http://hannonlab.cshl.edu/fastx_toolkit/) y se ensamblaron, usando Velvet [9], en borradores genómicos. Finalmente, éstos fueron anotados en la plataforma online RAST [10] y comparados con la base de datos de secuencias de referencia de AmphoraVisu [11] y del propio RAST (SEED), las cuales devuelven el filotipo más probable para cada secuencia.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Como puede observarse en la Tabla 1, en nueve de las diez poblaciones ensayadas de *Orius laevigatus* se consiguió aislar una colonia grande y blanquecina que se identificó en AmphoraVisu como una bacteria próxima al género *Serratia*, según ambas bases de datos. Esta bacteria aparece también en *O. majusculus* y *O. pallidicornis*. Se trata de una enterobacteria tan común en los insectos que su especie más representativa es *S. entomophila*, que en 1978 [12] se consiguió aislar en más de 30 especies. Por otro lado, en siete de las diez poblaciones de *O. laevigatus* se aisló con éxito una colonia más pequeña y de un color pálido, identificada como una microbacteriácea cercana a *Microbacterium testaceum* o *Clavibacter michiganensis*, y que no se observó en ninguna

muestra de las demás especies de *Orius*. Es importante resaltar también que en la población de Portonovo se aisló *Erwinia*, una bacteria representativa de *F. occidentalis* [8].

De entre las colonias aisladas en las muestras de *O. majusculus* y *O. pallidicornis*, destacan en esta última dos bacterias implicadas en distintas etapas de la degradación de carbohidratos, principales componentes del polen del que se alimenta este insecto de forma exclusiva. Una de ellas, identificada como *Acinetobacter* y que da lugar a colonias verdosas de forma irregular y de consistencia cremosa, fue la principal bacteria aislada en el néctar y el polen de numerosas plantas silvestres del sur de la Península Ibérica [13]; la otra, *Corynebacterium*, forma colonias más pequeñas, grisáceas y de aspecto granuloso, y es capaz de sintetizar aminoácidos a partir de glucosa, fructosa y sacarosa [14]. Ninguna de ellas se observó en *O. majusculus* ni *O. laevigatus*.

4. CONCLUSIONES

A la luz de los resultados obtenidos en este estudio, y sin dejar de resaltar la intención de seguir profundizando en el estudio de las comunidades que componen la flora de estos insectos (no sólo las bacterias cultivables), se confirma una vez más la estrecha relación interespecífica existente entre microbioma y hospedador. Asimismo, nuevos estudios encaminados a dilucidar los mecanismos que permiten la transferencia vertical y horizontal de simbiontes sentarían las bases para su aplicación en la mejora de la tolerancia de *Orius laevigatus* a la alimentación a base de polen, incrementando la eficacia de este enemigo natural en situaciones de escasez de presas.

5. AGRADECIMIENTOS

Los autores desean agradecer a la UPCT la concesión de una beca de movilidad al autor principal de esta investigación, sin la cual ésta no habría sido posible; a E. Martínez-Díaz, por su inestimable ayuda técnica; y al IRTA, por su generosidad en la cesión de poblaciones de insectos.

6. REFERENCIAS

- [1] Péricart, J. (1972). Hémiptères. Anthocoridae, Cimicidae et Microphysidae de l'Ouest- Paléartique. Masson et Cie. 402 pp.
- [2] Chambers, R. J., Long, S., Helyer, N. L. (1993). Effectiveness of *Orius laevigatus* (Hemiptera: Anthocoridae) for the control of *Frankliniella occidentalis* on cucumber and pepper in the U.K. Biocontrol Sci. Techn. 3: 295-307.
- [3] Cocuzza, G. E., De Clercq, P., Lizzio, S., Van de Veire, M., Tirry, L., Degheele, D., Vacante, V. (1996). Reproduction of *Orius laevigatus* and *Orius albidipennis* on pollen and *Ephesia kuehniella* eggs. Entomol. Exp. Appl. 82: 101-104.
- [4] Pumariño, L., Alomar, O. (2012). The role of omnivory in the conservation of predators: *Orius majusculus* (Heteroptera: Anthocoridae) on sweet alyssum. Biolog. Control 62: 24-28.
- [5] Carayon, J., Steffan, J. R. (1959). Observations sur le régime alimentaire des *Orius* et particulièrement d'*Orius pallidicornis* (Reuter) (Heteroptera: Anthocoridae). Cah. Nat. 15: 53-63.
- [6] Dillon, R. J., Dillon, V. M. (2004). The gut bacteria of insects: nonpathogenic interactions. Ann. Rev. Entomol. 49: 71-92.
- [7] Douglas, A. E. (2009). The microbial dimension in insect nutritional ecology. Funct. Ecol. 23: 38-47.
- [8] de Vries, E. J., Breeuwer, J. A., Jacobs, G., Mollema, C. (2001). The association of Western flower thrips, *Frankliniella occidentalis*, with a near *Erwinia* species gut bacteria: transient or permanent? J. Invertebr. Pathol. 77: 120-128.
- [9] Zerbino, D. R., Birney, E. (2008). Velvet: algorithms for *de novo* short read assembly using de Bruijn graphs. Genome Res. 18: 821-829.
- [10] Overbeek, R., Olson, R., Pusch, G. D., Olsen, G. J., Davis, J. J., Disz, T., Edwards, R. A., Gerdes, S., Parrello, B., Shukla, M., Vonstein, V., Wattam, A. R., Xia, F., Stevens, R. (2014). The SEED and the Rapid Annotation of microbial genomes using Subsystems Technology (RAST). Nucleic Acids Res, 42: 206-214.
- [11] Kerepesi, C., Bánky, D., Grolmusz, V. (2014). Amphora Net: The webserver implementation of the AMPHORA2 metagenomic workflow suite. Gene 533 (2): 538-540.
- [12] Grimont, P. A. D., Grimont, F. (1978). The genus *Serratia*. Annu. Rev. Microbiol. 32: 221-248.
- [13] Álvarez-Pérez S., Herrera C. M. (2013). Composition, richness and nonrandom assembly of culturable bacterial-microfungal communities in floral nectar of Mediterranean plants. FEMS Microbiol. Ecol. 83: 685-699.
- [14] Georgi, T., Rittmann, D., Wendisch, V.F. (2005). Lysine and glutamate production by *Corynebacterium glutamicum* on glucose, fructose and sucrose: roles of malic enzyme and fructose-1,6-bisphosphatase. Metab. Eng. 7(4): 291-301.

Tabla 1. Colonias aisladas para las distintas muestras de *Orius* y resultado de su identificación *in silico* en AmphoraVisu y en RAST (el porcentaje y el score mostrados indican, respectivamente, la probabilidad del filotipo asignado y la semejanza con la secuencia de referencia más próxima).

Población	Morfología de la colonia	AmphoraVisu	RAST (secuencia de referencia)
<i>O. majusculus</i>	grande y pálida	Género <i>Pseudomonas</i> (96,8%)	<i>Pseudomonas fluorescens</i> A506 (Score: 537)
	grande y blanca	Familia Enterobacteriaceae (58,1%)	<i>Serratia marcescens</i> Db11 (Score: 544)
<i>O. pallidicornis</i>	grande y verdosa	Género <i>Acinetobacter</i> (68,8%)	<i>Acinetobacter</i> sp. SH024 (Score: 523)
	grande y pálida	Familia Enterobacteriaceae (58,1%)	<i>Serratia marcescens</i> Db11 (Score: 544)
	pequeña y grisácea	<i>Corynebacterium variabile</i> (74,2%)	<i>Corynebacterium variabile</i> DSM 44702 (Score: 507)
	grande y amarillenta	Género <i>Staphylococcus</i> (35%)	<i>Macrocococcus caseolyticus</i> JCS5402 (Score: 516)
<i>O. laevigatus</i> Samaria	grande y blanca	Género <i>Serratia</i> (32,3%)	<i>Serratia marcescens</i> Db11 (Score: 544)
	pequeña y pálida	<i>Microbacterium testaceum</i> (33,9%)	<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i> NCPPB 382 (Score: 543)
<i>O. laevigatus</i> Cazorla	grande y blanca	Familia Enterobacteriaceae (61,3%)	<i>Serratia marcescens</i> Db11 (Score: 538)
<i>O. laevigatus</i> Hellín	grande y blanca	Familia Enterobacteriaceae (61,3%)	<i>Serratia marcescens</i> Db11 (Score: 538)
	pequeña y pálida	Familia Microbacteriaceae (58,1%)	<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i> NCPPB 382 (Score: 538)
<i>O. laevigatus</i> Policoro	grande y blanca	Género <i>Serratia</i> (37,1%)	<i>Serratia marcescens</i> Db11 (Score: 538)
	pequeña y pálida	<i>Microbacterium testaceum</i> (36,2%)	<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i> NCPPB 382 (Score: 543)
<i>O. laevigatus</i> Acate	grande y blanca	Enterobacteriaceae Family (61,3%)	<i>Serratia marcescens</i> Db11 (Score: 538)
	pequeña y pálida	Microbacteriaceae Family (54,8%)	<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i> NCPPB 382 (Score: 543)
<i>O. laevigatus</i> Portonovo	grande y blanca	<i>Serratia</i> Genus (37,1%)	<i>Serratia marcescens</i> Db11 (Score: 538)
	pequeña y blanca	Enterobacteriaceae Family (74,2%)	<i>Erwinia tasmaniensis</i> Et1/99 (Score: 518)
<i>O. laevigatus</i> Cabrils	pequeña y pálida	Familia Microbacteriaceae (35,4%)	<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i> NCPPB 382 (Score: 394)
<i>O. laevigatus</i> Carmona	grande y blanca	Enterobacteriaceae Family (61,3%)	<i>Serratia marcescens</i> Db11 (Score: 538)
<i>O. laevigatus</i> Cabo de Gata	grande y blanca	Enterobacteriaceae Family (61,3%)	<i>Serratia marcescens</i> Db11 (Score: 538)
	pequeña y pálida	Familia Microbacteriaceae (56,3%)	<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i> NCPPB 382 (Score: 543)
<i>O. laevigatus</i> Ruidera	grande y blanca	Enterobacteriaceae Family (61,3%)	<i>Serratia marcescens</i> Db11 (Score: 538)
	pequeña y pálida	Familia Microbacteriaceae (58,1%)	<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i> NCPPB 382 (Score: 543)