

ANÁLISIS PROTEOMICO DIFERENCIAL DE LA INFECCIÓN EN LARVAS CON EL BACULOVIRUS SFNPV DE *SPODOPTERA FRUGIPERDA* (LEPIDÓPTERA: NOCTUIDAE)

Flores Gallardo, Francisco Javier (1); Zanella Sáenz, Ingrid (2); Del Rincón Castro, Ma. Cristina (3)

1 [Licenciatura de Ingeniería en Biotecnología, Universidad de Guanajuato] | [javi_96_5@hotmail.com]

2 [Posgrado en Biociencias, División de Ciencias de la Vida, Campus Irapuato-Salamanca, Universidad de Guanajuato] | [ingridzasa@hotmail.com]

3 [Departamento de Alimentos, Posgrado en Bioceánicas, División de Ciencias de la Vida, Campus Irapuato-Salamanca, Universidad de Guanajuato] | [mdelrinc@yahoo.com]

Resumen

El maíz es un cultivo esencial tanto en la dieta como en la cultura mexicana, y no está exento de la aparición de plagas, siendo el gusano cogollero del maíz (*Spodoptera frugiperda*), una de las plagas más importantes. El control de esta plaga se lleva a cabo mayoritariamente, mediante el uso de insecticidas químicos. Una alternativa viable al uso de estos insecticidas es el uso de agentes entomopatógenos como los baculovirus. En este trabajo se presentan los resultados del análisis del perfil de las proteínas extraídas de larvas de *Spodoptera frugiperda* a diferentes tiempos posinfección (p.i), tanto de larvas control sin infectar, como de larvas infectadas con el baculovirus SfNPV. Se analizaron proteínas a las 24, 48 y 72 horas p.i. observándose que, desde las 24 h p.i., se había una represión en la expresión de las proteínas del insecto huésped, siendo esto más visible conforme el tiempo de infección avanzaba hacia las 72 h p.i. Este trabajo sienta las bases para un estudio más completo de la expresión diferencial de las proteínas inducidas o reprimidas en un insecto huésped cuando un baculovirus lo infecta.

Abstract

Maize is an essential crop both in the diet and in the Mexican culture, and is not exempt of the appearance of pests, being the cornworm (*Spodoptera frugiperda*), one of the most important pests. The control of this pest is carried out mainly, through the use of chemical insecticides. A viable alternative to the use of these insecticides is the use of entomopathogenic agents such as baculoviruses. This work presents the results of the analysis of the profile of the proteins extracted from *Spodoptera frugiperda* larvae at different postinfection times, (p.i), both uninfected control larvae and larvae infected with the baculovirus SfNPV. Proteins were analyzed at 24, 48 and 72 hours p.i. It was observed that, from 24 h p.i., there was a repression in the expression of the proteins of the host insect, this being more visible as the infection time advanced by 72 h p.i. This work lays for a more complete study of differential expression of proteins induced or repressed in a host insect when a baculovirus infects it.

Palabras Clave

Maíz; *Spodoptera frugiperda*; Control biológico; Baculovirus; Proteínas

INTRODUCCIÓN

El maíz (*Zea mays* L.) es el cultivo agrícola más importante de México. A nivel mundial, ocupa el segundo lugar después del trigo y del arroz, con una producción de 991.92 millones de toneladas métricas [1]. El gusano cogollero (*Spodoptera frugiperda*) (Lepidóptera: Noctuidae) (Smith, 1797), es considerada una de las plagas más importantes del maíz, es endémico del hemisferio occidental y se distribuye desde el sureste de Canadá hasta Chile y Argentina, incluyendo todas las islas del Caribe [2]. En diversas entidades de México se han registrado pérdidas causadas por este insecto que van de 13 hasta 60%. Los daños más serios corresponden a las regiones tropicales y subtropicales [3].

El uso excesivo de plaguicidas provoca efectos negativos en el suelo, el agua y el ambiente. Además, ha contribuido a aumentar los problemas de plagas debido al desarrollo de resistencia y a la destrucción de los enemigos naturales, además de que muchos plaguicidas también afectan la salud de las personas. Para reducir estos efectos se procura la implementación de sistemas agrícolas sostenibles. Una de las alternativas es el uso de organismos entomopatógenos, los cuales tienen la capacidad de reducir las poblaciones de plagas. Existen varios tipos de organismos entomopatógenos, tales como virus, hongos, bacterias, protozoarios y nematodos [4].

El control biológico, es un arma de gran utilidad en los programas de manejo integrado con el fin de minimizar el desequilibrio biológico en un ecosistema [5]. Dentro del grupo de entomopatógenos se encuentran los baculovirus, los cuales son específicos de invertebrados y han sido desarrollados como bioinsecticidas para el control de insectos plaga, particularmente de especies del orden Lepidóptera. Estos virus contienen DNA de doble cadena, circular y covalentemente encerrado dentro de nucleocápsides. Los viriones tienen forma de bastón, bacilar o de varilla y están incluidos en cuerpos de oclusión (COs). La familia Baculoviridae está compuesta por dos géneros: los Nucleopolidovirus (NPVs) y los Granulovirus (GVs) [6].

La infección por baculovirus inicia cuando los insectos ingieren COs y estos al enfrentarse a las condiciones alcalinas del intestino medio son disueltos y se liberan los viriones, los cuales infectan a las células epiteliales del intestino medio para iniciar el primer ciclo de replicación o infección primaria. Alternativamente, algunas nucleocápsides atraviesan el citoplasma y, sin pasar por el núcleo, se dirigen a la zona basal. Las nucleocápsides atraviesan la membrana celular formando los viriones brotados (BVs) y pasan a la cavidad hemocélica a través de las traqueolas evitando la membrana basal. Estos viriones utilizan el sistema respiratorio de tráqueas como una red de caminos para dispersarse en el resto del insecto y con esto logra una infección sistémica [7]. No obstante, existen muy pocos trabajos relacionados con la identificación a nivel proteómico de las diferentes proteínas que son inducidas o reprimidas en los insectos susceptibles a la infección por baculovirus.

El presente trabajo tuvo como objetivo identificar la expresión diferencial de proteínas a diferentes tiempos posinfección (p.i), en larvas infectadas con el baculovirus SfNPV de *S. frugiperda* y de esta forma contribuir al conocimiento sobre la virulencia de los baculovirus en su insecto hospedero.

MATERIALES Y MÉTODOS

- *Cepa*

La cepa SfNPV-An2 de baculovirus con la que se trabajó en el presente estudio fue aislada de suelos agrícolas y fue previamente caracterizada biológica y molecularmente [5].

- *Mantenimiento de la colonia*

Se realizó el mantenimiento de la colonia *S. frugiperda* en dieta semi artificial [8] y bajo condiciones de insectario; los adultos fueron alimentados con una solución de agua destilada con miel de maíz al 10% y una vez que ovipostian y los huevecillos eclosionan, las larvas fueron puestos en dieta semi artificial en cajas Petri, las cuales contenían dieta artificial para *S. frugiperda* (agua destilada 1000 mL; agar bacteriológico 12,5 g; maíz 120 g; levadura 50 g; germen de trigo 5 g; espiga de maíz molida 25 g; ácido sórbico 2,5 g; ácido ascórbico 5 g; metilparaben (MPB) 3,125 g;

mezcla de sales 8,75 g; frijol soya 62,5 g; formaldehído 37% 3,125mL; antibiótico 0,75 mg; y mezcla de vitaminas 18,75 g. Las larvas se mantenían en estas cajas hasta llegar al 2° estadio, debido a los hábitos canibalísticos que presenta *S. frugiperda*, posteriormente las larvas fueron colocadas en vasos individuales con dieta hasta que puparon.

- *Amplificación del stock viral, recuperación y conteo de cuerpos de oclusión*

La amplificación del stock viral se realizó en cajas Petri, las cuales fueron inoculadas con 200 μ L de una solución de CO a una concentración de 2.5×10^8 CO/ml y se colocaron de 15 a 17 larvas de 2° estadio tardío por caja, las que fueron incubadas por 5 días. Las larvas se recabaron y se procesaron en un mortero de porcelana estéril, con agua destilada estéril (ADE). La molienda se filtró con una doble malla de organza, el filtrado se lavó repetidas ocasiones con SDS al 0.5% con centrifugaciones a 13000 rpm y 4 °C durante 15 minutos (Centrifuga Hermle, Z326k). La pastilla obtenida se resuspendió en ADE, para almacenar las muestras a 4 °C. Una vez obtenido el stock viral se procedió a realizar el conteo de los CO y así obtener la concentración de los mismos utilizando un hematocitómetro.

- *Infección per os de S. frugiperda*

Para la infección *per os* se mezcló una solución de CO (9.925×10^9 CO/mL) con una solución de sacarosa al 10% en una relación 2:1 respectivamente, adicionando un colorante vegetal para detectar la ingesta del inóculo [9]; se individualizaron larvas de 2° estadio y permanecieron en un periodo de ayuno durante 16 horas, posteriormente fueron alimentadas con aproximadamente 2 μ L de la solución de CO previamente descrita. Otra población de larvas fue alimentada con una solución de sacarosa sin inóculo viral como control negativo.

- *Extracción de proteínas a partir de hemocitos*

Para la extracción de hemolinfa [9] de larvas a las 24, 48 y 72 horas infectadas con baculovirus y sin infectar, se procedió a cortar las propatas traseras y presionar el cuerpo de la larva de forma que esta saliera y fue colocada en tubos eppendorf con 500

μ L de un agente antioxidante (glutación 6 mg/mL). Posterior a esto se centrifugó la muestra a 13000 rpm por 15 min, se desechó el sobrenadante y se almacenó la pastilla de hemocitos a -70 °C hasta su uso. La pastilla se resuspendió en aproximadamente 50 a 100 μ L de buffer de lisis (8 M urea, 2 M tiourea, 0.5% CHAPS, 1 mM DDT, 1 mM PMSF) y se mezcló en un vórtex de 10 a 20 segundos cada 10 minutos durante 30 minutos, en los intervalos se mantenía en hielo y al finalizar se centrifugó a 13000 rpm durante treinta minutos y se recuperó el sobrenadante.

- *Cuantificación de proteínas.*

La cuantificación se llevó a cabo por el método Bradford en placas de micro titulación, siguiendo lo descrito por el proveedor. Se tomaron 10 μ L de muestra y se colocaron de forma separada en cada pozo por triplicado, se le agregaron 200 μ L de reactivo de Bradford para posteriormente medir el nivel de absorbancia a 595 nm en un espectrofotómetro para microplacas (xMark BioRad).

- *Perfil de proteínas mediante geles de poliacrilamida en SDS-PAGE.*

Para la electroforesis SDS-PAGE se elaboró un gel discontinuo de poliacrilamida (12%) en una cámara vertical de electroforesis (Mini-Protean Tetra Cell de BioRad). 20 μ g de las proteínas previamente extraídas y cuantificadas fueron mezcladas con solución de Laemmli (Tris 0.5 M, SDS al 20%, glicerol, β -mercaptoetanol, azul de bromofenol 0.02%) y puestas a ebullición por 4 minutos [10]. Una vez desnaturalizadas, las muestras fueron cargadas en un gel discontinuo de poliacrilamida y sometidas a un voltaje inicial de 50 V durante 20 minutos y posteriormente a 120 V hasta que las muestras salgan del gel. Posteriormente se llevó a cabo la tinción (azul brillante de Coomassie G-250) durante 10 minutos y destinción durante toda la noche. El gel fue visualizado en un fotodocumentador (Gel DocTM EZ Imagen, BioRad). Por último, se evaluó la expresión diferencial de proteínas de las condiciones control y problema a los diferentes tiempos post-infección.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Mantenimiento de colonia *S. frugiperda*

La colonia de *S. frugiperda* se mantuvo viable durante el periodo de realización del presente proyecto, lográndose utilizar más de 1000 larvas para amplificar el inóculo viral, así como para las extracciones de hemolinfa.

- **Cuantificación de proteínas**

Las proteínas extraídas de las diferentes condiciones fueron cuantificadas (Tabla 1) para utilizar la misma cantidad en los geles SDS-PAGE.

Tabla 1. Cuantificación de proteínas a diferentes tiempos p.i.

Condición	Control -	Infectadas
24 h	2504.167 $\mu\text{g/ml}$	3459.167 $\mu\text{g/ml}$
48 h	3761.66 $\mu\text{g/ml}$	2431.66 $\mu\text{g/ml}$
72 h	4618.33 $\mu\text{g/ml}$	2695 $\mu\text{g/ml}$

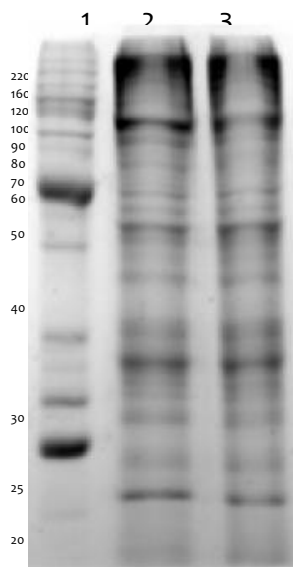


Figura 1. Perfil de proteínas a las 24 horas.
 1. MPM (Benchmark)
 2. Control 24 h
 3. SfNPV-An1 24 h

Al realizar el análisis del perfil de proteínas diferencial obtenido mediante la técnica de SDS-PAGE, se detectaron proteínas que disminuyeron o anularon su expresión y aquellas que se expresaron o incrementaron su expresión, esto derivado de la infección por SfNPV a las 24, 48 y 72 horas de la infección en larvas de *S. frugiperda*.

En la figura 1 se presenta el patrón de proteínas SDS-PAGE extraídas de larvas a las 24 horas de

la condición sin infectar (carril 2) e infectadas (carril 3). Se pudo observar en esta última condición, una disminución en la expresión de proteínas cuyos pesos moleculares fueron de aproximadamente 41 kDa, 51 kDa y 55 kDa, algo característico en las infecciones con baculovirus, ya que como lo describe Rangel Núñez y colaboradores [8], esta cepa tiene un alto potencial bioinsecticida y esto se puede reflejar en la expresión de proteínas, ocasionando una inducción o represión de las mismas, derivado de la infección por el virus. No obstante, a las 48 horas se pudieron observar que para algunas proteínas su expresión se encontraba apagada en el control y no así en la muestra con inóculo viral, tal fue el caso de las proteínas de 32, 35, 38 y 90 kDa. También se pudo observar la represión de una proteína de 60 kDa que no se encontraba en las larvas infectadas, pero si en el control, como se puede apreciar en la figura 2.

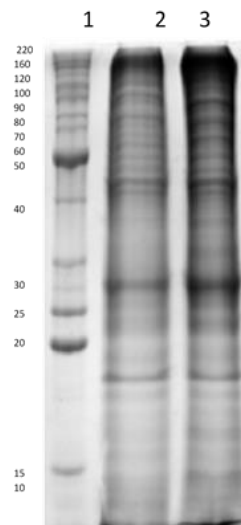


Figura 2. Perfil de proteínas a las 48 horas.
 1. MPM (Benchmark),
 2. Control 24 h-,
 3. SfNPV-An1 24 h.

En la figura 3 también se pudo observar con mayor claridad, la interacción del virus SfNPV con el insecto huésped y cómo, después de 72h p.i., se ve afectada a nivel proteómico, ya que se pudo observar que las proteínas con un tamaño de 10 y 60 kDa no estaban presentes en las larvas infectadas con el inóculo viral y si en el control (larvas sin infectar). Por otro lado, se encontró que las proteínas con un tamaño de 14, 32, 35, 38 y 90 kDa se expresaban en las larvas infectadas con inóculo viral y no en el control.

CONCLUSIONES

A partir del análisis SDS-PAGE que se realizó con las proteínas obtenidas de las larvas de *S. frugiperda* infectadas con el baculovirus SfNPV y sin infectar, se pudo concluir que la infección por baculovirus tiene un rol importante en la inducción o represión de la expresión de ciertas proteínas, por lo que este trabajo tiene como perspectivas el estudio e identificación de proteínas expresadas diferencialmente mediante geles en dos dimensiones (2-DE) y a partir de esto identificar las proteínas expresadas diferencialmente, y poder realizar la identificación de las mismas por espectrometría MS-MS.

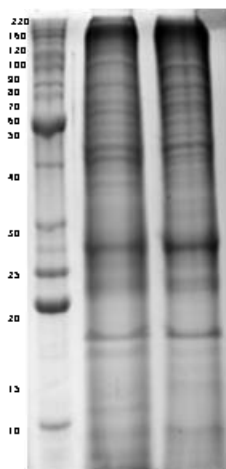


Figura 3. Perfil de proteínas a las 72 horas.
 1. MPM (Benchmark),
 2. Control 24 h-,
 3. SfNPV-An1 24 h.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a la Dirección de Apoyo a la Investigación y el Posgrado (DAIP), de la Universidad de Guanajuato, por el financiamiento del proyecto 964/2016, "Caracterización y evaluación a nivel de campo de baculovirus para la producción de maíz libre de insecticidas químicos en la región del bajo guanajuatense" y al CONACYT por el apoyo en el proyecto 166586: Estudio genómico y proteómico de baculovirus entomopatógenos del falso medidor de la col *Trichoplusia ni*, en líneas celulares de insectos.

REFERENCIAS

- [1]. USDA. 2015. United States Department of Agriculture. <http://www.usda.gov/wps/portal/usda/usdahome>. (Fecha de consulta: 20 de julio de 2017).
- [2] Casmuz, A., Juárez, M. L., Socías, M. G., Murúa, M. G., Prieto, S., Medina, S., ... & Gastaminza, G. (2010). Revisión de los hospederos del gusano cogollero del maíz, *Spodoptera frugiperda* (Lepidóptera: Noctuidae). *Revista de la Sociedad Entomológica Argentina*, 69(3-4), 209-231.
- [3] Del Rincón-Castro, M. C., Méndez-Lozano, J. y J. E. Ibarra. 2006. Caracterización de cepas nativas de *Bacillus thuringiensis* con actividad insecticida hacia el gusano cogollero del maíz *Spodoptera frugiperda* (Lepidóptera: Noctuidae). *Folia Entomológica Mexicana*, 45: 157-164.
- [4] Monzón, A. (2002). Producción, uso y control de calidad de hongos entomopatógenos en Nicaragua.
- [5] Ríos Velasco, Claudio. (2011). Identificación y caracterización de agentes de control biológico de (*Spodoptera Frugiperda*) (Je Smith) (Lepidóptera: Noctuidae).
- [6] Camarena Gutiérrez, G. (2009). Señales en la interacción planta insecto. *Revista Chapingo serie ciencias forestales y del ambiente*, 15(1), 81-85.
- [7] Engelhard, E. K., Kam-Morgan, L. N., Washburn, J. O., & Volkman, L. E. (1994). The insect tracheal system: a conduit for the systemic spread of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 91(8), 3224-3227.
- [8] Rangel Núñez, J. C., Vázquez Ramírez, M. F., & Del Rincón Castro, M. C. (2014). Caracterización biológica y molecular de cepas exóticas de *Baculovirus SfNPV*, con actividad bioinsecticida hacia una población mexicana del gusano cogollero del maíz *Spodoptera frugiperda* (Lepidóptera: Noctuidae). *Interciencia*, 39(5).
- [9] Hughes, P. R., & Wood, H. A. (1981). A synchronous peroral technique for the bioassay of insect viruses. *Journal of Invertebrate Pathology*, 37(2), 154-159.
- [10] Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *nature*, 227(5259), 680-685.