

EXPRESIÓN DIFERENCIAL DE PROTEÍNAS EN EL TEJIDO PRIMARIO DE *Spodoptera frugiperda* INFECTADA POR SFNPV-AR A LAS 48 HORAS

Orozco López, Lidia Yvonne (1), Peña Galván Mónica Lia (1), Rangel Núñez Jonatan Carmen (2), Del Rincón Castro María Cristina (2)

1 [Licenciatura en Ingeniería en Alimentos, División de Ciencias de la Vida, Campus Irapuato-Salamanca, Universidad de Guanajuato] [Dirección de correo electrónico: voney_96@hotmail.com]

2 [Posgrado en Biociencias, División de Ciencias de la Vida, Campus Irapuato-Salamanca, Universidad de Guanajuato] [Dirección de correo electrónico: jonatanc.rangel@yahoo.com.mx]

3 [Departamento de Alimentos, División de Ciencias de la Vida, Campus Irapuato-Salamanca, Universidad de Guanajuato] Dirección de correo electrónico: [cdelrincon@ugto.mx]

Resumen

El gusano cogollero *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidóptera: Noctuidae) es una de las plagas más importantes del maíz *Zea Mays* L. en México. Las alternativas al uso de control tradicional o químico son el uso de los enemigos naturales de la plaga, de entre los cuales los baculovirus son un agente con alto potencial para controlar al gusano cogollero a nivel de campo. En este trabajo se reportan los resultados del análisis diferencial de proteínas extraídas de larvas de *Spodoptera frugiperda* a las 48 horas, tanto de larvas sin infectar como de larvas infectadas con el baculovirus SfNPV-Ar. Se pudieron observar diferentes proteínas expresadas cuyos pesos moleculares fluctuaron en el orden de los 19, 32, 38 y 220 KDa a las 48 hpi exclusivamente las cuales contrastaron con las proteínas de 55 y 10 KDa que fueron encontradas exclusivamente a las 48 hsi en el carril 2 de la imagen 2. Se pudo obtener un primer acercamiento al proceso primario de infección del virus SfNPV-Ar en su insecto hospedero, y con ellos se podrían dilucidar los mecanismos moleculares por los cuáles el virus es tan eficiente en el control de *Spodoptera frugiperda*.

Abstract

The armyworm *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) is one of the most important pests of (*Zea. Mays*) L. in México. Alternatives to the use of traditional or chemical control, the use of natural enemies of pests, among which baculoviruses in an agent with high potential to control these pests at field level, is. In this paper we present the results of the analysis of proteins, extracted from larvae of *Spodoptera frugiperda* at 48 hours, both larvae and larvae infected with the baculovirus SfNPV-Ar. In the analysis, different proteins expressed in the order of 19, 32, 38 and 220 KDa at 48 hpi exclusively, contrasting with the two proteins of 55 and 10 KDa found only at 48 hsi in lane 2 of image 2. It was possible to obtain a first approach to the primary process of infection of the SfNPV-Ar virus in its host insect, and with them the molecular mechanisms by which the virus is so efficient in the control of *Spodoptera frugiperda* could be elucidated.

Palabras Clave

Maíz; Control Biológico; Baculovirus; *Spodoptera frugiperda*.

INTRODUCCIÓN

El cultivo de mayor importancia en México es el maíz, ya que ocupa una superficie sembrada de 7'372,218.19 Ha., posicionando a Sinaloa, Chiapas y Jalisco como los estados de mayor producción. Por otro lado, el estado de Guanajuato ocupa el noveno lugar con el 5,17% de la producción nacional de la cual el 80% son siembras de temporal [1].

Entre las limitantes fitosanitarias de mayor impacto asociadas al cultivo de maíz (*Zea mays* L.), se destaca *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith). Esta es una plaga que cuyo daño en los cultivos de maíz se da principalmente por la defoliación que causa en la planta y el daño al cogollo (parte en donde causa el mayor daño), tradicionalmente el control de esta plaga se basa en el uso de agentes químicos cuyo abuso ha causado el surgimiento de fenotipos resistentes a estos, lo que ha provocado que los productores se vean en la necesidad de hacer varias aplicaciones de insecticidas en un mismo ciclo agrícola. Resultado de estos factores, han ocasionado una gran cantidad de pérdidas en cultivos de maíz que van desde un 10 hasta un 100%. [2]

Esta situación propicia la búsqueda de alternativas para el control de dicha plaga, las cuales deben asegurar que el cultivo sea seguro para el consumo humano, para otros mamíferos, invertebrados y para el medio ambiente. Algunas de ellas son el uso de depredadores, parasitoides y organismos entomopatógenos en donde encontramos a las bacterias, virus, hongos, nematodos y protozoarios; [3] los cuales son seguros para el hombre y específicos para controlar a la plaga [4].

Para el control biológico de diversas plagas de lepidópteros a nivel mundial, se han utilizado de manera extensiva los baculovirus [5]. Los baculovirus contienen genomas circulares de ADN de doble cadena de 80 a 180 kb que infecta a insectos de los órdenes Lepidóptera, Himenóptera, y Díptera.

El ciclo de replicación de los baculovirus es un proceso complejo y sistémico, el cual involucra diversos procesos de expresión de proteínas virales. El proceso de infección inicia una vez que el individuo susceptible adquiere los CO (cuerpos de oclusión) que se encuentran contaminando el alimento. Las larvas del insecto consumen los CO. Después de la ingestión, estos se disuelven en condiciones alcalinas (pH > 10) del intestino medio y liberan los viriones derivados de oclusión, estos últimos infectan las células epiteliales del intestino medio dando inicio al primer ciclo de replicación o infección primaria, la cual es necesaria para que posteriormente se infecten todos los órganos y tejidos, lo cual sucede aproximadamente a las 18 hpi cuando del tejido primario las partículas virales brotan e inicial un nuevo ciclo de infección o secundaria [6].

El presente trabajo tuvo como objetivo identificar la expresión diferencial de proteínas en el tejido primario de *Spodoptera frugiperda* a las 48 horas post-infección, en larvas infectadas con el baculovirus SfNPV-Ar.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material biológico

Se utilizó el baculovirus cepa SfNPV-Ar la cual fue aislada en Argentina y donada por el Dr. Trevol Williams.

Amplificación del inóculo viral

Se seleccionaron larvas de 2do instar (1.2 a 1.5 cm de largo), las cuales fueron individualizadas y permanecieron en ayuno durante 24 horas. Posteriormente se les inoculó por el método de infección en gota, para lo cual se les suministró una mezcla de CO a una concentración de 1×10^7 CO/larva, sacarosa al 10% y colorante vegetal.

Purificación del inóculo viral

Una vez pasados 5 días después de la infección, las larvas infectadas se procesaron en un mortero de porcelana estéril, con agua destilada estéril (ADE). La molienda se filtró por una malla de organza, el filtrado se lavó con SDS 1% y con centrifugaciones a 8,000 rpm por 15 minutos a 4 °C en la Centrifuga Hermle, Z326k, este procedimiento se realizó 4 veces y al final se resuspendió la pastilla obtenida de cada centrifugación en ADE. Una vez obtenido el inóculo viral se procedió a realizar la purificación de los CO en gradientes de sacarosa del 40-66% (peso/peso), por 1.3 horas a 24,000 rpm en un rotor de columpio (SW28) en una ultracentrifuga (Optima XPN-100 de Beckman Coulter) una vez purificados se colectó la banda correspondiente en los CO y se procedió a lavar las larvas con ADE a 13,000 rpm por 10 minutos a 4°C, repitiendo el proceso 3 veces, una vez libres de sacarosa se procedió a la cuantificación de los cuerpos de inclusión en una Cámara de Neubauer.

Infección de *S. frugiperda*

Para la infección de *S. frugiperda* se individualizaron 80 larvas de 3° estadio (1.2-1.5 cm de longitud), las cuales permanecieron en un periodo de ayuno de 24 horas, para proceder a su infección, en donde 40 larvas fueron infectadas por gota de la misma manera que se realizó previamente con el inóculo viral, mientras que, las otras 40 únicamente se les administró solución de sacarosa al 10% con colorante azul; este último grupo fungió como control.

Extracción de intestinos

Cumplíndose las 48 horas post-infección (hpi) y las 48 horas sin infección (hsi) de cada uno de los grupos (infectadas y sin infectar) se procedió a la extracción de intestinos, en la que se utilizó un Kit de disección, previamente esterilizado. La extracción se llevó a cabo utilizando un estereoscopio (Carl Zeiss 7.4). Después se almacenaron en tubos eppendorf con Buffer English-Ready (50 Mm Sacarosa, 2Mm Tris HCl y 1 Mm PMSF). Posteriormente los tubos se centrifugaron en una centrifuga (Heraeus Fresco 21) a 3,000 rpm por 30 minutos a 4°C. Se desechó el sobrenadante y se almacenó la pastilla de intestinos a -20°C.

Extracción de proteínas solubles

Se preparó un Buffer de Lisis (UREA 8 M, TIUREA 2 M, CHAPS 0.5%, DDT 1mM y PMSF 1 mM) y se resuspendió la pastilla de intestinos en 100 µL del Buffer de Lisis. Posteriormente, se vortexó la muestra con buffer de lisis de 10-20 segundos; al terminar se almacenaron las muestras a -20°C por 10 minutos, este procedimiento se realizó por triplicado. Una vez transcurrido este tiempo se centrifugó a 13,200 rpm por 30 minutos a 4°C. Finalmente se recuperó el sobrenadante y se almacenó a -20°C.

Purificación de proteínas solubles

Para la purificación se utilizó el kit de ReadyPrep 2-D Cleanup Kit del Bio-Rad utilizando las instrucciones dadas por el proveedor.

Cuantificación de proteínas por Bradford

Una vez purificadas las proteínas solubles, para eliminar las grasas y carbohidratos, se procedió a la

cuantificación por el método de Bradford, para lo cual se preparó la solución de Bradford 1:5 con agua destilada. Después, se preparó un módulo de filtración con membrana de nylon de 8 μm , por el cual, se filtró la solución de Bradford. Posteriormente, se prepararon las muestras con proteína en relación 1:20 con Buffer de Rehidratación (UREA 8 M y CHAPS al 2%). Posteriormente en una placa Elisa se cargaron los pozos con 10 μL , repitiendo 3 veces con cada una de las muestras, sin olvidar un control con Buffer de rehidratación de 10 μL por triplicado. Seguidamente, se agregó a cada pozo, tanto el control como la muestra, 200 μL de solución de Bradford. Finalmente se realizó la cuantificación en un Espectrofotómetro de Microplacas (xMark de BioRad).

Análisis en una dimensión (1-D) de las proteínas solubles

Para la electroforesis se elaboró un gel continuo de poliacrilamida (12%) en condiciones desnaturizantes (SDS-PAGE) en una cámara vertical de electroforesis (Mini-Protean Tetra Cell de BioRad). Para su elaboración se utilizó para el gel separador 1.65 ml de ADE, 1.25 ml de Tris 1.5 M pH 8.8, 2 ml de Acrilamida 30%, 50 μL de SDS 10%, 50 μL de PSA 10% y 6 μL de TEMED; para el gel concentrador se usaron 1.36 ml de ADE, 250 ml de Tris 1 M pH 6.8, 340 ml de Acrilamida 30%, 20 μL de SDS 10%, 20 μL de PSA 10% y 5 μL de TEMED. Una vez polimerizados los geles se cargaron las muestras de proteína y se sometieron a un voltaje inicial de 80 V durante 15 minutos y posteriormente a 120 V hasta que las muestras salgan del gel. Posteriormente se llevó a cabo la tinción con azul de Coomassie (azul brillante de Coomassie G-250, Metanol, Ácido acético y agua destilada) durante 10 minutos y la destinción con solución para desteñir (Ácido acético, Metanol y agua destilada) durante 50 minutos. Seguidamente el gel fue visualizado en un fotodocumentador (Gel DocTM EZ Imagen, BioRad). Finalmente, se evaluó la expresión diferencial de proteínas a las 48 hpi y 48 hsi.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Amplificación del inóculo viral

Se amplificó la cepa SfNPV-Ar, y se infectaron 96 larvas de 2do instar de *S. frugiperda*. La concentración que se obtuvo posterior a su cuantificación fue 1.27×10^6 CO/ μL .

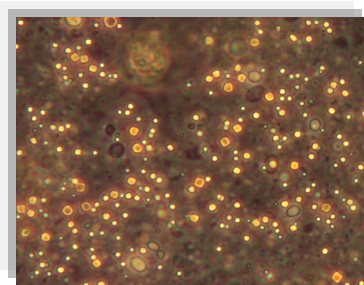


IMAGEN 1: Formación de cuerpos de inclusión en células infectadas con el baculovirus SfNPV-Ar.

Cuantificación de proteínas

Las proteínas extraídas a las 48 horas, de las 40 larvas infectadas y 40 sin infectar, fueron cuantificadas utilizando un fotodocumentador (Gel DocTM EZ Imagen, BioRad) y arrojaron las concentraciones observadas en la tabla 1.

Tabla 1. Cuantificación de proteínas a la condición de 48 hrs.

Condición	Absorbancia	Concentración (µg/µl)
48 horas sin infección	0.4057	6.0316
48 horas post-infección	0.4637	7.4817

En la Imagen 2 se presenta el resultado del perfil de proteínas obtenido de los intestinos lisados a las 48 hsi (carril 2) y a las 48 hpi (carril 3). En el carril 3 se observaron aproximadamente 22 bandas cuyo peso molecular oscila entre los 10 y los 220 KDa, en las cuales se observaron proteínas de 19, 32, 38 y 220 KD a las 48 hpi que estaban presentes únicamente en la condición problema o infectada y ausentes en el control, esto podría ser un indicativo del control que ejercen los baculovirus sobre la expresión de proteínas de una célula infectada. Estas proteínas podrían ser de origen viral, o de la misma célula, en este último caso podría hablarse de proteínas de defensa de la célula o de proteínas de la célula que el virus necesita para poder llevar a cabo su proceso de replicación.

En reacción a las muestras control, en el carril 2 de la Imagen 2, se observaron 23 en total de los 10-220 KD. De estas solo 2 que estaban únicamente en el control y no en el problema, estas proteínas de manera indirecta podríamos inferir se trata de proteínas de célula que el virus está apagando. Esto probablemente se debe a que el virus no necesita estas proteínas para poder llevar a cabo su ciclo de replicación o bien podrían ser proteínas de defensa de la célula las cuales el virus puede apagar influir sobre los genes de estas y apagar su expresión lo que por consiguiente propiciaría que no fueran detectadas en un análisis proteómico.

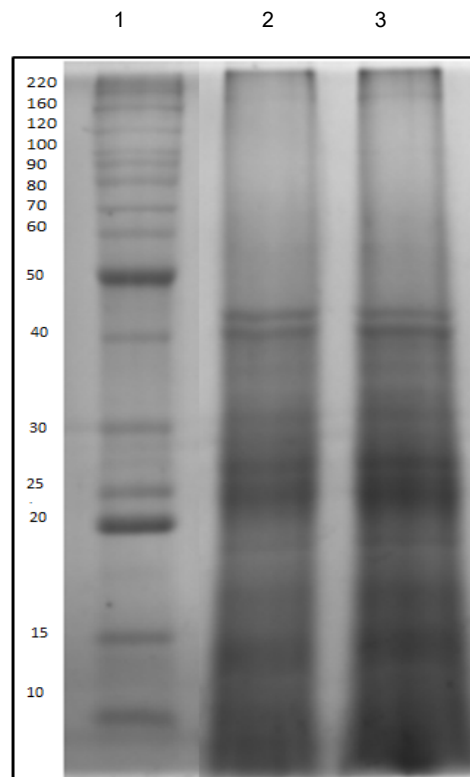


IMAGEN 2: Análisis diferencial proteico a las 48 hsi (2) y a las 48 hpi (3), infectadas con el baculovirus SfNPV-Ar, siendo el (1) como el Marcador de peso Molecular (Bench Mark).

CONCLUSIONES

En este estudio se Encontró que la expresión de proteínas diferenciales en el tejido primario de *S. frugiperda*; arrojó en el análisis de una dimensión cuatro proteínas que se encontraban exclusivamente en la condición problema, las cuales tenían un peso de 19, 32, 38 y 220 KDa, estas proteínas pudieran ser de dos fuentes una es de origen viral, es decir proteínas expresadas por el virus y otra opción podría ser que se tratase de proteínas expresadas por las células infectadas como mecanismo de defensa a la infección viral o proteínas celulares que son inducidas por el virus ya que podrían ser necesarias para llevar a cabo la replicación viral.

En el caso de la condición control se encontraron 2 proteínas de 10 y 55 KDa, las cuáles podrían ser proteínas que la infección viral suprimió para permitirle al virus replicarse de manera óptima.

Este trabajo permitió hacer un primer acercamiento al proceso primario de infección, lo que con un análisis más a fondo en 2-DE, seguido de una identificación de las proteínas diferenciales, podría ayudar a dilucidar los mecanismos moleculares por los que el virus es tan eficiente en el control de *Spodoptera frugiperda*.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen el apoyo por parte de la Universidad de Guanajuato por el financiamiento económico de esta investigación "Expresión diferencial de proteínas en el tejido primario de *S. frugiperda* infectada por SfNPV-Ar a las 48 horas. Así mismo agradezco a la Dra. María Cristina del Rincón Castro por brindarme la oportunidad de realizar dicha investigación en el Laboratorio de Biotecnología, junto con la asistencia de Mónica Lia Peña Galván y Jonatan Carmen Rangel Núñez.

REFERENCIAS

- [1] INIFAB (2013) Reporte Anual, Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias. www.inifap.gob.mx/Documents/reportes/reporte_anual2013.pdf
- [2] SIAP (2012) Cierre de la Producción Agrícola Maíz de Grano. México. Servicio de Información. Agropecuaria y Pesquera. Mexico. www.siap.go.mx/ (Cons.25/01/2014).
- [3] Del Rincón-Castro MC, Méndez-Lozano J, Ibarra JE(2014) Caracterización de cepas nativas de *Bacillus thuringiensis* con actividad insecticida hacia el gusano cogollero del maíz *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera:Noctuidae). *Folia Entomol. Mex.* 45: 157-164.
- [4] Molina-Ochoa J, Carpenter JE, Lezama-Gutierrez R, Foster JE, González-Ramírez M, Ángel-Sahagún CA, Farías-Larios J (2014) Natural distribution of hymenopteran parasitoids of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) larvae in Mexico. *Flo. Entomol.* 87: 461-472.
- [5] Szewczyk B, Lobo de Souza M, Batista de Castro ME, Lara M, Moscardi F (2011) Baculovirus Biopesticides. Em Stoytcheva M (Ed.) *Pesticides - Formulations, Effects, Fate.* www.inte.chopen.com/books/pesticidesformulations-effects-fate/baculovirus-biopesticides.
- [6] Posse, R., Griffiths, C., Hitchman, R., Chambers, A., Murguía-Meca, F., Danquah, J., Jeshtadi, A., King, L. 2010. Baculoviruses: biology, replication and exploitation. En: *Insect Virology.* Edited by Asgari, S., Johnson, K. School of Biological Sciences. Caister Academic Press, Norfolk, UK.