

EVALUACIÓN DEL PERFIL PROTEOMICO DIFERENCIAL DE LA CEPA DE BACUOLOVIRUS SfNPV-Ar EN HEMOCITOS DE LARVAS DEL GUSANO COGOLLERO DEL MAÍZ (*Spodoptera frugiperda*)(LEPIDOPTERA:NOCTUIDAE) A LAS 24 HPI

Fuentes Alfaro, Astrid Fabiola ⁽¹⁾, Sánchez García, Alejandra ⁽²⁾, Rangel Núñez, Jonatán Carmen ⁽²⁾, Del Rincón Castro, María Cristina ⁽²⁾

1 [Ingeniería en Sistemas de Producción Agrícola, Universidad de San Carlos de Guatemala] | [astridfu2112@gmail.com]

2 [Departamento de Alimentos, Posgrado en Biociencias, División de Ciencias de la Vida, Campus Irapuato-Salamanca, Universidad de Guanajuato] | [ibq.alesanchez@gmail.com]

2 [Departamento de Alimentos, Posgrado en Biociencias, División de Ciencias de la Vida, Campus Irapuato-Salamanca, Universidad de Guanajuato] | [jonatanc.rangel@yahoo.com.mx]

2 [Departamento de Alimentos, Posgrado en Biociencias, División de Ciencias de la Vida, Campus Irapuato-Salamanca, Universidad de Guanajuato] | [cdelrincon@ugto.mx]

Resumen

Spodoptera frugiperda es considerada la principal plaga del maíz, controlada tradicionalmente con productos químicos, cuyo abuso ha propiciado el surgimiento de genotipos resistentes, dificultado su control. Afortunadamente esta plaga cuenta con un amplio rango de enemigos naturales entre los que encontramos un baculovirus denominado SfNPV-Ar, quien ha demostrado una gran capacidad para controlarla en campo y laboratorio. En esta investigación se realizó el análisis en una dimensión de las proteínas de los hemocitos de larvas de *S. frugiperda* infectadas con el baculovirus SfNPV-Ar, a las 24 horas después de la infección, donde se observó exclusivamente en la condición infectada una proteína de 33 kDa la cual probablemente es expresada por la infección viral. De igual manera en el control se observaron cuatro proteínas de 160, 75, 42 y 17 kDa las cuales probablemente fueron apagadas por la infección viral a este tiempo. Como resultado al análisis y evaluación del perfil proteómico diferencial realizado en hemocitos de larvas de *Spodoptera frugiperda*, a las 24 horas post-infección y sin infección, se concluyó que la actividad bioinsecticida del baculovirus SfNPV-Ar, posee un alto potencial de estímulo y desvalorización de ciertas proteínas en el insecto infectado.

Abstract

Spodoptera frugiperda is considered the most important plague of corn, traditionally it's controlled with chemical products, whose abuse has led to the emergence of resistant genotypes, making control difficult. Fortunately this plague has a wide range of natural enemies fortunately there is a baculovirus called SfNPV-Ar, which has demonstrated a great capacity to control the plague in field and laboratory. In order to analyze the above in this report, we focused on the analysis in one dimension of the proteins of the hemocytes of *S. frugiperda* larvae infected with the baculovirus SfNPV-Ar, at 24 hours after infection, where it was observed exclusively in the infected condition a protein of 33 kDa which is probably expressed by the viral infection; In the same way, in the control, four proteins of 160, 75, 42 and 17 kDa were observed, which were probably extinguished by the viral infection. As a result of the analysis and evaluation of the differential proteomic profile carried out in *Spodoptera frugiperda* larvae, at 24 hours post-infection and without infection, it was concluded that the bioinsecticide activity of baculovirus SfNPV-Ar, has a high potential for stimulation and devaluation of certain proteins in the infected insect.

Palabras Clave

Maíz; *Spodoptera frugiperda*; Hemolinfa; Proteínas; 24 HPI

INTRODUCCIÓN

El cultivo de maíz (*Zea mays*) se encuentra dentro de los granos básicos de consumo y producción a nivel mundial [1], es una siembra estratégica para la alimentación de los mexicanos y su producción se basa en la obtención de granos y elote [2]. México es el octavo productor más grande del mundo de maíz [3]. Para el año 2017 se registró por parte de Servicio de Información Agroalimentario y Pesquera (SIAP) que la producción de maíz de grano tanto del ciclo otoño-invierno y primavera-verano fue de 13.7 millones de toneladas [4]. La superficie y el rendimiento con el pasar de los años va en incremento, por lo tanto, es de suma importancia para los productores, tomar las medidas adecuadas para su máximo aprovechamiento.

Este cultivo se ve afectado en su crecimiento y desarrollo vegetal por diversos factores que disminuyen su rendimiento, principalmente incidencia de arvenses, enfermedades e insectos plaga [3]. El gusano cogollero del maíz (*Spodoptera frugiperda*) es considerada la principal plaga del cultivo de maíz debido a la pérdida de rendimiento que oscila entre el 30 al 40% aproximadamente o hasta la pérdida total del cultivo, si la plaga ataca en periodos cercanos a la etapa de floración [5]. El control de esta plaga se basa típicamente en el uso de insecticidas químicos cuyo abuso generó el surgimiento de resistencia por parte de la plaga hacia las moléculas químicas [1]. Actualmente se ha implementado el control biológico para hacer frente a esta plaga, esta estrategia se define como el uso de organismos benéficos (enemigos naturales de la plaga) contra aquellos organismos que causan algún daño en el cultivo de interés [6]. De entre estos agentes de control, los baculovirus son una de las opciones para controlar al gusano cogollero a nivel de campo.

Los Baculovirus son una familia diversa de virus ocluidos que poseen ADN de doble cadena y afectan invertebrados, especialmente insectos [7]. La familia Baculoviridae está compuesta por cuatro géneros, dentro de los que se destacan los *Alfabaculovirus* los cuales son nucleopoliedrovirus específicos de Lepidópteros [1]. En el laboratorio de Biotecnología Alimentaria y Vegetal de la Universidad de Guanajuato se cuenta con una cepa de baculovirus SfNPV-Ar, donde según estudios realizados en 2014 es altamente agresiva contra esta plaga a nivel de laboratorio [6] y en estudios preliminares a nivel de campo demostró tener un alto potencial para controlar a la plaga [1]. Este comportamiento tan virulento de esta cepa contra su hospedero, evidencia que podría estar expresando proteínas que ayudarían al virus a replicarse y diseminar la infección en los órganos del insecto, lo que junto con la probable expresión de proteínas virales únicas de esta cepa, podría traducirse en una rápida muerte del insecto, sin embargo para poder dilucidar el posible mecanismo de acción del virus, es necesario estudiar cada paso del proceso de infección lo que implicaría estudiar tejidos específicos en tiempos después de la infección.

Por esta razón, este trabajo de investigación tuvo como objetivo principal analizar la expresión diferencial de proteínas en hemocitos de *Spodoptera frugiperda*, infectados con el baculovirus SfNPV-Ar a las 24 horas post-infección (HPI), ya que este tejido es el primero en verse afectado por la infección secundaria y a este tiempo podríamos encontrar las primeras proteínas de origen viral expresadas durante la infección.

MATERIALES Y MÉTODOS

Cepa. Se utilizó el virus SfNPV cepa Argentina denominado como: SfNPV-Ar, donada por el Dr. Trevol Williams.

Matenimiento de la colonia de *Spodoptera frugiperda*. El mantenimiento de la colonia *S. frugiperda* se realizó en condiciones de insectario en dieta artificial (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% 3.125 mL; antibiótico 0.75 mg; y mezcla de vitaminas 18.75 g), en la cámara Percival a una temperatura de 27°C y un fotoperíodo de 8 a 12 horas luz-oscuridad. En este caso las larvas a utilizar son del tercer instar el cual tienen una longitud aproximada de 1.2 a 1.5 cm.

Amplificación del inoculo viral. La amplificación del inoculo viral se realizó en cajas Petri. Las larvas se hambreadaban por 24 horas y se infectaban por el método de infección en gota, para la cual se les alimentaba con una solución de cuerpos de oclusión (CO) que contenían una concentración de 1×10^7 co/ μ L, sacarosa al 10% y colorante azul, posteriormente se colocaron en cajas Petri, con la dieta artificial, se incubaron bajo condiciones de insectario por 5 días. Las larvas que mostraron infección se colectaron y se procesaron en mortero de porcelana estéril, con 2 ml de agua destilada estéril (ADE). El macerado se filtró con una doble malla de organza y se centrifugó a 18,928 G/15 min (Centrífuga Hermle, Z326K). La pastilla obtenida se resuspendió con ADE, repitiendo el procedimiento 4 veces más, después se almacenaron las muestras a -20 °C.

Purificación de cuerpos de oclusión. La purificación de cuerpos se realizó para eliminar restos de grasa y tejido, los cuerpos de oclusión se purificaron en gradientes continuos de sacarosa del 40-66% (peso/peso), se centrifugaron a 64,512 G/1.5 horas a 4°C, utilizando un rotor de columpio SW28 (Ultracentrífuga Beckman Coulter, Optima L-100XP). Posteriormente se retiraron los restos de sacarosa con ADE, para esto se colectó la banda perteneciente a los CO y se mezclaron con ADE, esta mezcla se centrifugó a 25,200 G/15min a 4°C. El procedimiento se repitió por tres veces o hasta que el agua se torne clara. La pastilla obtenida se resuspendió nuevamente con 4 ml ADE y se almacenó a -20 °C.

Conteo de los poliedros. Los CO's obtenidos de la pastilla recuperada fueron cuantificados en cámara de Neubauer, con diluciones de 1:10. El conteo se realizó en un microscopio AxioLabA1 (Zeiss) con objetivo 40x, en el cual se obtuvo un promedio del conteo de 5 cuadrantes, este se multiplicó por una constante de 2.5×10^5 y por el factor de dilución, el resultado obtenido de dicho cálculo correspondió a la concentración del inoculo viral.

Infección de larvas. Para la infección de larvas se procedió a realizar la técnica de infección en gota, se hambreadaron 100 larvas de tercer instar, se usaron 50 larvas para la condición problema u HPI a las cuales se les inoculó con una solución 1×10^7 CO/ μ L, sacarosa al 10% y colorante vegetal y 50 larvas para el control u HSI (horas sin infección) inoculadas exclusivamente con sacarosa y colorante, posteriormente se colocaron en dieta artificial bajo condiciones de insectario hasta su utilización.

Extracción de hemolinfa de larvas infectadas. Para la extracción de hemolinfa de larvas a las 24 HPI y HSI, se procedió a limpiar las larvas con etanol al 70%, posteriormente se cortaron las pseudopatas medias y se colectó la hemolinfa de cada larva en tubos eppendorf que contenían 1,000 μ L de un agente antioxidante (glutatión 6 mg/mL), manteniendo la muestra a 4°C. Una vez colectada la hemolinfa de las 50 larvas de cada condición, se centrifugaron las muestras a 1,008 G/30 min a 4°C, se desechó el sobrenadante y se almacenó la pastilla de hemocitos a -20 °C hasta su uso.

Extracción de proteínas solubles. La pastilla obtenida de la extracción de hemolinfa se resuspendió en aproximadamente 50 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 por 15 s cada 10 min durante 30 min, se repitió este proceso y se mantenía en hielo en los diferentes intervalos, se centrifugó a 13,200 G/30 min, finalmente se recuperó el sobrenadante.

Determinación de la concentración de proteínas por Método de Bradford. Una vez lisados los hemocitos se procedió a realizar la cuantificación de las proteínas solubles en el espectrofotómetro X-mark (Bio-Rad), para lo que se realizó una dilución 1:10 y se mezclaron 10 μ L de esta dilución con 200 μ L del reactivo de Bradford, esto en una placa de Elisa por triplicado, una vez tomada la lectura se realizó la determinación de la concentración según la curva de calibración.

Determinación del perfil de proteínas. En una cámara vertical de electroforesis (Mini-Protean Tetra Cell de BioRad) se colocaron 20 μ g de las proteínas previamente extraídas y cuantificadas, estas fueron mezcladas con solución de Laemmli (Tris 0.5 M, SDS al 20%, glicerol, β -mercaptoetanol, azul de bromofenol 0.02%) a una relación 2:1 (muestra: solución de Laemmli), una vez mezcladas se colocaron a ebullición por 10 min. Las muestras desnaturalizadas se cargaron en un gel discontinuo de poli(acrilamida) al 12% (gel separador: 1.65 ml de ADE, 1.25 ml de Tris 1.5 M pH 8.8, 2 ml de Acrilamida 30%, 50 μ L de SDS 10%, 50 μ L de PSA 10% y 6 μ L 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 μ L de SDS 10%, 20 μ L de PSA 10% y 5 μ L de TEMED.) y sometidas a un voltaje inicial de

88 V durante 20 min y finalmente a 120 V. Posteriormente se llevó a cabo la tinción con azul brillante de Coomassie (G-250) durante 10 min y se destiño con una solución de ácido acético 75 mL, metanol 50 mL y ADE 875 mL durante toda la noche. El gel fue visualizado en un fotodocumentador (Gel Doc™ 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

Determinación de la concentración de inóculo viral. La cuantificación de cuerpos de inclusión de SfNPV-Ar fue de 2.73×10^9 CO/ml como se observó en la cámara de Neubauer en la imagen 1 y se utilizaron para la infección de larvas.

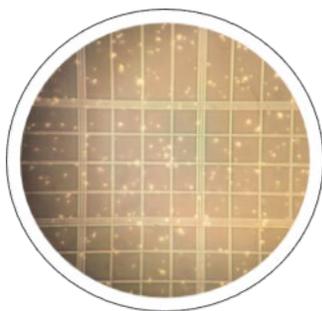


Imagen 1: Cuenta de cuerpos de inclusión en 5 cuadrantes de la cámara de Neubauer.

En la tabla 1 se presentan las concentraciones obtenidas de proteína de las 50 larvas a las 24 HPI y 50 larvas a las 24 HSI. Para obtener una concentración final de 15 $\mu\text{g/ml}$ usadas en el gel discontinuo de poliácridamida, se tomaron 3.8265 μL de la muestra de proteína control y 4.3383 μL de la muestra de proteína de larvas infectadas.

Tabla 1: Concentración de proteínas a las 24 HPI Y HSI.

Condición 24 h	Absorbancia	Concentración $\mu\text{g/ml}$	μL de muestra
Control	0.478	392	3.8265
infectadas	0.441	345.75	4.3383

En la imagen 2 se muestra el gel de poliácridamida a 24 horas de la ingesta del inóculo viral por las larvas. En el carril 2 de la imagen 2 se observaron cuatro proteínas de 160, 75, 42 y 17 kDa (cuadro a, b, c y d) son proteínas encontradas exclusivamente en la condición control con bandas de alta concentración, pudiéndose notar que en la condición de infección (carril 3) estas bandas se observaron con menor intensidad. Estas proteínas pudieran ser de las células que se están apagando por el proceso de infección viral, ya que se ha comprobado que este proceso es capaz de inducir una degradación proteolítica de las proteínas del hospedero así como un cese del proceso de expresión de genes de las células infectadas, para asegurar la correcta replicación del virus. Así mismo es importante hacer mención que cuando la larva sufre una agresión ya sea por virus, ambiental, parásitos, hongos, microorganismos patógenos, entre otros que alcanza el estrato corneo supera la función barrera y daña a una parte de las proteínas presentes en las células viables [8].

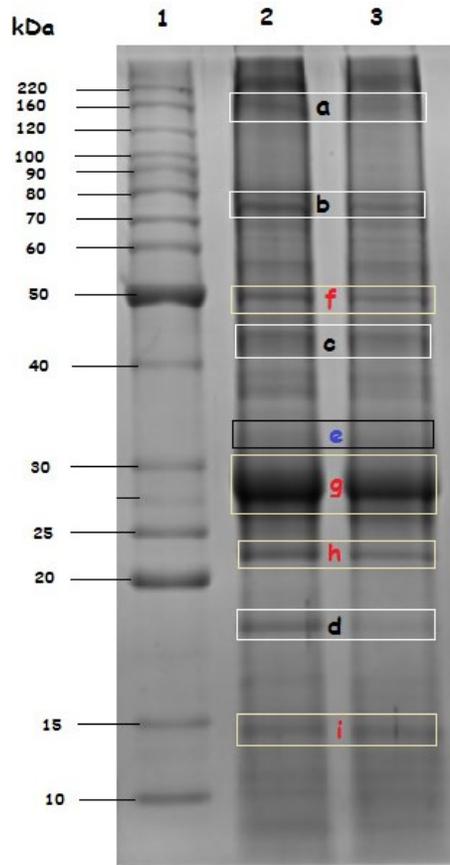


Imagen 2. Perfil de proteínas diferencial a las 24 HPI y HSI. Carril 1: MPM (marcador de peso molecular/kDa); Carril 2: Proteínas de hemocitos sin infectar; Carril 3: Proteínas de hemocitos infectadas con SfNPV-Ar; Cuadro a, b, c y d muestra proteínas encontradas con mayor intensidad en el carril 2; Cuadro e proteína que empieza a contrastar en el carril 3; Cuadro f, g, h, i posibles genes constitutivos.

En el carril 3 se observó una banda que estaba presente únicamente en la condición infectada, esta proteína correspondió al peso molecular de 33 kDa la cual corresponde a la imagen 2 cuadro e. Posiblemente esta proteína se está empezando a expresar en los hemocitos por el proceso de infección viral, ya que son 24 h después, donde se inicia el tiempo de la infección secundaria, los hemocitos inician a infectarse cuando las partículas virales brotan del tejido primario (intestino medio) a las 18 HPI, siendo las 24 en realidad las 6 HPI en la infección secundaria, el origen de esta proteína podría ser de diversas fuentes como: 1.- de origen viral ya que a las 6 HPI se inicia la excreción de los genes muy tempranos de los baculovirus, 2.- de la misma célula que en este último caso pudieran ser proteínas que se expresaron por el virus donde son necesarias para poder replicarse o bien pudiendo ser también proteínas de defensa de los hemocitos, pues se sabe que estas son las células de defensa de los insectos contra infecciones.

Por otro lado, también se observaron bandas que permanecieron constantes durante el proceso de infección imagen 2 cuadro f, g, h, i con un peso molecular de 50, 28, 22 y 14 kDa a estos se les podría llamar genes constitutivos los cuales las células siempre necesitan, estos no se ven afectados por el proceso de infección. Como perspectivas proponemos seguir evaluando el proceso de infección en los hemocitos de *S. frugiperda* a las 48, 72 y 96 horas, esto con la finalidad de evaluar en el tiempo y un tejido específico todas las etapas del proceso de infección de SfNPV-Ar, de esta manera tratar de dilucidar el proceso completo de expresión de

proteínas del virus y el hospedero, así como la regulación negativa de las proteínas de la célula durante el proceso de infección.

CONCLUSIÓN

Como resultado al análisis y evaluación del perfil proteómico diferencial realizado en hemocitos de larvas de *Spodoptera frugiperda*, a las 24 horas post-infección y sin infección, se concluyó que la actividad bioinsecticida con el uso de cepas de baculovirus SfNPV-Ar posee un alto potencial de estímulo y desvalorización de ciertas proteínas en el caso de hemocitos sin infectar se observaron cuatro proteínas correspondientes a un peso molecular 160, 75, 42 y 17 kDa y en el caso de hemocitos infectados se observó una proteína con un peso de 33 kDa que empieza a sintetizarse, así mismo otras 4 proteínas observadas en ambas condiciones lo cual se asumen que podrían ser genes constitutivos estos se encuentran a los 50, 28,22 y 14 kDa pero dadas las circunstancias que la infección se dio a muy pocas horas y para que una larva este completamente infectada y sus células sufran una total regulación del proceso de expresión de proteínas necesita de más de 6 HPI, y para que el individuo muera por el proceso de infección necesita en promedio 5 días un equivalente a 120 horas. Por lo que es necesario seguir realizando estudios a las 48, 72 y 96 horas después del inicio de la infección secundaria y elaborar geles diferencial proteómicos 2-DE (dos dimensiones) e identificar esas proteínas para conocer su procedencia, de esta forma podremos analizar la manera en que el virus toma la maquinaria celular de la larva para replicarse y posiblemente el medio por el cual esta cepa es tan eficiente en el control de la plaga *S. frugiperda*.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a Dios por permitirme vivir esta experiencia y poder lograr mis objetivos, a mi madre por apoyarme y creer en mí, a la universidad de Guanajuato por la oportunidad y el financiamiento que me brindo para realizar esta investigación, a la Universidad de San Carlos de Guatemala por incentivar a participar en este Verano de Investigación, a la Doctora María Cristina del Rincón Castro por el apoyo y su aceptación en su laboratorio de trabajo, y a Alejandra Sánchez y Jonatán Rangel por su paciencia, dedicación y enseñanzas para con este proyecto.

REFERENCIAS

- [1] Medina B.E, Ramírez I.A, Rangel J.C., Del Rincón M.C. 2017. Evaluación en campo de dos cepas de baculovirus con actividad bioinsecticida hacia el Gusano Cogollero del maíz (*Spodoptera frugiperda*) (Lepidoptera:Noctuidae) en el Bajío Mexicano.
- [2] Reséndiz R.Z., López S.J.A., Osorio H.E., Estrada D.B, Pecina M.J.A., Mendoza C.M.C., Reyes M.A. 2016. Importancia de la resistencia del maíz nativo al ataque de larvas de lepidópteros. *Temas de Ciencia y Tecnología* 20:3-14.
- [3] Valdez-Torres J.B., Soto-Landeros F., Osuna-Enciso T., Báez-Sañudo A.M. 2012. Modelos de predicción fenológica para maíz blanco (*Zea mays* L.) y gusano cogollero (*Spodoptera frugiperda* J.E.Smith). *Agrociencia* 46:399-410.
- [4] SIAP. Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. 2017. Reporte de Producción. México. http://infosiap.siap.gob.mx/anpecuario_siapx_gobmx/indexnal.jsp. Consultado el 12 julio 2018.
- [5] 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* (Lepidoptera: Noctuidae). *Folia Entomológica Mexicana*, 45: 157-164.
- [6] 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* (Lepidoptera: Noctuidae). *Interciencia*, 39(5).
- [7] Gomez j., Villamizar I., Rangel J.C., 2013. Baculovirus:Hospedero y especificidad,15: 2 143-155.
- [8] Llorens P. 2007. Los proteosomas epidérmicos y su control tóxico, 26:9