

Análisis 2-D de la infección primaria de SfNPV-Ar en larvas de *Spodoptera frugiperda* a las 24 horas.

Peña Galván M.L.^{a*}, Rangel Núñez J.C.^a, Del Rincón Castro M.C.^a

c Universidad de Guanajuato, División de Ciencias de la Vida, Campus Irapuato-Salamanca, Departamento de alimentos, Posgrado en Biociencias, ExHacienda El Copal, Km. 9.0 Carr. Irapuato-Silao. 36500 Irapuato, Guanajuato. México. mdelrinc@yahoo.com

RESUMEN:

El maíz es un cultivo esencial tanto en la dieta como en la cultura mexicana, dicho cultivo presenta un problema grave causado por plagas como *Spodoptera frugiperda* la cual actualmente se controla con sustancias químicas que ponen en riesgo la salud de los consumidores y la calidad del fruto. Sin embargo, se están buscando alternativas para sustituir el control químico por uno biológico, tal es el caso del uso de baculovirus. En este trabajo, realizamos el análisis del perfil de las proteínas en una dimensión (1-D) a 6.12 y 24 horas post-infección y dos dimensiones (2-D) a 24 horas post-infección extraídas del intestino medio de larvas de *S. frugiperda*. En donde, para el análisis a 1-D obtuvimos que en los diferentes tiempos post-infección, las proteínas se regularon negativamente, mientras que para el análisis 2-D, aproximadamente 34% de las proteínas presentaban cambios a las 24 horas post-infección. Nuestro trabajo contribuye al estudio de la expresión diferencial de las proteínas inducidas o reprimidas en un insecto huésped infectado por baculovirus..

Palabras clave: Proteínas, larvas, maíz, *Spodoptera frugiperda*, baculovirus.

ABSTRACT:

Maize is an essential crop both in the Mexican diet and culture, this crop presents a serious problem caused by *Spodoptera frugiperda* which is currently controlled with chemical substances that put in risk the consumers health and the maize quality. Nevertheless, they are looking to replace the chemical control for a biological one, this is the case of the baculovirus. In this paper, we made the protein profile analysis in one dimension (1-D) at 6,12 and 24 post-infection hours and two dimensions (2-D) at 24 post-infection hours extracted from the medium intestine of larvae of *S. frugiperda*. In which, for the 1-D we obtained that in the different post-infection times, the proteins were regulated negatively, meanwhile for the 2-D analysis, approximately 34% of the proteins presented changes 24 hours post- infection. Our work contributes to the study of differential expression of induced or repressed proteins in a host insect infected by baculovirus..

Palabras clave: Protein, larva, maize, *Spodoptera frugiperda*, baculovirus.

Área: Microbiología y biotecnología

INTRODUCCIÓN

Spodoptera frugiperda también conocido como el gusano cogollero del maíz, (J. E. Smith) u oruga militar tardía, es una plaga de suma importancia en el cultivo del maíz, debido a que ataca la planta en todas sus etapas de desarrollo (crecimiento, floración y fructificación), causando en algunas ocasiones la pérdida total de los cultivos (Flores-Hueso, 2000). Dicha plaga consume principalmente maíz, sin embargo, puede alimentarse de otras 80 especies de plantas como: arroz, el sorgo, el mijo, la caña de azúcar, algunos cultivos de vegetales y algodón (FAO, 2017). Esta especie es nativa del trópico, con amplia distribución geográfica que abarca todo el continente americano (Alonso Alvarez, 1991, Pastrana y Hernández, 1979, Murillo, 1991). Su amplia distribución y población se debe a que las polillas pueden llegar a volar hasta 100 km por noche y a que las hembras pueden llegar a poner hasta 1,000 huevos en su vida (FAO, 2017), también por su poder de adaptación a diferentes condiciones climáticas (Andrews, 1988).

El maíz es el cultivo agrícola más importante de México (SIAP, 2012). En 2017 se sembraron 1'202,015 hectáreas de maíz en todo México encabezado por los estados de Sinaloa, Veracruz y Tamaulipas con superficies de siembra mayores a 140,000 hectáreas (SAGARPA, 2017). Por otro lado, encontramos las pérdidas que ha causado la plaga del gusano cogollero en la zona del Bajío, en 2013 se reportaron daños significativos en diferentes estados: Aguascalientes con 99,434.5 ha dañadas, Michoacán 29,984 ha dañadas, Querétaro con 237,031 ha dañadas y Guanajuato con 480,000 ha dañadas; este último estado se consideró el más afectado pues cerca del 90% de la superficie de siembra de maíz resulto dañada (CESAVEG, 2013).

Los agentes químicos son el principal método de combate de esta plaga, con sus respectivos efectos negativos sobre el ambiente y la salud de los consumidores, además, se conoce que *S. frugiperda* ha desarrollado resistencia hacia los principales grupos toxicológicos usados para su control; sin embargo, se han implementado nuevas estrategias para atacar dicha plaga como es el caso del uso de variedades resistentes y el control microbiano para poder disminuir el uso de plaguicidas (Del Rincón-Castro et al., 2006). Dentro del microbiano se encuentran los baculovirus que son una familia diversa de virus ocluidos que poseen ADN de doble cadena y afectan invertebrados, especialmente insectos (Miller 1997; Caballero et al., 2001). La infección por baculovirus inicia cuando los insectos ingieren cuerpos de oclusión (COs), los cuales, al enfrentarse a las condiciones alcalinas del intestino medio son disueltos y se liberan los viriones, infectando a las células epiteliales del intestino medio para iniciar la 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), posteriormente, 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 lograr una infección sistémica (Engelhard *et al.*, 1994).

El objetivo del presente trabajo es analizar la expresión diferencial de proteínas en 2 dimensiones a 24 horas post-infección y 24 horas sin infección a partir de larvas infectadas con el baculovirus SfNPV-Ar de *Spodoptera frugiperda* de segundo instar para contribuir al control del proceso de infección.

MATERIALES Y MÉTODOS

Multiplicación de cepa viral

Se realizó administrándoles una dosis de 1×10^7 CO del baculovirus SfNPV-Ar a larvas de segundo instar a las que se les suministraba el virus vía oral en una solución de sacarosa al 10% con colorante vegetal azul. A partir de las 48 horas se realizaba el seguimiento de la infección extrayendo hemolinfa de las larvas que presentaban las características propias de la infección (blancas y tejido suave), para analizar bajo microscopio y observar el ciclo de infección de las células. Una vez que las células presentaban cuerpos de oclusión, se procesaban las larvas en un mortero de porcelana estéril, con 2ml de agua destilada estéril (ADE). El resultado de la molienda se filtró por una malla de organza, para ser centrifugado a 13000rpm y 4°C durante 15min (Centrífuga Hermle, Z326K). La pastilla resultante se resuspendió con ADE, repitiendo el procedimiento dos veces más, para finalmente realizar su cuantificación de CO.

Cuantificación de los cuerpos de oclusión

Fueron cuantificados en una cámara NEUBAUER en dilución 1:100 el cual fue realizado en un microscopio AxioLabA1 con objetivo 40x en el recuadro central. A partir de la suma total del conteo se obtuvo un promedio la cual se multiplica por una constante de 2.5×10^5 y por el factor de dilución obteniendo el número de CO por ml de muestra.

Extracción de intestinos

Se infectaron larvas y posteriormente se realizó la extracción de intestinos bajo un estéreo microscopio Stemi DV4 usando un kit de disección en 6 condiciones diferentes: 24 horas post-infección (24hpi), 24 horas sin infección (24hsi), 12 horas post-infección (12hpi), 12 horas sin infección (12hsi), 6 horas post-infección (6hpi) y 6 horas sin infección (6hsi), los intestinos almacenaban en tubos Eppendorf con 1ml de buffer English-Ready dentro de una bandeja con hielos. Posterior a la extracción de los intestinos, los tubos se centrifugaron a 3,000 rpm a 4°C durante 30 minutos, terminada la centrifugación se extrae el sobrenadante con una pipeta dejando en el tubo únicamente la pastilla de los intestinos. Almacenar a -20°C.

Procesamiento de intestinos

La pastilla de intestinos almacenada a -20°C se resuspende en 100ul de Buffer de Lisis, incubar los tubos Eppendorf a -20°C por 30 minutos y vortexearlos 20 segundos cada 10 minutos. Transcurridos los 30 minutos, centrifugar a 13,200rpm a 4°C por 30 minutos, recuperar el sobrenadante y almacenar a -20°C

Cuantificación de extracto crudo por Bradford

Se prepara y filtra la solución de Bradford por módulos con membrana de nylon de 8 µm la cual se encuentra en concentración 1:5, posteriormente se preparan las muestras obtenidas en el paso anterior a una concentración de 1:20 con Buffer de Lisis s (8M Urea, 2M Tiourea, 0.5% CHAPS, 1mM DTT y 1mM PMSF). En una placa de micro titulación, se coloca en los pozos 10ul de Buffer de Lisis (blanco) y 10ul de las soluciones de la muestra, cada una se debe colocar por triplicado, adicionalmente a cada pozo se le agregan 200ul de solución de Bradford por último se cuantifica en un espectrofotómetro xMark.

Limpieza de muestras usando el ReadyPrep 2-D cleanup Kit

Se realizó el procedimiento de acuerdo a las indicaciones proporcionadas por el proveedor.

Cuantificación de proteína total por Bradford

A la muestra ya limpia se hace una dilución 1:20 con Buffer de rehidratación ((8M Urea, 2% CHAPS), posteriormente en una placa Elisa, se colocan en los primeros pozos 10ul de Buffer de rehidratación (blanco) y en los siguientes pozos 10ul de las soluciones de la muestra, cada una se debe colocar por triplicado, adicionalmente a cada pozo se le agregan 200ul de solución de Bradford, por último, se cuantifican las muestras en un espectrofotómetro xMark.

Perfil de proteínas 1-D mediante geles de poliacrilamida en SDS-PAGE

Se elaboró un gel discontinuo de poliacrilamida (12%) en una cámara vertical de electroforesis (Mini-Protean Tetra Cell de BioRad). 20 µg 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. 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. Posteriormente se llevó a cabo la tinción con azul brillante de Coomassie (G-250) durante 10 minutos y destinción durante toda la noche. Por último, el gel fue visualizado en un fotodocumentador (Gel Doc™ EZ Imagen, BioRad).

Perfil de proteínas 2-D en geles de poliacrilamida en SDS-PAGE

Se rehidrataron tiras de gradiente inmovilizado (ReadyStrip®, BioRad) de 7 cm y un rango de pH de 3-10, por 16 horas a 20°C. Luego de la rehidratación se llevó a cabo el isoelectroenfoque (IEF) en el equipo PROTEAN (i12 IEF BioRad). Al final del IEF las tiras se equilibraron por 20 minutos con buffer de equilibrio (6M Urea, 2% SDS, 0.06 M Tris-HCl pH 8.8, 20% Glicerol) primero con DTT al 2% y después con iodoacetamida al 2.5%. Finalmente, las tiras se fijaron sobre geles de poliacrilamida al 12%. Posteriormente, se aplicó una corriente de 50V por 10 minutos y después 120V. Los geles se tiñeron con azul de Coomassie durante 10 minutos y posteriormente desteñidos durante toda la noche, por último, se fotodocumentaron (Gel Doc™ EZ Imagen BioRad).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Tabla I Cuantificación de proteína total

Muestra	Absorbancia	Concentración ^{ug/ml}
6hsi	0.305	175.75
6hpi	0.231	84.08
12hsi	0.330	207.83
12hpi	0.425	325.75
24hsi	0.360	244.92
24hpi	0.352	234.91

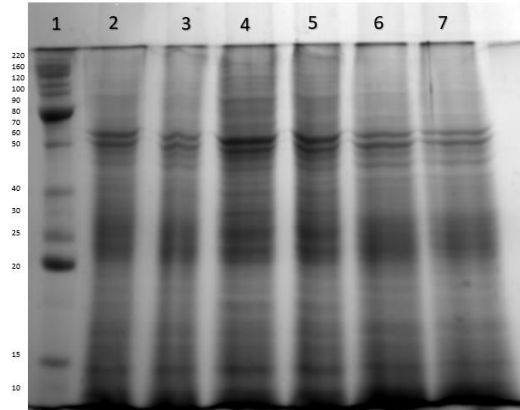


Figura 1 Perfil de proteínas 1-D 1) MPM (BenchMark) 2)6hsi 3)6hpi 4)12hsi 5)12hpi 6)24hsi 7)24hpi

Al realizar el análisis del perfil de proteínas diferencial en 1-D (Figura 2), se detectaron proteínas que se regularon positiva y negativamente. En general podemos observar que las proteínas fueron reguladas negativamente post-infección, algunos casos específicos los podemos observar para 6hpi a los 40 y 42 kDa, 12hpi a los 90 y 30 kDa y a las 24 hpi a los 48 y 14 kDa. Esta característica concuerda con los resultados obtenidos por Flores-Gallardo y colaboradores en el 2017. Además, 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 (Rangel-Nuñez et al, 2014). Por otro lado, para el análisis del perfil de proteínas diferencial en 2-D, se encontró aproximadamente una diferencia en el 33.2% en las proteínas de las cuales 27.7% fueron reguladas negativamente a las 24 horas post-infección, mientras que, 4.7% son encontradas únicamente esta condición por lo que pueden ser proteínas expresadas por el baculovirus SfNPV-Ar, por último las 66.2% de células encontradas en ambas condiciones, pueden tratarse de proteínas elementales para la estructura y función de las células.

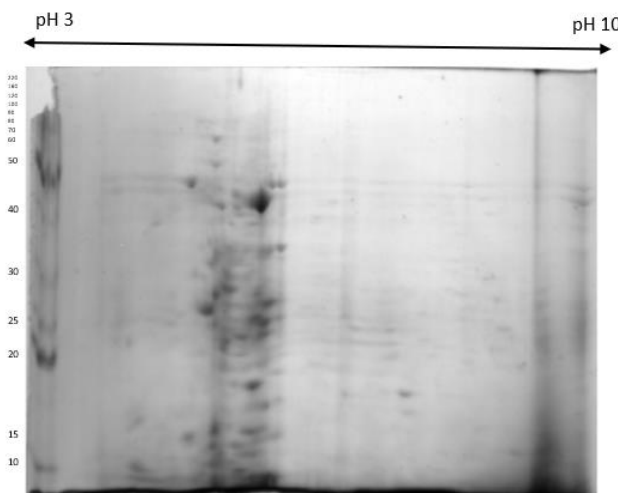


Figura 2 Perfil de proteínas 2-D 24 hsi

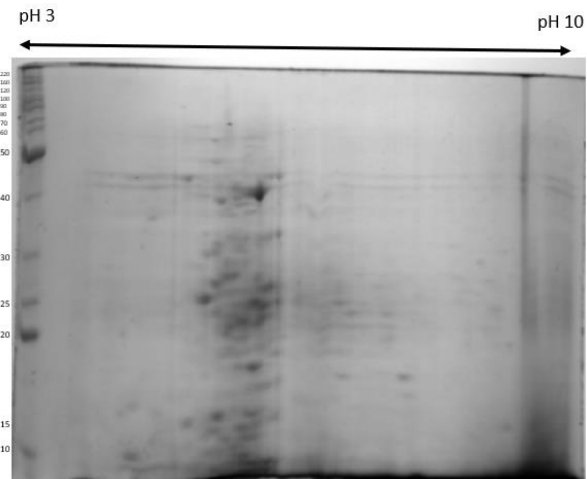


Figura 3 Perfil de proteínas 2-D 24 hpi

Conclusión

La infección de larvas de *S. frugiperda* por el baculovirus SfNPV-Ar tiene un rol importante en la regulación de proteínas. Los resultados obtenidos en este trabajo concuerdan con los obtenidos en etapas anteriores de este trabajo en donde por medio de macroarreglos se observó la expresión de genes, en donde de igual manera la mayoría de los genes que se encontraban a las 24 horas post-infección se regularon negativamente. En la fase siguiente del proyecto, se realizará la identificación de las proteínas aquí analizadas.

BIBLIOGRAFÍA

- Alonso Alvarez, R. (1991). Reseña histórica y aspectos bioecológicos del gusano cogollero del maíz *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith). In Memorias Seminario *Spodoptera frugiperda* (El gusano cogollero) en sorgo, maíz y otros cultivos. Zuluaga, J. L. Muñoz, G. (comp., ed.) Calí, Colombia 96p. Pag. 12-14.
- Andrews, K. L. (1988). Latin American Research on *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). Fla. Entomol. 71(4): 630-653.
- Caballero, P., López-Ferber, M., Williams, T. 2001. Los baculovirus y sus aplicaciones como bioinsecticidas en el control biológico de plagas. Editorial Phytoma. España. Universidad Pública de Navarra. p 517.
- CESAVEG. (2013). Reunión de trabajo nacional para definir estrategias de control de gusano cogollero. In: (CESAVEG), C. E. d. S. V. d. G. (ed).
- Del Rincón-Castro MC, Méndez-Lozano J, Ibarra JE. (2006) 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.
- 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* M nuclear polyhedrosis virus. Proceedings of the National Academy of Sciences, 91(8), 3224-3227.
- FAO. (2017). “El gusano cogollero del maíz en África”. <http://www.fao.org/3/a-i7470s.pdf> Fecha de consulta: 16/04/18
- Flores-Gallardo, F., Zanaella-Saenz, I. y Del Rincón-Castro, M. (2017). Análisis proteómico diferencial de la infección en larvas con el baculovirus SfNPV de *Spodoptera frugiperda* (lepidóptera: noctuidae). Jóvenes en la ciencia, 3(2), p.2201.
- Flores-Hueso, R. (2000). “Efecto de la variedad de maíz sobre el desarrollo y susceptibilidad de larvas de *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) a *Bacillus thuringiensis*”
- Miller, L. (1997). The Viruses: The Baculoviruses. New York: Plenum Press. 433 p.
- Murillo, A. (1991). Distribución, importancia y manejo del complejo *Spodoptera* en Colombia. In Memorias Seminario *Spodoptera frugiperda* (El gusano cogollero) en sorgo, maíz y otros cultivos. Zuluaga, J. L. Muñoz, G. (comp., ed.) Calí, Colombia 96p. Pag. 15-23.
- Pastrana, J. A. Y J. O. Hernandez. (1979). Clave de orugas de lepidópteros que atacan al maíz en cultivo. RIA. Serie 5. Patología Vegetal. v. XIV, n. 1 1978/79: 26-45.
- 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).
- SAGARPA (2017). Avance de Siembras y Cosechas Resumen nacional por estado. p.2. http://infosiap.siap.gob.mx:8080/agricola_siap_gobmx/AvanceNacionalCultivo.do Fecha de consulta: 17/04/2018.
- SIAP (2012) Cierre de la Producción Agrícola Maíz de Grano. México. Servicio de Información Agropecuaria y Pesquera. México. www.siap.gob.mx/ Fecha de consulta: 25/01/2014)