

Caracterización de baculovirus con actividad hacia *Spodoptera frugiperda* para producir maíz libre de insecticidas químicos.

Ma. Guadalupe González-Arredondo¹, Jonatan C. Rángel-Núñez¹, y M.C. Del Rincón-Castro.*^{1,2}

1 Posgrado en Biociencias, División de Ciencias de la Vida, Universidad de Guanajuato Campus Irapuato-Salamanca.

2 Departamento de Alimentos División de Ciencias de la Vida, Universidad de Guanajuato Campus Irapuato-Salamanca. *cdelrincon@ugto.mx

RESUMEN

El maíz es un grano básico de producción y consumo, se le puede considerar como un cereal de alta demanda, con un pronóstico mundial de 1,046 millones de toneladas para el 2018/ 2019. Su importancia económica, social y cultural, lo colocan en México como un cultivo representativo, consumiéndose en promedio per-capital 196.4 kg por año. Uno de los principales insecto plaga que puede causar daños económicos anualmente, es *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith), conocido como el gusano cogollero del maíz. En este trabajo se caracterizaron a nivel biológico y molecular 3 cepas nativas de baculovirus aisladas de este insecto y denominadas SfNPV. Las 3 cepas demostraron tener similitudes en su DNA, pero diferencias suficientes para concluir que se trata de aislados diferentes. Esto se corroboró primeramente mediante las diferencias encontradas en los patrones de fragmentos de restricción y posteriormente, al analizar 3 genes altamente conservados en las mismas, cuya secuenciación futura permitirá establecer el origen de estas cepas y poder relacionarlo con su efectividad para controlar a las poblaciones del gusano cogollero en las distintas partes del mundo.

Palabras clave: Maíz, Baculovirus, control biológico

ABSTRACT

Corn is a basic grain of production and consumption; it can be considered a high-demand cereal, with a world forecast of 1,046 million tons for 2018 / 2019. Its economic, social and cultural importance places it in Mexico as a representative crop, consuming an average per-capital 196.4 kg per year. One of the main insect pests that can cause economic damage annually is *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith), known as the fall armyworm. In this work, 3 native strains of baculovirus isolated from this insect and called SfNPV were characterized at the biological and molecular level. The 3 strains were shown to have similarities in their DNA but sufficient differences to conclude that they are different isolates. This was first corroborated by the differences found in the patterns of restriction fragments and later, by analyzing 3 highly conserved genes in them, whose future sequencing will allow to establish the origin of these strains and to be able to relate it to their effectiveness to control the populations of the Fall Armyworm in different parts of the world.

Keywords: Corn, Baculoviruses, biological control

Área: Microbiología y Biotecnología

INTRODUCCIÓN

El maíz es un grano básico de producción y consumo, se le puede considerar como un cereal de alta demanda, con un pronóstico mundial de 2,767 millones de toneladas para el 2020 (FAO, 2021). Su importancia económica, social y cultural, lo colocan en México como un cultivo representativo, consumiéndose en promedio per-capital 196.4 kg por año (SADER, 2021).

Sin embargo, para el cultivo de maíz, los insectos representan una limitante de producción, afectando de manera directa la calidad de grano que se desea obtener durante el proceso de producción, lo que repercute en carácter económico (Hernandez *et al*, 2019).

Uno de los principales insecto plaga que puede causar daños económicos anualmente, es *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith), conocido como el gusano cogollero del maíz, insecto polífago que se encuentra en el grupo de las plagas constantes, causando severas pérdidas si no se controla oportunamente (Región, 2018). Por ello se han implementado diferentes estrategias como método de control. Una de las más importantes para el manejo de la plaga es el uso de agentes químicos, pero se optan por nuevas alternativas debido a que el uso excesivo de estos ha provocado resistencia, tanto en *Spodoptera frugiperda*, como en plagas secundarias (Assefa y Ayalew, 2019).

Las alternativas como agentes de control biológico las constituyen los enemigos propios del insecto, entre ellos se encuentran una gran clasificación de microorganismos entomopatógenos (Assefa y Ayalew, 2019). Uno de los biosistemas elementales más usados son los baculovirus, específicamente en el caso de *Spodoptera frugiperda*, los virus que la infectan presentan una morfología en su cuerpo de oclusión a poliedrosis nuclear (SfNPV), perteneciente al género *Alphabaculovirus*. (SfMNPV), están envueltos con un genoma de ADN circular de doble cadena de aproximadamente 130 kb. En este trabajo se estudió a nivel biológico y molecular a 3 Cepas nativas de Baculovirus SfNPV con virulencia hacia *Spodoptera frugiperda*, para poder establecer cuales son sus relaciones y determinar cuál de ellas es la más efectiva para el control de este insecto.

MATERIALES Y MÉTODOS

Cría del insecto

El insecto utilizado para la investigación fue obtenido a partir de la cría de *S. frugiperda* en el Laboratorio de investigación ubicado en la División de ciencias de la Vida de la Universidad de Guanajuato. La colonia de insectos se mantuvo bajo condiciones de insectario a 28°C, con un fotoperiodo de 12h luz, 12h en oscuridad y una humedad relativa de 80%. Los adultos se mantuvieron en bolsas de papel estrasa y se alimentaron con una solución de agua destilada con miel de maíz al 10%, una vez que ovipositaron, los huevecillos se colocaron en dieta artificial en cajas Petri hasta que de los huevecillos eclosionan las larvas. Estas se mantuvieron en las cajas hasta llegar al segundo estadio, y en el tercer estadio se mantenían en recipientes de 30 mL hasta su estado de pupa.

Amplificación de los baculovirus SfNPV.

La amplificación de las cepas virales se realizó en cajas Petri, las cuales fueron inoculadas con 200 μL de una solución de CO's a una concentración de 1×10^5 CO/ml y se colocaron de 15 a 17 larvas de 2° y 3° estadio por caja, las que fueron incubadas por 5 días. Las larvas se recabaron y se molieron en un mortero de porcelana estéril, con 2ml de agua destilada estéril. La molienda se filtró con una doble malla de organza, el filtrado se centrifugo a 13000 rpm y se puso a 4 °C durante 15 minutos (Centrifuga Hermle, Z326k), posteriormente el precipitado se lavó en repetidas ocasiones con sodio-dodecil- sulfóxido (SDS) al 0.5% y 2 lavados más con Agua destilada Estéril (ADE). La pastilla obtenida se resuspendió en ADE, para almacenar las muestras a 4 °C. Una vez obtenida la amplificación viral se procedió a realizar el conteo de los CO's y así obtener la concentración de estos, utilizando un hematocitómetro.

Extracción de ADN viral.

Los viriones purificados se resuspendieron en 400 μl de amortiguador de reacción para proteinasa K (0,01M Tr is; 0,005M EDTA; 0,5% SDS) y se incubarán por 15min a 60°C. Posteriormente se adicionaron 100 μl de proteinasa K (1mg·ml⁻¹) para una concentración final de 200 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, se incubaron por 2h a 37°C en baño de María. Luego se adicionaran 500 μl de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1), mezclando suavemente por inversión y se centrifugara por 5min a 14000rpm; se colectara la fase acuosa y el ADN se precipitara por centrifugación con 500 μl de isopropanol por 10min a 4°C.

Corte con enzimas de restricción.

Para la digestión de 1 μg de ADN en un volumen final de 20 μl , se añadieron 2 μl de buffer 10X, 1 μl de la enzima seleccionada y se completó la reacción a 20 μl con ADE. Posteriormente se incubó la reacción a 37°C por 3 hrs. Las muestrase analizaron en geles de agarosa al 1% durante 18 hrs, y se analizaron en el fotodocumentador.

Determinación de la concentración letal media CL50.

Con el virus purificado se preparó una suspensión viral y se determinó la concentración mediante recuento en cámara de Neubauer. A partir de esta suspensión se prepararon seis concentraciones con un factor de dilución (.2 a .6) dependiendo de la mortalidad larvaria. Se plaqueo en superficie de dieta artificial y se colocaron 10 larvas neonatas de *S. frugiperda* por caja. Al cabo de 5 días se registró la mortalidad de las larvas, y los resultados de mortalidad fueron sometidos a un análisis Probit.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Mantenimiento de la colonia. Para el mantenimiento de la colonia de *S. frugiperda*, se obtuvo una producción mensual de las 4 etapas fenológicas de la colonia Pupas, Larvas, Huevos y Adultos (Figura 1). Las masas de huevecillos obtenidas fueron de diferentes densidades, se obtuvo una población promedio de 1300 larvas de los diferentes estadios alimentadas con dieta artificial. En torno a las pupas se cuantificaron alrededor de 350 y 300 Adultos en bolsas de papel estraza.



Figura 1. Mantenimiento de la colonia de *S. frugiperda* en sus 4 etapas fenológicas **A:** huevos , **B:** larvas de distintos estadios, **C:** pupas, y **D:** bolsas de papel estraza con adultos.

Amplificación de virus y sintomatología. La sintomatología de infección en las cepas de Nucleopoliedrovirus (NPV) ocasionó en las larvas de *S. frugiperda* el ablandamiento del tegumento a los 5 días post infección, pérdida de apetito, movilidad lenta, hasta la ruptura del tegumento, lo que coincide con sintomatologías similares a lo reportado por otros autores para las larvas de esta especie infectadas con VPN (Ordoñez-García et al., 2019).

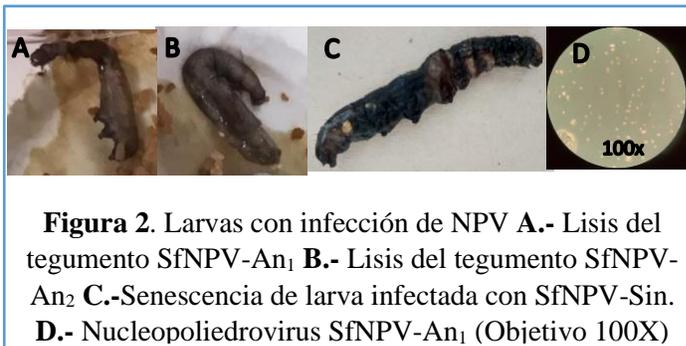


Figura 2. Larvas con infección de NPV **A.-** Lisis del tegumento SfNPV-An₁ **B.-** Lisis del tegumento SfNPV-An₂ **C.-** Senescencia de larva infectada con SfNPV-Sin. **D.-** Nucleopoliedrovirus SfNPV-An₁ (Objetivo 100X)

En la figura 2 se puede observar la lisis del tegumento que conlleva a la muerte de las larvas en un tiempo aproximado de 8 días para larvas tratadas con NPV nativos (SfNPV-An₁, SfNPV-An₂ y SfNPV-Sin). Algunos estudios demuestran que la lisis del tegumento en larvas es inducida por catepsina y quitinasa codificadas por baculovirus principalmente NPV. (Caballero, et al., 2001 ; Kang, et al., 1998).

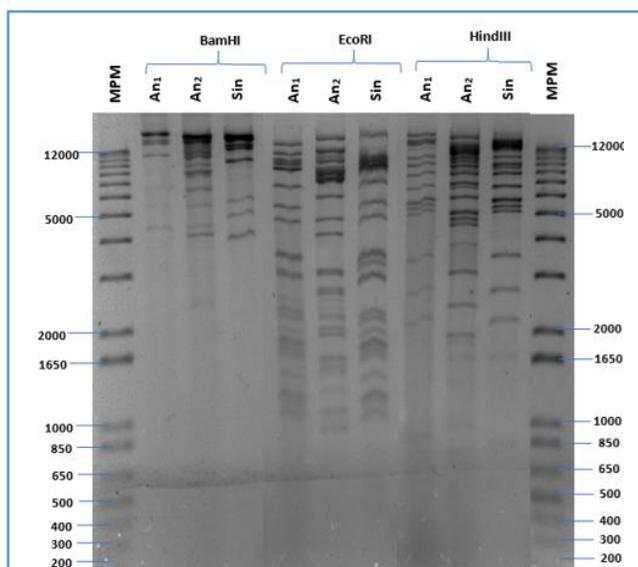


Figura 3. Perfiles de restricción del ADN de SfNPV-An₁, SfNPV-An₂ y SfNPV-Sin, digerido con las endonucleasas de restricción *Bam*HI (Carril 2-4) *Eco*RI (Carril 5-7) y *Hind*III (Carril 8-10) Marcador de peso molecular (Carril 1 y 11)

Patrones de Restricción del DNA. Los perfiles de restricción demostraron que las cepas presentan similitudes entre ellos lo que indica que se trata de aislados pertenecientes a la misma familia (Baculoviridae) (Murillo, et al. 2000), pero también se pudieron observar fragmentos únicos que no aparecen en todas las cepas.

La digestión de los tres NPV con la enzima *Hind* III generó tres bandas de ~5000pb, y otros tres fragmentos entre las 4000 y las 2000 pb. Patrones similares fueron obtenidos por Ordoñez-García et al. (2020) para tres NPV aislados de *Spodoptera frugiperda*.

Por otro lado, los perfiles de restricción con las diferentes enzimas (Figura 3) mostraron que con la enzima *Bam* HI en el aislado SfNPV-An₁, SfNPV-An₂ y SfNPV-Sin se obtuvieron un total de 9, 11 y 7 fragmentos respectivamente. En el caso de la enzima *Eco* RI con las cepas SfNPV-An₁, SfNPV-An₂ y SfNPV-Sin se obtuvieron un total de 18, 21 y 17 fragmentos respectivamente. Por último, los fragmentos generados para *Hind* III en SfNPV-An₁, SfNPV-An₂, SfNPV-Sin

encontramos 13, 18 y 15 fragmentos respectivamente. Lo que nos podría indicar que pequeñas diferencias en el genoma de los baculovirus podrían causar una diferencia significativa en su patogenicidad y virulencia (Behle & Popham, 2012).

Amplificación de genes conservados.

Mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se procedió a la amplificación de tres de los 38 genes conservados en los baculovirus. Debió a que estos 38 genes centrales se han identificado en todos los genomas de baculovirus. Rohrmann, GF (2019). Se detectaron dos genes de expresión tardía (*lef8* y *lef9*) y el gen que codifica para la proteína de envoltura poliedrina (*pol*), adicionalmente que estos 3 genes son de gran utilidad para la inferencia filogenética basada en las distancias genéticas (Jehle et al., 2006). Como podemos observar en la Figura 8, los carriles 1, 2 y 3 muestran los amplicones para el gen *lef8*, en donde su tamaño aproximado es de ~550 pb. En el caso del gen de expresión tardía *lef9* los carriles 4, 5 y 6 muestran amplicones aproximados de ~200pb, y para el gen que expresa la poliedrina (*pol*) los carriles 7, 8 y 9, nos muestran amplicones alrededor de ~540pb. Lo que coincide con el tamaño de banda esperado para los cebadores diseñados por Zanella I,2019.

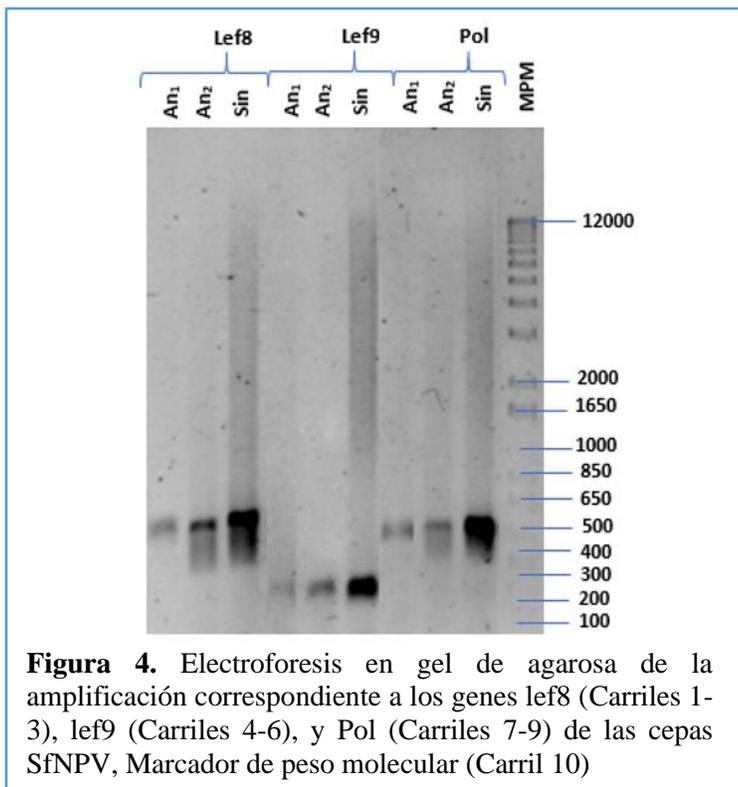


Figura 4. Electroforesis en gel de agarosa de la amplificación correspondiente a los genes *lef8* (Carriles 1-3), *lef9* (Carriles 4-6), y *Pol* (Carriles 7-9) de las cepas SfNPV, Marcador de peso molecular (Carril 10)

Concentración Letal Media (CL₅₀). Para determinar la concentración letal media (CL₅₀) se utilizó el modelo Probit para calcular la relación dosis-mortalidad de los aislamientos de NPV nativos sobre larvas neonatas de *S. frugiperda* a los 5 días post-infección ayudándonos a validar la concentración en la mortalidad de la cepa.(Tabla 1).

Tabla 1. Comparación de CL₅₀ y datos estadísticos de bioensayos globales de cepas de baculovirus SfNPV, con actividad hacia *Spodoptera frugiperda*

Cepa	CL ₅₀ estimada CO/ml	LFS	LFI	Cociente LFS/LFI	P	X ²	(%)
SfNPV-Sin	4.049x10 ⁶	167179.6	1157349.4	0.141717	1.5641	1.1831	1
SfNPV-An1	4.059x10 ⁴	104094	158307	.657545	1.5991	.113704	3
SfNPV-An2	2.987x10 ⁵	757206	117838	4.858395	1.086	.1993637	1

CL₅₀: concentración letal media, LFS: Limite Fiducial Superior, LFI: Limite Fiducial Inferior P:pendiente, X²ji cuadrada

Las cepas SfNPV-An₁ y SfNPV-An₂ demuestran una buena efectividad con una CL₅₀ de 4.059 x10⁴ y 2.987 x10⁵ respectivamente, las cuales fueron menores que la mencionada por Gómez et al., (2010) para el aislamiento NPV001 de *S. frugiperda* proveniente de Colombia. Este autor cuantificó un valor de 7,1 x 10⁵ CI/mL, lo que indica que dicho aislamiento viral es menos patogénico en larvas neonatas de *S. frugiperda* que nuestros aislados. Comparando la CL₅₀ de la cepa nicaragüense de Escribano et al. (1999) con un valor de 1,2 x 10⁷ CI/mL, nuestra cepa de Sin es 3 veces más virulenta con una Cl₅₀ de 4.049x10⁶. Esta variación puede estar relacionada con diferencias genéticas entre los aislamientos virales (Simon et al., 201). Así los baculovirus probados en este estudio nos demuestran que representan una alternativa potencial para el control de *Spodoptera frugiperda* en cultivos de maíz, como lo proponen otros autores.

CONCLUSIÓN

El análisis de la morfología de los cuerpos de oclusión y la sintomatología presentada, nos dan un indicio de cepas que pertenecen a NPV de *S. frugiperda*. Los perfiles de restricción de los tres aislamientos nativos (SfNPV-An₁, SfNPV-An₂ y SfNPV-Sin) presentaron diferencias entre ellos, por lo cual se les consideraron como diferentes especies, y diferentes efectividades para matar. La caracterización biológica de los aislados demostró su efectividad para el control de una plaga de importancia agronómica (*S. frugiperda*), siendo la cepa SfNPV-An₁ la más virulenta.

BIBLIOGRAFÍA

- Assefa, F. and Ayalew, D. 2019. Status and control measures of fall armyworm (*Spodoptera frugiperda*) infestations in maize fields in Ethiopia: A review. *Cogent Food & Agriculture*, 5(1), 11-68
- Behle, R. W., & Popham, H. J. (2012). Laboratory and field evaluations of the efficacy of a fast-killing baculovirus isolate from *Spodoptera frugiperda*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 109(2), 194– 200.
- Caballero, P., Williams, T., & López-Ferber, M. (2001). Estructura y clasificación de los baculovirus. In P. Caballero, T. Williams, & M. López-Ferber (Eds.), *Los baculovirus y sus aplicaciones como bioinsecticidas en el control biológico de plagas* (pp. 15– 46). Valencia Spain: Universidad Pública de Navarra-Phytoma.
- Correal, C. E., Prado, A. M. C., & Rivero, L. V. 2009. Efecto de la infección con granulovirus en el desarrollo de *Tecia solanivora* (Lepidoptera: Gelechiidae). *Revista Facultad Nacional de Agronomía- Medellín*, 62(1), 4797.
- Cubillos, G. P. B., Gómez, J., Cuartas, P., León, G., & Rivero, L. F. V. 2014. Caracterización morfológica, biológica y genética de un aislamiento colombiano de granulovirus de *Erinnyis ello* (L.) (Lepidoptera: Sphingidae). *Revista Colombiana de Biotecnología*, 16(2), 129-140.
- Escribano, A., Williams, T., Goulson, D., Cave, RD, Chapman, JW y Caballero, P. (1999). Selección de un nucleopoliedrovirus para el control de *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae): comparación estructural, genética y biológica de cuatro aislamientos de las Américas
- FAO Organización de las naciones unidad para la alimentación y la agricultura (2021) Situación Alimentaria mundial Obtenido de <http://www.fao.org/worldfoodsituation/csdb/es/>
- Gómez Valderrama, J. A., Guevara Agudelo, E. J., Barrera Cubillos, G. P., Cotes Prado, A. M., & Villamizar Rivero, L. F. (2010). ISOLATION, IDENTIFICATION AND CHARACTERIZATION OF NATIVE NUCLEOPOLYHEDROVIRUS OF SPODOPTERA FRUGIPERDA IN COLOMBIA.
- Hernández-T., Belmán., Espinoza. D., Rodríguez., Rodríguez. H., Gomez.J.M., Soto Pérez. A., & Hernández., & Ortiz. (2019). Importancia del control biológico de plagas en maíz (*Zea mays*L.). *Revista Mexicana de Ciencias*
- Jehle J, Martin Lange , Hualin Wang, Zhihong Hu, Yongjie Wang, Rudiger Hauschild, “Molecular identification and phylogenetic analysis of baculoviruses from Lepidoptera” (2006), *Archives of Virology*
- Kang, W., Tristem, M., Maeda, S., Crook, N. E., & O'Reilly, D. R. (1998). Identification and characterization of the *Cydia pomonella* granulovirus cathepsin and chitinase genes.
- Murillo, R., Lipa, J. J., Muñoz, D., Amate, J., Barranco, P., Cabello, T., & Caballero, P. 2000. Caracterización bioquímica de un nucleopoliedrovirus de *Chrysodeixis chalcites* autóctono de España. *Bol*
- OTCA Oficina de Tratados Comerciales Agrícolas (2018). FAO: Cosecha mundial de cereales 2018/2019 Obtenido de: <http://otca.gob.do/fao-cosecha-mundial-de-cereales-2018-2019/>
- Ordóñez-García, M., Rios-Velasco, C., Ornelas-Paz, J. D. J., Bustillos-Rodríguez, J. C., Acosta-Muñiz, H., Berlanga-Reyes, D. I., & Gallegos-Morales, G. (2019). Molecular and Morphological

characterization of multiple nucleopolyhedrovirus from Mexico and their insecticidal activity against *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). *Journal of Applied Entomology*, 144(1-2), 123-132.

Pidre, M. L., Sabalette, K. B., Romanowski, V., & Ferrelli, M. L. (2019). Identification of an Argentinean isolate of *Spodoptera frugiperda* granulovirus. *Revista Argentina de microbiología*, 51(4), 381.

Rohrmann, GF (2019). *Biología molecular de baculovirus*.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK543458/>

SADER secretaria de Agricultura y Desarrollo Rural. (2021). *Expectativas Agroalimentarias 2021*. Obtenido, de: <http://infosiap.siap.gob.mx/gobmx/Brochure%20Expectativas%202019.pdf>

Simón, O., Palma, L., Beperet, I., Muñoz, D., López-Ferber, M., Caballero, P., & Williams, T. (2011). Sequence comparison between three geographically distinct *Spodoptera frugiperda* multiple nucleopolyhedrovirus isolates: Detecting positively selected genes. *Journal of Invertebrate Pathology*, 107(1), 33– 42.