

Control biológico de insecto plagas mediante bioinsectidas virales para la producción de alimentos inocuos

Biological control of insect pests using viral bioinsecticides to produce safe foods

Ana Pamela Fuerte Aguilar¹, Hannia Jocelyn Franco Robles¹, María Paula Witrigo Cruz², Francisco Antonio Juárez Frías³, María Guadalupe Jasso Toledo³, Wendy Nayeli Linares Pantoja³, Jonatan C. Rangel Nuñez³, Ma. de los Ángeles Bivián Hernández³, Ma. Cristina Del Rincón Castro³

¹Licenciatura en Ingeniería en Biotecnología, División de Ciencias de la Salud e Ingenierías, Campus Celaya-Salvatierra, ²Licenciatura en Ingeniería en Agronomía, División de Ciencias de la Vida, Campus Irapuato-Salamanca, ³Licenciatura en Ingeniería en Alimentos, División de Ciencias de la Vida, Campus Irapuato-Salamanca.

ap.fuerteaguilar@ugto.mx¹, hj.francorobles@ugto.mx¹, mp.witrigocruz@ugto.mx², fa.juarezfrias@ugto.mx³, mg.jassotoledo@ugto.mx³, wn.linarespantoja@ugto.mx³, jc.rangelnunez@ugto.mx³, mdla.bivianhernandez@ugto.mx³, cdelrincon@ugto.mx³

Resumen

La demanda a nivel mundial de alimentos continúa siendo una constante para la supervivencia del hombre. El agotamiento del agua y el empobrecimiento del suelo dificulta la extensión de mayores áreas de producción, así mismo, la problemática causada por insectos plaga que afectan a los cultivos, dificulta la producción agrícola. El maíz es el cereal más cultivado en el mundo y en México, la fuente principal de la dieta básica del mexicano. Este es blanco del ataque de diversas plagas, entre las principales se encuentra el gusano cogollero del maíz *Spodoptera frugiperda* quien puede causar reducciones en la producción de hasta un 40%. Una alternativa para el control de esta plaga y para la producción inocua del maíz es el uso de agentes de control microbiano, tales como los virus entomopatógenos, particularmente los Baculovirus, los cuales son específicos de insectos, no contaminan el medio ambiente, ni al hombre. En este trabajo se caracterizó una nueva cepa nativa de baculovirus y se comparó con 3 cepas nativas aisladas en México, todas con actividad hacia *S. frugiperda*, estableciendo sus patrones de fragmentos de restricción, identificación de genes de virulencia y determinación de los patrones de proteínas de los viriones derivados de oclusión, para determinar la identidad de la cepa y su posible potencial para utilizarse en el control biológico de esta plaga en cultivos de maíz en México.

Palabras clave: baculovirus; control biológico, plaga, insectos, alimentos.

Introducción

El maíz es el cereal más ampliamente distribuido a nivel mundial, siendo los Estados Unidos y China los principales productores teniendo entre el 37 y 21% de la producción a nivel mundial. En el 2022 la producción mundial de maíz fue de 1 161.86 millones de toneladas, mientras que México obtuvo una producción de 27 millones de toneladas métricas, distribuidas entre maíz blanco y maíz amarillo (SADER, 2022). En México los principales estados productores son: Sinaloa, Jalisco, Michoacán, Estado de México y Guanajuato (SADER, 2023). En el Estado de Guanajuato en el ciclo agrícola primavera-verano 2021 se estableció una superficie de riego de 150 mil hectáreas, en la que se obtuvo una producción de 1.7 millones de toneladas (SIAP, 2021).

El gusano cogollero del maíz, *Spodoptera frugiperda* pertenece al Reino: Animalia, Filo: Arthropoda, Clase: Insecta, Orden: Lepidoptera, Familia: Noctuidae (Hauze, 2020). Es una plaga económicamente importante, nativa de las Américas, altamente polífaga, migratoria y destructiva de cultivos. Se alimenta de más de 350 especies de plantas, incluidos cultivos básicos como: maíz, arroz, sorgo y soja (Paredes-Sánchez *et al.*, 2021). Es una plaga de climas tropicales y subtropicales, donde el insecto completa su ciclo biológico a lo largo del año. En áreas templadas se comporta como una plaga estacional, y no sobrevive a los fríos invernales dado que carece de mecanismos de defensa (CNRF, 2021). Debido a esto la plaga prevalece en América del Norte, América del Sur, África, Asia, Oceanía, teniendo baja incidencia en Europa debido a las condiciones del clima.

Los virus de insectos denominados baculovirus pertenecen a la familia Baculoviridae, poseen un genoma de ADN doble cadena, circular, superenrollado de entre 80 y 180 kpb y codifica entre 90 y 180 genes, infectan en gran medida a larvas de insectos lepidópteros, muchas de ellas de importancia agrícola (Salvador et al., 2021). Esta familia se divide en cuatro géneros: *Alphabaculovirus* (nucleopoliedrovirus o NPV), *Betabaculovirus* (granulovirus o GV), ambos géneros infectan a especies de insectos Lepidópteros, *Gammabaculovirus* (NPV) que infectan a especies de Himenópteros y los *Deltabaculovirus* (NPV) que infectan a especies de Dípteros (Hussain et al., 2021). Estos virus poseen una estructura de protección denominada cuerpo de oclusión (CO), compuesta de una proteína llamada poliedrina y/o granulina. Los CO de los GV miden entre 120-300 nm x 300-500 nm, mientras que los NPV presentan un diámetro de 0.5-5 µm. El genoma viral está empaquetado en nucleocápsides contenidas en viriones en forma de bastón, que miden entre 30-60 nm x 260-360 nm para GV y entre 40-140 nm x 250-400 nm para NPV (Eberle et al., 2012).

Los baculovirus pueden infectar a más de 700 especies de insectos de distintos órdenes, tales como Lepidóptera, Díptera e Himenóptera, y después del grupo de las bacterias, son el segundo agente de control biológico de plagas más utilizados como bioinsecticidas, debido a su alta especificidad hacia sus insectos huésped y alta persistencia en el medio ambiente. Los baculovirus producen infecciones sistémicas en los diferentes estadios larvales, ya que son capaces de replicarse en diferentes tejidos de los insectos, tales como: el tejido graso, intestino medio, y sistema nervioso. Lo anterior mediante dos etapas de infección, en la primera etapa se infecta el intestino medio y se produce el fenotipo de viriones gemados, que son los causantes de la segunda etapa de infección, en donde los órganos y tejidos del insecto son infectados, en ellos se producen los viriones ocluidos y se forman los nuevos CO (Gutiérrez Arrellano et al., 2021). Las larvas infectadas con baculovirus padecen la enfermedad de las copas de los árboles, ya que éstas suben a las partes más altas de las plantas que están consumiendo, se fijan a ellas y posteriormente ocurre una degradación del exoesqueleto del insecto, liberando así los CO al ambiente, para iniciar un nuevo ciclo de infección cuando otro insecto sano consuma el alimento donde quedaron depositados estos CO (Llopis-Giménez et al., 2020).

Ejemplos de casos exitosos del uso de baculovirus a nivel de campo para el control de insectos plaga son: el uso del virus AgMNPV (*Anticarsia gemmatalis nucleopoliedrovirus*) para controlar poblaciones de *Anticarsia gemmatalis* en cultivos de frijol de soya en Brasil, al ser aplicado en casi 2 millones hectáreas; en China el virus HaSNPV (*Helicoverpa armígera nucleopoliedrovirus*) ha sido aplicado desde 1993 para controlar las poblaciones de *Helicoverpa armígera* que afecta cultivos de algodón, soya, maíz y tomate; otros casos reportados involucran principalmente a Estados Unidos con la aplicación de virus AcMNPV (*Autographa californica nucleopoliedrovirus*) y AfMNPV (*Anagrapha falcifera nucleopoliedrovirus*) para el control de especies de *Helicoverpa*, *Heliothis*, *Spodoptera* y otros lepidópteros; por otro lado, en Alemania se ha reportado el uso de virus AdorGv (*Adoxophyes orana granulovirus*) en cultivos frutales contra *Adoxophyes orana* y por último, en España y Francia, se han utilizado baculovirus contra *Cydia pomonella*, *Mamestra brassicae*, *Lobesia spp.* y *Plutella spp.* (Grzywacz, 2017). En el laboratorio de Biotecnología Alimentaria y Agrícola se cuenta con una colección de cepas de baculovirus tanto nativas como exóticas, aisladas de diferentes países de América, que ya han demostrado tener una alta virulencia hacia el gusano cogollero del maíz *S. frugiperda*, siendo 4 de ellas nativas de México. En este trabajo se reporta la caracterización biológica de una nueva cepa viral mediante sus patrones de fragmentos de restricción, el análisis por PCR de sus genes de virulencia y la identificación de las proteínas estructurales de los viriones que las conforman, así como su comparación con otras cepas nativas que han mostrado potencial para el control en campo del gusano cogollero del maíz.

Materiales y Métodos

Cepas de virus

Se trabajó con 4 cepas de baculovirus denominadas SfNPV-An1, SfNPV-An2, SfNPV-Gto y SfNPV-Acámbaro, aisladas todas en México, a partir de muestras de suelos e insectos infectados de *S. frugiperda*, las primeras dos en el Estado de Coahuila y las últimas dos en el Estado de Guanajuato.

Mantenimiento de la colonia de *S. frugiperda*

Para el desarrollo del proyecto fue necesario mantener una población de insectos a nivel de laboratorio, para ello las larvas del gusano cogollero *S. frugiperda* se incubaron en una cámara Lumistell con

un 60% de humedad relativa, 25 °C y 16:8 horas de luz: oscuridad dentro de bolsas de papel estraza. Las palomillas adultas se alimentaron con miel de maíz al 10%. Los huevecillos se colocaban en una caja Petri con dieta artificial para *S. frugiperda* (Agua destilada 1 000 mL, agar bacteriológico 12.5 g, maíz 120 g, levadura 50 g, germen de trigo 5 g, polvo de espiga de maíz 25 g, ácido sórbico 2.5 g, ácido ascórbico 5 g, metil paraben (MPB) 3.125 g, mezcla de sales 8.75 g, frijol soya 62.5 g, formaldehído al 37% 3.125 mL, antibiótico 0.75 mg y mezcla de vitaminas 18.75 g) hasta que eclosionaron. Debido a que *S. frugiperda* presenta canibalismo, fue necesario individualizarlas al llegar al 3^{er} instar larval en vasos de plástico con tapa y dieta artificial, hasta que estas pasaran al estado de pupas y posteriormente se devolvieran a las bolsas de papel estraza.

Producción de CO's de baculovirus en larvas de *S. frugiperda*

Los CO's de los baculovirus de las distintas cepas SfNPV, se amplificaron en larvas de *S. frugiperda* de 3^{er} instar. La infección de 100 larvas por cepa se realizó mediante la inoculación de placas de Petri que contenían dieta artificial, utilizando una concentración de 1×10^6 CO/mL. Las cajas se incubaron por 5-7 días y se recolectaron las larvas muertas en tubos Falcón de 15 mL. Posteriormente se maceraron las larvas con 2 mL de SDS 0.5% hasta homogeneizar, se filtraron con organza y se recolectó el filtrado en un tubo de policarbonato. Se agregaron 10 mL de SDS 0.5%, se centrifugó a 10 000 rpm/10 min y se desechó el sobrenadante, esto se repitió 4 veces, una vez terminados los lavados se resuspendió la pastilla en 3 mL de agua destilada estéril (ADE). Estos CO se purificaron por gradientes continuos de sacarosa del 66 al 40% peso/peso (P/P) a 24 000 rpm por 1.5 horas en una ultracentrífuga Beckman Coulter (XPN-100), la banda resultante se colectó con una pipeta Pasteur y se colocó en tubos de policarbonato, se le agregaron 10 mL de ADE, se centrifugaron a 10 000 rpm/10 minutos, se desechó el sobrenadante y se repitió el proceso 3 veces más, finalmente la pastilla se resuspendió en 3 mL de ADE y se contó el inóculo en una cámara de Neubauer, para lo cual se hicieron diluciones 1:10 y 1:100 de los diferentes virus en ADE, de estas se colocaron 10 μ L en la cámara de Neubauer, donde se realizó el conteo en 5 cuadrantes, obteniendo un promedio de CO por cuadrante y se obtuvo la concentración de CO presentes mediante la fórmula: $Concentración = \bar{x} CO \cdot 2.5 \times 10^5 \cdot (factor\ de\ dilución)$

Extracción de DNA de los CO's amplificados en *S. frugiperda*.

Para extraer el DNA de las cepas de virus SfNPV, se tomaron 100 μ L de cada cepa viral purificada y se centrifugaron en una Microcentrífuga Thermo Scientific (Sorvall Legend Micro 21) a 14 000 RPM por 10 min. Posteriormente se agregaron 100 μ L de álcali (0.1M de Na_2CO_3 y 0.1M de $NaCl_2$, pH= 11). Se dejó reposar la mezcla durante 5 min, se adicionaron 400 μ L de Buffer p/proteinasas k (0.01M Tri y 0.005M EDTA con 0.5% SDS, pH= 8.0) y 10 μ L de enzima proteasa K (10 mg/mL). La reacción se incubó a una temperatura de 60 °C durante 30 min, se agregaron 500 μ L de fenol/cloroformo/alcohol isoamílico 25:24:1 y se centrifugó a 14 000 rpm por 10 min. Posteriormente se agregaron 500 μ L de isopropanol y se centrifugó bajo las mismas condiciones, se desechó el sobrenadante y se lavó la pastilla con 500 μ L de etanol absoluto, esta se centrifugó a 14 000 rpm por 5 min, pasado este tiempo se dejó secar a temperatura ambiente la pastilla y se agregaron 30 μ L de TE para disolver el ADN, el cual se analizó en un gel de agarosas al 0.8% en una cámara de electroforesis (Mini-Sub® Cell GT de BioRad) a 90 V por 30 min, este se analizó en un fotodocumentador Doc™ EZ System - Bio-Rad. Por último, se analizó la pureza y concentración del DNA en el NANODROP.

Análisis de patrones de fragmentos de restricción del genoma de las cepas virales

Se analizó la identidad de cada cepa viral usando las enzimas de restricción *EcoRI* y *HindIII*, para lo cual se preparó una reacción de: 1 000 μ g de ADN de la cepa viral, 2 μ L del buffer de reacción, 1 unidad de la enzima de restricción y el volumen se completó a 20 μ L con agua destilada estéril, posteriormente esta reacción se incubó a 37 °C por 3 horas, pasado ese tiempo se realizó una electroforesis en un gel de agarosa al 1% a 20 volts por 18 horas. Los resultados se observaron en un fotodocumentador Gel Doc™ EZ Imagen, BioRad.

Análisis de los genes de virulencia de las cepas de baculovirus aislados de *S. frugiperda*

Se analizaron algunos genes específicos implicados en la virulencia de las diferentes cepas de SfNPV con los oligonucleótidos descritos en la Tabla 1. Estos fueron los genes *pif-1*, *pif-2*, *pif-3*; *iap-1*, *iap-2*, *iap-3*; *egt* y *vfgf* (Rodríguez-Castillo *et al.*, 2023). Para realizar los PCR de los genes *pif 1*, *2* y *3*; *iap 2* y *3*; *egt* y *vfgf*, se utilizaron 38.3 μ L de agua destilada estéril (ADE), 5 μ L, de buffer de reacción para la enzima

TaqDNA polimerasa, 10x (MgCl₂ 2.5 µL), 1 µL de dNTP's, 1 µL del oligonucleótido directo, 1 µL del oligonucleótido reverso, 0.2 µL de Taq DNA polimerasa (1 unidad), y 1 µL del DNA de cada cepa viral. Las condiciones del PCR para los genes *pif1*, *pif2*, *iap2* y *vfgf*, fueron de 95 °C 3 min, 30 ciclos de 95 °C por 30 segundos (s), 50 °C 45 s, 72 °C 2 min y un ciclo final de 72 °C 5 min. Para los genes *iap3*, *pif3* y *egt* se realizaron 35 ciclos bajo las mismas condiciones pero con una temperatura de alineamiento de 55 °C por 30 s. Se agregaron las cantidades de reactivos anteriormente mencionadas para cada gen en tubos para PCR. Posteriormente se colocaron en el termociclador T100 Thermal Cycler bajo las condiciones indicadas. Transcurrido el tiempo se tomó 1 µL de cada muestra y se mezcló con 1 µL Orange G y se corrió en una cámara de electroforesis a un voltaje de 90 por 30 min, el gel se analizó en un fotodocumentador Gel Doc™ EZ Imagen, BioRad.

Tabla 1. Oligonucleótidos usados para los genes de virulencia

Oligonucleótido	Secuencia	Oligonucleótido	Secuencia
<i>pif-1</i> directo	ATTCGGTTCTGACGAGAT	<i>iap-3</i> directo	GCAATCGTTTGAAGATCGACT
<i>pif-1</i> reverso	CGATATGTGGTGGTACGT	<i>iap-3</i> reverso	ATAGTACAATTGATGAACGC
<i>pif-2</i> directo	AGGCGTACAATGAAACGG	<i>egt</i> directo	ATGAACGGTTGCTTTGGTG
<i>pif-2</i> reverso	CTAAACCGTTACCCGACG	<i>egt</i> reverso	CCCATAGTTTCAAAGTTTTTCAGC
<i>pif-3</i> directo	TGCCTTCATCGTCGATATACG	<i>vfgf</i> directo	CAATTTTCTCTGGTCGCA
<i>pif-3</i> reverso	TGGATCTAGCCAACGCG	<i>vfgf</i> reverso	ATTCTTTGCAGCCACCAGC
<i>iap-2</i> directo	CTGGAACACGTATGATCTCGC		
<i>iap-2</i> reverso	CAGACTTTGCATCGTTTGGC		

(Rodríguez-Castillo et al., 2023)

Análisis de proteínas de los CO's de las cepas SfNPV por SDS-PAGE

Para obtener el perfil de proteínas de las cepas analizadas se usaron 2x10⁸ CO's por cepa viral, estos se centrifugaron a 14 000 rpm por 10 minutos en una Microcentrifuga Thermo Scientific (Sorvall Legend Micro 21). Posteriormente se retiró el sobrenadante y la pastilla se resuspendió en 200 µL de Alkali (0.1M de Na₂CO₃ y 0.1M de NaCl₂, pH= 11), la solución se dejó reposar a temperatura ambiente por 10 minutos, se centrifugó a 10,000 rpm por 10 minutos y se colectó el sobrenadante. De éste, se tomaron 20 µL y se mezclaron con 5 µL de solución de Laemmli (500 µL de Tris 0.5 M pH 6.8, 200 µL de SDS 20%, 200 µL de Glicerol y 100 µL de azul de Bromofenol 0.002%) agregándole 0.5 µL de β-Mercaptoetanol por cada 10 µL de reacción y se colocaron a 95 °C por 5 minutos. Posteriormente se tomaron 6 µL de la solución anterior y se analizaron en un gel de SDS-PAGE. El gel separador se preparó al 13% y se utilizaron 1.822 mL de agua destilada estéril, 1.125 mL de Tris 1.5 M pH 8.8, 1.4 mL de acrilamida (40%), 45 µL de SDS 10%, 4.5 µL de TEMED y 45 µL de persulfato de amonio 10%. Cuando el gel polimerizó, se preparó en la parte superior el gel concentrador al 5% con 1.095 mL de agua destilada estéril, 187 µL de Tris 0.5 M pH 6.8, 187 µL de acrilamida (40%), 15 µL de SDS 10%, 1.5 µL de TEMED y 15 µL de persulfato de amonio 10%. Los geles se colocaron en una cámara vertical Mini-Protean Tetra Cell de BioRad y se agregó el buffer de corrida SDS-PAGE (250mM Tris base, 1.92M Glicina, 1% SDS, pH 8.8), las muestras se sometieron a electroforesis a 60 volts por 30 minutos y 120 volts por 1.5 h. Los geles se tñieron con solución de Coomassie (0.25% azul brillante de Coomassie G-250, 45% metanol, 9% ácido acético, 46% agua) durante 10 minutos bajo agitación suave, posteriormente se destñieron con una solución de destinción (7.5% ácido acético, 5% metanol, 87.5% agua) y se observaron en un fotodocumentador Gel Doc™ EZ Imagen (BioRad).

Resultados y Discusión

Mantenimiento de la colonia de *S. frugiperda*

De manera mensual la producción de *S. frugiperda* se mantuvo en 4 000 larvas de diferentes instar larvales, desde larvas neonatas hasta larvas del 5^o estadio, de las cuales 400 larvas se individualizaron en envases de plástico (Figura 1 D), el resto de las larvas se utilizaron para experimentos en el laboratorio. Aproximadamente 360 larvas entraron a pupa y posteriormente eclosionaron como adultos (Figuras 1E y 1F).



Figura 1. Colonia de *S. frugiperda*. A) Cámara de crecimiento, B) Huevecillos, C) Cajas de Petri con dieta artificial, D) Vasos plásticos con dieta artificial, E) Pupas de *S. frugiperda*, F) Bolsas con adultos de *S. frugiperda*.

Producción de CO's de baculovirus en larvas de *S. frugiperda*

Se infectaron larvas de *S. frugiperda* de entre 2^{do} y 3^{er} instar con las cepas SfNPV-An1, SfNPV-An2, SfNPV-Gto y SfNPV-Acámbaro, las cuales se recolectaron entre los 5 y 7 días post infección, tiempo en el cual las larvas murieron con la sintomatología típica de la infección por baculovirus (coloración blanca, fragilidad de la cutícula, hinchazón, cambio de color y ruptura del tegumento). Estas se procesaron y los CO's se purificaron en gradientes continuos de sacarosa en una ultracentrífuga para posteriormente cuantificarlos. Como resultado, se obtuvieron las concentraciones mostradas en la Tabla 2. Para la cepa SfNPV-Acámbaro se obtuvo una concentración de 1.67×10^9 CO/mL, para SfNPV-Gto, una concentración de 1.44×10^9 CO/mL, para SfNPV-An1, una concentración de 2.03×10^9 CO/mL y para la cepa SfNPV-An2 una concentración de 2.92×10^9 CO/mL.

Tabla 2. Concentraciones de los cuerpos de oclusión de las diferentes cepas de SfNPV

Cepa	Concentración (CO/mL)
SfNPV-Acámbaro	1.67×10^9
SfNPV-Gto	1.44×10^9
SfNPV-An ₁	2.03×10^9
SfNPV-An ₂	2.92×10^9

Análisis de patrones de fragmentos de restricción del genoma de las cepas virales

Se pudo comprobar que las cepas SfNPV-Gto, SfNPV-Acámbaro, SfNPV-An1 y SfNPV-An2, mediante el análisis con las enzimas de restricción *EcoR*I y *Hind*III, son cepas diferentes (Fig. 2). Se obtuvieron un total de doce fragmentos con la enzima de restricción *EcoR*I, seis de ellos (12 000, 11 000, 10 500, 9 500, 5 000 y 4 000 pb) para la cepa SfNPV-Acámbaro, los cuáles no estaban presentes en el aislado SfNPV-Gto (Fig. 2, carril 2). Esta última posee 19 bandas, de las cuales 11 (8 000 pb, 7 000 pb, 4 500 pb, 2 800 pb, 2 100 pb, 3 bandas entre las 1 600-2 000 pb, una a las 850 pb, 500 pb y 400 pb) no se encuentran en el baculovirus SfNPV-Acámbaro (Fig. 2 carril 3). Por otro lado, para la cepa SfNPV-An1 se observaron 20 bandas, de las cuales, dos de ellas de 4 000 pb y 3 500 pb, 3 bandas de entre 2 000-3 000 pb y una de 1 600 pb, no estaban presentes en la cepa SfNPV-Acámbaro (Fig. 2 carril 4). Finalmente, para la cepa SfNPV-An2 se observaron 25 bandas, de las cuales, el fragmento de 12 000 pb, el de 8 000 pb, la de 4 500, y la de 4 000 pb, y algunas otras de bajo peso molecular, no estaban presentes en la cepa SfNPV-Acámbaro (Fig. 2 carril 5). Con la enzima de restricción *Hind*III, la cepa SfNPV-Acámbaro presentó 12 fragmentos, de los cuales tres de ellos de 12 000 pb, estuvieron ausentes en SfNPV-Gto (Fig. 2 carril 7); dos bandas de peso molecular arriba de las 9 000 y 8 000 pb, estuvieron ausentes en las cepas SfNPV-Gto y SfNPV-An2. Tres bandas entre las 6 000 y 5 000 pb, tampoco se observaron en las cepas SfNPV-Gto y SfNPV-An2 (Fig. 2 carril 7). Asimismo, la cepa SfNPV-Gto presentó 16 bandas, de las cuales 3 de ellas, de 11 000 pb y pesos

moleculares arriba de las 12 000 pb, una de 8 500, una de 7 500 pb, tres bandas de entre 4 000/5 000 pb, tres de 3 000 pb, 2 500 pb y 2 000 pb, estuvieron ausentes en la cepa SfNPV-Acámbaro (Fig. 2 carril 8). Para la cepa SfNPV-An1, se observaron 14 bandas, de las cuales: una banda de 12 000 pb y una de 850 pb, no se encontraron en la cepa SfNPV-Acámbaro (Fig. 2 carril 9). Finalmente, para la cepa SfNPV-An2, se observaron 18 bandas, de las cuales, una de más de 12 000 pb, un doblete de 11 000 pb, un triplete de entre 4 000/6 000 pb, un doblete de 4 500 pb y una banda de 2 500 pb, no fueron detectadas en la cepa SfNPV-Acámbaro (Fig. 2 carril 10). Estas diferencias en patrones de restricción, podrían significar diferencias en en los niveles de virulencia de estas cepas, aun cuando fueron aisladas de regiones geográficamente cercanas. Resultados similares a estos fueron reportados por Ríos y colaboradores en 2012, para nucleopoliedrovirus aislados de *S. frugiperda*, donde los aislados mostraron diferencias en la actividad biológica, así como en los patrones de bandeado usando enzimas de restricción. Asimismo, Ordoñez y colaboradores (2019), reportaron que similitudes morfológicas entre cepas virales, no necesariamente implicaban niveles de virulencia similares entre cepas, sino que estas podían ser diferentes.

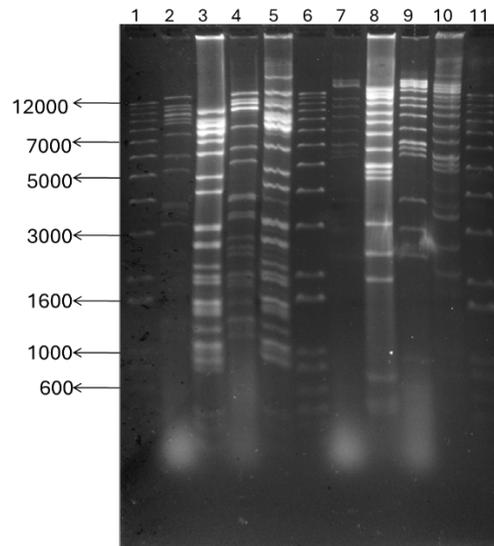


Figura 2. Perfiles de patrones de restricción de DNA de cepas de baculovirus aisladas de *Spodoptera frugiperda*. Carriles 2 al 5, análisis con la enzima EcoRI. Carril 1: Marcador de peso molecular 1 kb plus Ladder, Invitrogen. Carril 2: SfNPV-Acámbaro. Carril 3: SfNPV-Gto. Carril 4: SfNPV-An1 y Carril 5: SfNPV-An2. Carriles 7 al 10, análisis de restricción con la enzima HindIII. Carril 7: SfNPV-Acámbaro. Carril 8: SfNPV-Gto. Carril 9: SfNPV-An1 y Carril 10: SfNPV-An2.

Análisis de los genes de virulencia de las cepas de baculovirus aislados de *S. frugiperda*

Como parte de la caracterización de la nueva cepa de baculovirus SfNPV-Acámbaro, ésta se sometió a PCR con los oligonucleótidos específicos de los factores *pif-1*, *2* y *3* (Fig. 3). Se observó la amplificación del gen *pif-3* (carril 1), con un amplicón de 500 pb. El gen *pif-2* (carril 2), presentó un amplicón de 100 pb y para el gen *pif-1* (carril 3), el amplicón fue de 300 pb, esto aunado a la amplificación del control positivo (carril 4) con el DNA de la cepa SfNPV-Ar, por lo que se comprobó la presencia de estos genes de virulencia en la cepa SfNPV-Acámbaro. Los genes *pif* codifican para las proteínas estabilizadoras del complejo PIF, el cual está presente en la superficie de los viriones derivados de oclusión, las cuales son esenciales para el reconocimiento de receptores específicos en el epitelio de las células columnares de los insectos (Pen et al., 2010), siendo esenciales para iniciar el proceso de infección primaria y para infectar a los insectos susceptibles. Rodríguez-Castillo *et al.*, (2023) reportaron la presencia de estos factores en 7 cepas de baculovirus SfNPV, específicas para el gusano cogollero y altamente virulentas, por lo que la presencia de estos factores podría indicar una alta virulencia para esta nueva cepa viral.

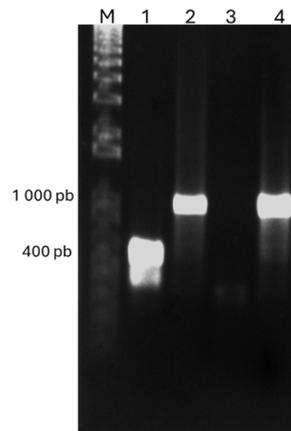


Figura 3. PCR con oligonucleótidos para los genes *pif* usando el DNA de la cepa SfNPV-Acámbaro. M: marcador de peso molecular (1 kb plus Ladder, Invitrogen). Carril 1: Gen *pif*-3. Carril 2: Gen *pif*-2. Carril 3: Gen *pif*-1. Carril: 4 control positivo SfNPV-Ar.

Para el gen *egt* se realizó un PCR utilizando los oligonucleótidos específicos según lo reportado por Rodríguez-Castillo *et al.*, (2023), usando como control positivo el DNA de la cepa SfNPV-Ar (Fig. 4, carril 1) observándose un amplicón de 500 pb. En el carril 2, se observa un amplicón del mismo peso molecular para la cepa SfNPV-Acámbaro, lo cual demostró que ésta posee el gen *egt*. Rodríguez-Castrillo *et al.*, (2023) demostraron que las cepas con altos niveles de virulencia poseen este gen. Por otro lado, se ha reportado que el gen *egt* (Ikeda *et al.*, 2015), puede asociarse con una mortalidad temprana de las larvas infectadas, y que este podría afectar la producción de CO de forma negativa debido a una muerte acelerada del organismo, por lo que requiere estudiarse el efecto de su presencia en la cepa SfNPV-Acámbaro.

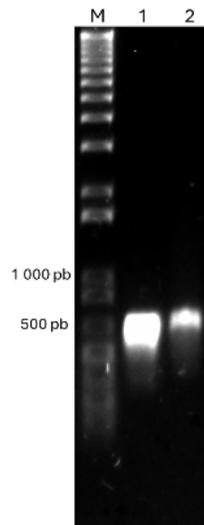


Figura 4. PCR con oligonucleótidos para los genes *egt*. M: marcador de peso molecular (1 kb plus Ladder, Invitrogen). Carril 1 Gen *egt* de la cepa SfNPV-Ar. Carril 2: Gen *egt* de la cepa SfNPV-Acámbaro.

En el caso del gen *vfgf* al realizar PCR a la cepa SfNPV-Acámbaro, ésta no mostró la amplificación esperada (Fig. 5 carril 2), contrastando con el control positivo (Fig. 5, carril 1) la cual si presentó la amplificación esperada de 1 100 pb. Lo anterior fue un indicativo de la posible deficiencia de este gen en la cepa SfNPV-Acámbaro. El gen *vfgf* se relaciona con la diseminación de los viriones gemados de las células columnares hacia la hemolinfa del insecto, con la finalidad de infectar todos los órganos y tejidos (Detvisitsakun *et al.*, 2007). Aunado a lo anterior, se ha propuesto por Zwart *et al.* (2019), que mutaciones o la ausencia de este gen en baculovirus, podría relacionarse con una más baja velocidad de muerte en los insectos susceptibles. La ausencia del gen *vfgf* en la cepa SfNPV-Acámbaro debe continuar investigándose para entender la compleja interacción de este virus con el organismo huésped susceptible.

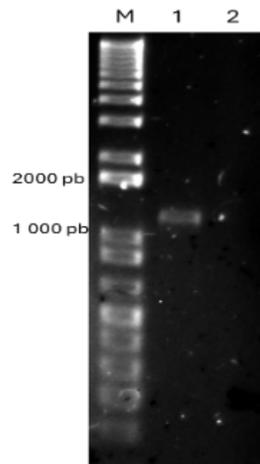


Figura 5. PCR con oligonucleótidos para los genes *vfgf*. M: marcador de peso molecular (1 kb plus Ladder, Invitrogen). Carril 1: Gen *vfgf* de la cepa SfnPV-Ar (control positivo). Carril 2: Gen *vfgf* de la cepa SfnPV-Acámbaro.

Finalmente, para los genes *iap*, la cepa SfnPV-Acámbaro presentó amplificaciones para los genes *iap-2* (Fig. 6B, carril 2) e *iap-3* (Fig. 6C, carril 2), pero no para el gen *iap-1* (Fig. 6A, carril 2). Al igual que los resultados obtenidos en este trabajo, Rodríguez-Castillo y colaboradores en el 2023, al analizar a la cepa SfnPV-Ar encontró que ésta poseía a los genes *iap-2* y *3* pero no al gen *iap-1*. Bivian-Hernández et al., (2024) (datos no publicados) analizaron el genoma de tres cepas de baculovirus SfnPV, encontrando que éstas no poseían el gen *iap-1*. Estos genes participan normalmente en la respuesta al fenómeno apoptótico de los insectos, al tener una infección por baculovirus, utilizando el sistema de las caspasas en respuesta a la infección. Se sabe que existe una coevolución de los baculovirus con su insecto hospedero, lo cual le ha permitido al virus obtener genes que regulan estos procesos apoptóticos, a través de genes inhibidores de apoptosis (*iap*), de los que se conocen 5, aunque los genes *iap-1*, *iap-2* e *iap-3*, son los de mayor importancia (Hughes, 2002). Algunos nucleopoliedrovirus solo presentan los últimos dos, los cuales tienen efecto sinérgico, aumentando la producción de nucleocápsides y disminuyendo el porcentaje de apoptosis (Zheng et al., 2022), por lo que la presencia de estos en la cepa SfnPV-Acámbaro, podrían ser un indicativo de una alta virulencia en esta cepa viral.

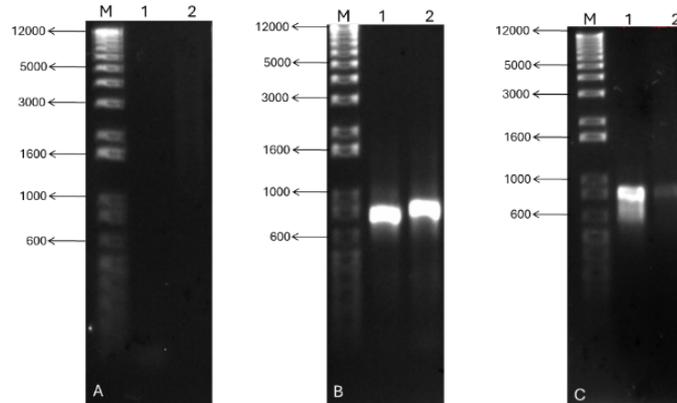


Fig. 6. Amplificaciones de los genes *iap*. A) Gen *iap-1*, M: marcador de peso molecular en kb (1 kb plus Ladder, Invitrogen). Carril 1: cepa SfnPV-Ar; carril 2: cepa SfnPV-Acámbaro. B) Gen *iap-2*, M: marcador de peso molecular. Carril 1: cepa SfnPV-Ar; carril 2: cepa SfnPV-Acámbaro. C) Gen *iap-3*, M: marcador de peso molecular. Carril 1: cepa SfnPV-Ar; carril 2: cepa SfnPV-Acámbaro.

Análisis de proteínas de los CO's de las cepas SfnPV por SDS-PAGE

Finalmente, como parte de la caracterización de la cepa SfnPV-Acámbaro, se realizó el perfil de proteínas de los viriones derivador de ocusión y se compararon con los de las cepas SfnPV-An1, SfnPV-An2 y SfnPV-Gto. En la figura 7 se puede observar, en los carriles 4 y 5, el perfil de proteínas de la cepa SfnPV-Acámbaro, la cual presentó un total de 15 bandas de bajo peso molecular (45 a 10 kDa), de las cuales una banda de entre 25-45 kDa, es similar a la observada en la cepa SfnPV-An2. Asimismo, se detectó que las bandas cercanas a los 25 y 20 kDa presentes en las cepas SfnPV-An1 y SfnPV-An2, no estaban

presentes ni en la cepa SfNPV-Gto ni en la cepa SfNPV-Acámbaro. Se pudo observar lo mismo con las bandas de 15, 14 y 13 kDa observadas en la cepa SfNPV-An1, las cuales se detectaron en las demás cepas. En el caso de las proteínas de alto peso molecular, se observó la presencia de una banda de 120 kDa en la cepa SfNPV-Acámbaro (Fig. 7 carril 4 y 5) y en las cepas SfNPV-An1 y SfNPV-An2. Asimismo, se observó una proteína inferior a los 120 kDa, presente en las cepas SfNPV-An2 y SfNPV-Gto. Finalmente, todas las cepas virales presentaron una banda de alto nivel de expresión de 30 kDa correspondiente a la poliedrina y una banda de 10 kDa, correspondiente a la proteína P10. Jehle *et al.*, (2006) mencionaron que ambas proteínas permiten establecer relaciones entre cepas virales de la misma especie. En cuanto a las diferencias de las bandas de bajo y alto peso molecular, es posible que las diferencias observadas en los patrones de fragmentos de restricción estén relacionadas con las diferencias en cuanto a patrones de proteínas. Sin embargo, para poder afirmar esto, es necesario realizar la identificación puntual de estas proteínas diferenciales, con la finalidad de determinar su función específica y su papel en la virulencia de cada una de las cepas analizadas.

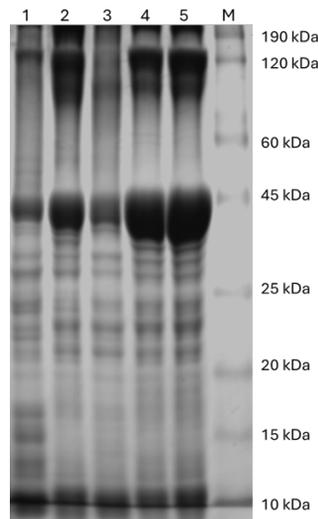


Fig. 7. Proteínas de los viriones derivados de oclusión. Carril 1 cepa SfNPV-An1. Carril 2 cepa SfNPV-An2. Carril 3 cepa SfNPV-Gto. Carril 4 cepa SfNPV-Acámbaro. Carril 5 cepa SfNPV-Acámbaro. M marcador de peso molecular BenchMark

Conclusiones

En este proyecto se evaluó una nueva cepa mexicana de baculovirus denominada SfNPV-Acámbaro, aislada de larvas del gusano cogollero del maíz *S. frugiperda*. Esta se caracterizó a nivel molecular y se comparó con otras tres cepas nativas SfNPV-Gto, SfNPV-An1 y SfNPV-An2. Las cuatro cepas fueron altamente infectivas hacia el gusano cogollero del maíz, siendo las cepas SfNPV-Gto y SfNPV-Acámbaro las más virulentas, con una velocidad de muerte acelerada de las larvas, esto se relacionó con la obtención de un menor número de CO's en la amplificación de las cepas virales. En cuanto a los patrones de fragmentos de restricción, las 4 cepas presentaron patrones diferentes, estableciendo que la cepa SfNPV-Acámbaro, no es un re-aislamiento, sino una nueva cepa de baculovirus. Adicionalmente, al analizar los genes de virulencia, se encontró en el aislado SfNPV-Acámbaro, la presencia de los genes anti-apoptóticos *iap 2* e *iap 3*, los cuales proporcionan una ventaja evolutiva a las cepas de virus al inhibir la apoptosis en el insecto huésped, permitiendo su diseminación y favoreciendo la infección sistémica. De igual manera, se detectó la presencia del gen *egt*, esto podría ser un indicativo de que para la nueva cepa viral se favorece su replicación en el insecto huésped. Un fenómeno interesante fue el gen *vfgf* no se detectó en la cepa SfNPV-Acámbaro, lo que podría implicar mayores tiempos para matar al insecto huésped, pero esto necesita ser comprobado. Finalmente, se detectaron proteínas en los CO's de la cepa SfNPV-Acámbaro, relacionados tanto con la cepa altamente virulenta SfNPV-Gto, como con las cepas SfNPV-An1 y SfNPV-An2, indicando una posible virulencia elevada. La búsqueda de nuevas cepas virales contra el gusano cogollero del maíz es muy importante para lograr el control de esta plaga en maíz, con la finalidad de poder alcanzar una producción de este cereal, pero de una forma inocua, y así contribuir a una disminución en el uso de los insecticidas químicos.

Bibliografía/Referencias

- CNRF. Centro Nacional De Referencia Fitosanitaria. (2021). *Gusano cogollero Spodoptera frugiperda (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae)*. Recuperado el 29 de octubre de 2022, de https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/635234/Gusano_cogollero_en_ma_z_y_arroz.pdf
- Detvisitsakun, C., Cain, E.L., & Passarelli, A.L. (2007). The Autographa californica M nucleopolyhedrovirus fibroblast growth factor ac celerates host mortality. *Virology*, 365: 70–78.
- Eberle, K. E., Wennmann, J. T., Kleespies, R. G., & Jehle, J.A. (2012). Chapter II - Basic techniques in insect virology. Editor(s): Lacey, L. A. *Manual of Techniques in Invertebrate Pathology (Second Edition)*, Academic Press, pp 15-74, ISBN 9780123868992, Doi.org/10.1016/B978-0-12-386899-2.00002-6.
- Grzywacz, D. 2017. Basic and applied research: Baculovirus. In *Microbial Control of Insect and Mite Pests: from theory to practice*. Academic Press, Amsterdam (pp. 27-46).
- Gutiérrez Arellano, L. M., Villaseñor Verdin, F., & Ocegüera Contreras, E. (2021). Baculovirus, un patógeno versátil. *Ciencia*, 72 (2), 26-33. Disponible en: https://www.amc.edu.mx/revistaciencia/images/revista/72_2/PDF/06_72_2_1210.pdf
- Hauze, D. (2020). "Spodoptera". *Animal Diversity Web*. Recuperado el 29 de octubre de 2022, de <https://animaldiversity.org/accounts/Spodoptera/>
- Hughes, A. (2002). Evolution of inhibitors of apoptosis in baculoviruses and their insect hosts. *Infection, Genetics and Evolution*, 2(1), 3-10, ISSN 1567-1348. [https://doi.org/10.1016/S1567-1348\(02\)00040-0](https://doi.org/10.1016/S1567-1348(02)00040-0).
- Hussain, A. G., Wennmann, J. T., Goergen, J., Bryon, A., & Ros, V. I. D. (2021). Viruses of the fall armyworm *Spodoptera frugiperda*: A review with prospects for biological control. *Viruses*, 13(11), 2220. <https://doi.org/10.3390/v13112220>.
- Ikeda, M., Hamajima, R., y Kobayashi, M. (2015). Baculoviruses: diversity, evolution and manipulation of insects. *Entomological science*, 18(1):1-20.
- Jehle, J. A., Blissard, G. W., Bonning, B. C., Cory, J. S., Herniou, E. A., Rohrmann, G. F., Theilmann, D. A., Thiem, S. M., & Vlak, J. M. (2006). On the classification and nomenclature of baculoviruses: A proposal for revision. *Archives Of Virology*, 151(7), 1257-1266. <https://doi.org/10.1007/s00705-006-0763-6>
- Llopis-Girñenez, A., Caballero-Vidal, G., Jacquín-Joly, E., Crava, C. M., y Herrero, S. (2021). Baculovirus infection affects caterpillar chemoperception. *Insect Biochemistry and molecular Biology*, 138, 1-9. doi.org/10.1016/j.ibmb.2021.103648
- Paredes-Sánchez FA, Rivera G, Bocanegra-García V, Martínez-Padrón HY, Berrones-Morales M, Niño-García N, Herrera-Mayorga V. (2021). Advances in Control Strategies against *Spodoptera frugiperda*. A Review. *Molecules*, 26(18):5587. doi: 10.3390/molecules26185587.
- Peng, K., Van Oers, M. M., Hu, Z. H., Van Lent, J. W. M. & Vlak, J. M. 2010. Baculovirus Per Os Infectivity Factors Form a Complex on the Surface of Occlusion-Derived Virus. *Journal of Virology*, 84, 9497-9504.
- Rodríguez-Castrillo NP. (2023). Estudio Biológico y molecular de genes de virulencia de cepas de baculovirus SfNPV con actividad hacia el gusano cogollero del maíz *Spodoptera frugiperda*. Tesis de Maestría en Bociencias. Universidad de Guanajuato. México.
- Salvador, R., Niz, J., Pedarros, A. y Quintana, G. (2021). Utilización regional de baculovirus en el control de plagas hortícolas. *RIA*, 47(3), 354-360.
- SADER. Secretaria de Agricultura y Desarrollo Rural. (2023). *Maíz, cultivo de México*. gob.mx. Recuperado el 27 de abril de 2023, de <https://www.gob.mx/agricultura/articulos/maiz-cultivo-de-mexico>
- SIAP. Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. (2023). *Avance de siembras y cosechas*. Recuperado el 28 de abril de 2023, de https://nube.siap.gob.mx/avance_agricola/
- Zheng, H., Pan, Y., Awais, M.M., Tian, W., Li, J. & Sun, J. (2022). Impact of Group II Baculovirus IAPs on Virus-Induced Apoptosis in Insect Cells. *Genes*, 13(750). <https://doi.org/10.3390/genes13050750>
- Zwart, M. P., Ali, G., Van Strien, E. A., Schijlen, E. G. W. M., Wang, M., Van Der Werf, W., & Vlak, J. M. (2019). Identification of Loci Associated with Enhanced Virulence in *Spodoptera litura* Nucleopolyhedrovirus Isolates Using Deep Sequencing. *Viruses*, 11(9), 872. <https://doi.org/10.3390/v11090872>