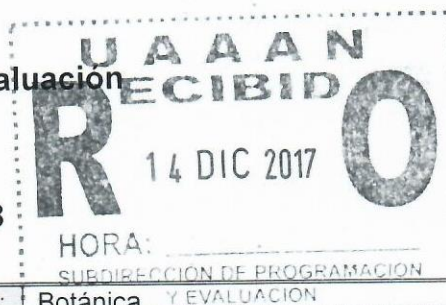




Dirección de Investigación

Subdirección de Programación y Evaluación



Proyecto de Investigación 2018

Unidad:	Saltillo	División:	Agronomía	Departamento:	Botánica
Tema estratégico (ANA/PEP):		Ciencias agropecuarias y biotecnología			
Línea de investigación:		Control Biológico y Microbiano			
Título del proyecto: Caracterización molecular de baculovirus aislados de diferentes zonas geográficas de México					
Presupuesto solicitado (Máximo \$75,000)		50000	El proyecto es:	Nuevo	<input checked="" type="checkbox"/> Continuación
Tipo de investigación:		Básica	<input checked="" type="checkbox"/> Aplicada	<input checked="" type="checkbox"/> Tecnológica	e-mail del responsable: miguel_cbg@hotmail.com
Vinculación:		Si	No	<input checked="" type="checkbox"/> Fondos concurrentes:	
Cooperante(s):		Centro de Biotecnología Genómica del Instituto Politécnico Nacional			
Entidad (es):		Coahuila	Municipio (s):		Saltillo
Localidades:		Saltillo			
A realizar durante el(los) año(s):		2018-2019			
Participantes		Adscripción (Clave Depto.)	Expediente No.	Firma	
Responsable		Dr. Miguel Ángel Pérez Rodríguez	Botánica(3614)	4104	
Colaborador:		Dr. Valentín Robledo Torres	Horticultura	3031	
Colaborador:		Dra Silvia Judith Martínez Amador	Botánica(3614)	3796	
Colaborador:		Dr. Mario Alberto Rodríguez Pérez	Centro de Biotecnología Genómica del IPN		
Colaborador:					
		Grado por obtener	Matrícula	Firma	
Tesista:		Tesista por designar de la carrera de	Licenciatura		
Programa Docente:		Ing. en Agrobiología			
Tesista:					
Programa Docente:					
Tesista:					
Programa Docente:					
Vo. Bo.		Autoriza			
Firma y sello	Universidad Autónoma Agraria "Antonio Narro"				
Nombre	Dra. Silvia Judith Martínez Amador		Dr. Armando Robledo Olivo		
Jefe de Departamento	Depto. de Botánica		Subdirector de Programación y Evaluación		

Protocolo para Proyecto de Investigación 2018

1.-Título del proyecto

Presupuesto solicitado:

Caracterización molecular de baculovirus aislados de diferentes zonas geográficas de México

\$ 50000.00

2.- Introducción

Los baculovirus infectan las familias Lepidóptera, Himenóptera, Díptera y Coleóptera. Existen dos géneros: los Nucleopolihedrovirus (NPV) y los Granulovirus (GV) (Bonning and Hammock, 1996) y dos morfotipos: los virus injertados (BVs) que se replican en el organismo hospedero y los cuerpos de oclusion (OBs) que están contenidos en una estructura proteica de polihedrina, la cual los protege de los efectos del medioambiente (Szewczyk et al., 2006).

La infección ocurre cuando un insecto susceptible ingiere polihedrina, la cual es diluida en el intestino liberando los viriones que infectan las células circundantes, esta infección primaria permite la replicación de los virus que diseminan la infección a otros tejidos (Barrett et al., 1998). Durante la infección ocurre la expresión de los genes virales, el ensamblaje de viriones, se produce polihedrina en cantidades masivas en los tejidos del hospedero lo cual trae consigo la muerte del hospedero y la liberación de poliedros que son ingeridos por otros insectos (Harrison and Bonning, 2001).

Desde el año 1900 numerosos baculovirus han sido usados para controlar plagas de himenópteros, coleópteros y lepidópteros en cultivos como cocoteros, repollo y algodón (Szewczyk et al., 2006). El tiempo en que un baculovirus mata hospedero va de días a semanas dependiendo de la temperatura ambiental, dosis viral, edad del insecto y de la especie del virus (Bonning and Hammock, 1996). Los baculovirus como agentes de control de plagas no provocan problemas asociados con los residuos químicos y no provocan la resistencia cruzada con compuestos químicos (Bonning and Hammock, 1996), a la fecha no existen en México una presentación comercial baculovirus como agentes de control biológico, ni tampoco es utilizado de modo sistemático en esquemas de control biológico (Martínez et al., 2012).

Los baculovirus son nombrados considerando el hospedero de donde fueron aislados inicialmente, de este modo el nucleopolihedrovirus de *Autographa californica* (AcMNPV) fue nombrando por su hospedero *Autographa californica*, no obstante este virus infecta una amplia variedad de insectos (Harrison and Bonning, 2001), y también es común los baculovirus aislados de la misma especie de hospedero pueden representar diferentes especies (Li et al., 2002). Actualmente se han realizado diferentes esfuerzos para poder determinar rápidamente a que especie de baculovirus pertenece cada aislado, de tal modo que se han diseñado primers específicos que pueden ser usados en pruebas de PCR y poder determinar de acuerdo al producto de la amplificación de que especie viral se trata.

De modo intraespecifico, se ha demostrado que la variabilidad genética de los baculovirus es ubicua (Cory et al., 2005), se han encontrado polimorfismos genéticos en virus aislados del mismo hospedero pero de diferente zona geográfica (Vickers et al., 1991), incluso entre los virus aislados de un mismo hospedero individual (Lynn et al., 1993; Maeda et al., 1990), también se han elaborado multiples reportes del uso de enzimas de restricción para la caracterización molecular de Baculovirus, y se han encontrado diferentes niveles de toxicidad entre los diferentes genotipos caracterizados, los cuales pueden ser aislados de suelo (Rios-Velasco et al., 2012) o de larvas individuales (Barrera et al., 2011; Erlandson et al., 2007).

Estudios con perfiles de endonucleasas de restricción en ADN han demostrado que los baculovirus son extremadamente variables. Aislados virales de lepidópteros de diferentes regiones geográficas, frecuentemente muestran diferencias en los patrones de restricción en los NPV de lepidópteros; sin embargo, no se conoce la función del mantenimiento de esta variación (Cory and Myers, 2003).

Objetivos

Analizar la variedad genética de distintos aislados mexicanos de baculovirus

Hipótesis

Existe variabilidad genética entre baculovirus aislados de diferente origen geográfico en el mismo hospedero

3.-Revisión de Literatura

4.- Procedimiento Experimental

Muestreo

Se colectaran muestras de suelo de 5 locaciones distintas geográficamente (centro, noreste, noroeste, suroeste y centro occidente del país), las muestras de suelo consistirán en 600 a 800 gramos de suelo que serán tomados de los 5 cm más superficiales en las locaciones seleccionadas, en parcelas agrícolas), las muestras serán tamizadas e incorporadas uniformemente en dieta artificial de noctuidos en una proporción de 20%, esta dieta con suelo incorporado será utilizada para alimentar larvas de primer y segundo instar de *Spodoptera exigua* como ha sido previamente documentado (Richards and Christian, 1999; Rios-Velasco et al., 2012).

Las larvas que mueran de polihedrosis usando la dieta mencionada serán utilizadas para llevar a cabo el aislamiento y amplificación de los baculovirus.

Aislamiento y amplificación de baculovirus

Las larvas infectadas de polihedrosis obtenidas en el paso anterior serán usadas para extraer las partículas de oclusión, se utilizarán protocolos previamente descritos (Cory et al., 2005) para esto cada larva será homogenizada por separado en un tubo eppendorf de 1.5 ml con un 100 µl de una solución de SDS al 0.1%, el homogenizado será centrifugado a baja velocidad (400 g) por 5 minutos, tras lo cual el sobrenadante será recuperado, mezclado y vuelto a centrifugar ahora por 20 minutos a 3500 g, tras esta centrifugación los cuerpos de oclusión sedimentarán en el fondo del tubo (pellet), el sobrenadante será descartado y el pellet será resuspendido en 200 µl de agua miliQ estéril. Las muestras de virus resultantes serán usadas para alimentar larvas de *Spodoptera exigua* de segundo instar, de las larvas que resulten muertas por polihedrosis se repetirá la extracción de cuerpos de oclusión como es descrito arriba.

Caracterización molecular de los virus aislados

Para llevar a cabo la caracterización molecular primero se realizarán extracciones de ADN viral de cada una de las muestras amplificadas, los virus obtenidos en el paso anterior serán disueltos en 400 µl de buffer para

proteínasa K, a dicha solución se le agregará 100 μ l de una solución de proteínasa K ((200 μ g/ml) y será incubada 2 horas a 37°C, posteriormente se llevará a cabo la extracción del ADN viral usando el protocolo de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico como previamente ha sido reportado (Erlandson et al., 2007; Rios-Velasco et al., 2012)

Para la especie de baculovirus que se ha aislado de los insectos colectados se llevará a cabo PCR usando iniciadores específicos para cada especie previamente reportados, los iniciadores Ac-*ie0* (5'tgtatatgcgtaggagagcc 3' y 5' ctcgcaactgttcaagtac 3') solo amplifican si se trata de AcMNPV, en tal caso resulta una banda de 619 bp (Erlandson et al., 2007), los iniciadores Tnae (5' attcgctgtattgtgtaga 3' y 5' gcccatcgaaatcaagtgc 3') son específicos para producir una banda de 405 bp solo si se trata de TnSNPV (Erlandson et al., 2007; Milks et al., 2001), los iniciadores Sse (5'CGTAGCGCAAC AAATCCTC 3' y 5' GCTCTCAAACCGCACAAAT 3') (Salem et al., 2012) amplifican una banda de 95 pb solo con el genoma de SeMNPV y los iniciadores SSF (5' TCGAGGAGAGGACTTTGGAC 3' y 5' CACGGTTGATGAACTCTTCG 3') (Martínez et al., 2005) que amplifican una banda de 770 nucleótidos cuando se usan en PCR con el genoma de SfMNPV. Los productos de PCR serán visualizados por medio de electroforesis en un gel de agarosa al 1%.

Los polimorfismos intraespecíficos serán analizados por medio de endonucleasas de restricción, las enzimas HindIII, EcoRI and XhoI serán utilizadas para digerir 2-2.5 μ g de cada muestra de ADN viral y sus respectivos testigos, siguiendo las especificaciones del fabricante. El resultado de la digestión será visualizado por medio electroforesis en un gel de agarosa al 0.6%.

Cria de insectos

Para llevar a cabo este proyecto se establecerá la cría de insectos plaga para llevar a cabo la replicación de los baculovirus y los bioensayos, las especie de insectos que se utilizara es *Spodoptera exigua*. Las larvas serán incubadas a temperatura $26 \pm 1^\circ\text{C}$ con fotoperiodo de 14/10 h luz/oscuridad y a $65 \pm 5\%$ de humedad relativa

hasta la pupación. Las pupas serán colocadas en contenedores de plástico de 4 L hasta la emergencia de los adultos, los cuales serán alimentados con una solución azucarada al 10% hasta la ovoposición. Los huevecillos serán colectados durante cinco días. Las larvas en el segundo instar serán usadas para llevar a cabo la amplificación de los baculovirus que serán usados para las extracciones de ADN.

Cronograma de Actividades para el 2018.

Actividad por realizar	E	F	M	A	M	J	J	A	S	O	N	D
Cría de insectos	X	X										
Infección de insectos			X	X								
Purificación de virus					X	X						
Extracción de ADN viral							X	X				
PCR									X	X		
Ensayos con enzimas de restricción									X	X		
Análisis de resultados										X	X	X

Cronograma de distribución de presupuesto para el 2018.

Actividad por realizar	E	F	M	A	M	J	J	A	S	O	N	D
Cría de insectos	X	X										
Infección de insectos			X	X								
Purificación de virus					X	X						
Extracción de ADN viral							X	X				
PCR									X	X		
Ensayos con enzimas de restricción									X	X		
Análisis de resultados										X	X	X

Duración total del proyecto

Año de Inicio	2018	Año estimado de conclusión	2019
---------------	------	----------------------------	------

5.-Productos Esperados

- Se espera obtener una vista general sobre la diversidad genética de los baculovirus al interior de cada región y comparado entre las diferentes regiones del país.
- Se espera caracterizar molecularmente distintos aislados de baculovirus silvestres
- Se espera que mediante la realización de este trabajo se pueda elaborar por lo menos una tesis de nivel licenciatura.
- Se espera la participación en un congreso nacional.

6.-Literatura Citada

Ackermann, H.-W., Smirnov, W., 1983. A morphological investigation of 23 baculoviruses. *Journal of invertebrate Pathology* 41, 269-280.

Barrera, G., Simón, O., Villamizar, L., Williams, T., Caballero, P., 2011. *Spodoptera frugiperda* multiple nucleopolyhedrovirus as a potential biological insecticide: Genetic and phenotypic comparison of field isolates from Colombia. *Biological Control* 58, 113-120.

Barrett, J.W., Brownwright, A.J., Primavera, M.J., Palli, S.R., 1998. Studies of the nucleopolyhedrovirus infection process in insects by using the green fluorescence protein as a reporter. *Journal of virology* 72, 3377-3382.

Bianchi, F.J., Joosten, N.N., Vlak, J.M., van der Werf, W., 2000. Greenhouse Evaluation of Dose–and Time–Mortality Relationships of Two Nucleopolyhedroviruses for the Control of Beet Armyworm, *Spodoptera exigua*, on Chrysanthemum. *Biological Control* 19, 252-258.

Bonning, B.C., Hammock, B.D., 1996. Development of recombinant baculoviruses for insect control. *Annual review of entomology* 41, 191-210.

Braunagel, S.C., Parr, R., Belyavskyi, M., Summers, M.D., 1998. *Autographa californica* Nucleopolyhedrovirus Infection Results in Sf9 Cell Cycle Arrest at G2/M Phase. *Virology* 244, 195-211.

Caballero, P., Murillo, R., Muñoz, D., Williams, T., 2009. The nucleopolyhedrovirus of *Spodoptera exigua* (Lepidoptera: Noctuidae) as a biopesticide: analysis of recent advances in Spain. *Revista Colombiana de Entomología* 35, 105-115.

Cory, J.S., Bishop, D.H., 1997. Use of baculoviruses as biological insecticides. *Molecular biotechnology* 7, 303-313.

Cory, J.S., Green, B.M., Paul, R.K., Hunter-Fujita, F., 2005. Genotypic and phenotypic diversity of a baculovirus population within an individual insect host. *Journal of invertebrate pathology* 89, 101-111.

- Cory, J.S., Hirst, M.L., Sterling, P.H., Speight, M.R., 2000. Narrow host range nucleopolyhedrovirus for control of the browntail moth (Lepidoptera: Lymantriidae). *Environmental entomology* 29, 661-667.
- Cory, J.S., Myers, J.H., 2003. The ecology and evolution of insect baculoviruses. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, 239-272.
- Engelhard, E., Kam-Morgan, L., Washburn, J., Volkman, L., 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, 3224-3227.
- Erlandson, M., Newhouse, S., Moore, K., Janmaat, A., Myers, J., Theilmann, D., 2007. Characterization of baculovirus isolates from *Trichoplusia ni* populations from vegetable greenhouses. *Biological Control* 41, 256-263.
- Fuxa, J., Richter, A., Ameen, A., Hammock, B., 2002. Vertical transmission of TnSNPV, TnCPV, AcMNPV, and possibly recombinant NPV in *Trichoplusia ni*. *Journal of invertebrate pathology* 79, 44-50.
- Haas-Stapleton, E.J., Washburn, J.O., Volkman, L.E., 2005. *Spodoptera frugiperda* resistance to oral infection by *Autographa californica* multiple nucleopolyhedrovirus linked to aberrant occlusion-derived virus binding in the midgut. *Journal of general virology* 86, 1349-1355.
- Harrison, R.L., Bonning, B.C., 2001. Use of proteases to improve the insecticidal activity of baculoviruses. *Biological control* 20, 199-209.
- Herniou, E.A., Luque, T., Chen, X., Vlak, J.M., Winstanley, D., Cory, J.S., O'Reilly, D.R., 2001. Use of whole genome sequence data to infer baculovirus phylogeny. *Journal of virology* 75, 8117-8126.
- Herniou, E.A., Olszewski, J.A., O'reilly, D.R., Cory, J.S., 2004. Ancient coevolution of baculoviruses and their insect hosts. *Journal of Virology* 78, 3244-3251.
- Jehle, J.A., Blissard, G., Bonning, B., Cory, J., Herniou, E., Rohrmann, G., Theilmann, D., Thiem, S., Vlak, J., 2006. On the classification and nomenclature of baculoviruses: a proposal for revision. *Archives of*

virology 151, 1257-1266.

Kukan, B., 1999. Vertical transmission of nucleopolyhedrovirus in insects. *Journal of invertebrate pathology* 74, 103-111.

Li, L., Donly, C., Li, Q., Willis, L.G., Keddie, B.A., Erlandson, M.A., Theilmann, D.A., 2002. Identification and genomic analysis of a second species of nucleopolyhedrovirus isolated from *Mamestra configurata*. *Virology* 297, 226-244.

Lynn, D., Shapiro, M., Dougherty, E., 1993. Selection and screening of clonal isolates of the Abington strain of gypsy moth nuclear polyhedrosis virus. *Journal of Invertebrate Pathology* 62, 191-195.

Maeda, S., Mukohara, Y., Kondo, A., 1990. Characteristically distinct isolates of the nuclear polyhedrosis virus from *Spodoptera litura*. *Journal of general virology* 71, 2631-2639.

Martínez, A.-M., Williams, T., López-Ferber, M., Caballero, P., 2005. Optical brighteners do not influence covert baculovirus infection of *Spodoptera frugiperda*. *Applied and environmental microbiology* 71, 1668-1670.

Martínez, A.M., Pineda, S., Figueroa, J.I., Chavarrieta, J.M., Williams, T., 2012. Los baculovirus como bioinsecticidas: evaluación de un nucleopoliedrovirus para el combate de *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) en México y Honduras. *Ciencia Nicolaita*, 35-47.

Michalsky, R., Pfromm, P.H., Czermak, P., Sorensen, C.M., Passarelli, A.L., 2008. Effects of temperature and shear force on infectivity of the baculovirus *Autographa californica* M nucleopolyhedrovirus. *Journal of virological methods* 153, 90-96.

Milks, M.L., Leptich, M.K., Theilmann, D.A., 2001. Recombinant and wild-type nucleopolyhedroviruses are equally fit in mixed infections. *Environmental entomology* 30, 972-981.

Moscardi, F., 1999. Assessment of the application of baculoviruses for control of Lepidoptera. *Annual review of entomology* 44, 257-289.

- Popham, H.J., Bischoff, D.S., Slavicek, J.M., 2001. Both *Lymantria dispar* Nucleopolyhedrovirus Enhancer Genes Contribute to Viral Potency. *Journal of virology* 75, 8639-8648.
- Richards, A.R., Christian, P.D., 1999. A rapid bioassay screen for quantifying nucleopolyhedroviruses (Baculoviridae) in the environment. *Journal of virological methods* 82, 63-75.
- Rios-Velasco, C., Berlanga-Reyes, D.I., Gallegos-Morales, G., Del Rincón-Castro, M.C., 2012. Characterization of baculovirus isolates obtained from soil by restriction fragment patterns. *African Journal of Microbiology Research* 6, 4546-4549.
- Salem, T.Z., Cheng, X.-H., Cheng, X.-W., 2012. AcMNPV enhances infection by ThorNPV in Sf21 cells and SeMNPV in Hi5 cells. *Archives of virology* 157, 1875-1885.
- Smits, P., Vlak, J., 1988. Selection of nuclear polyhedrosis viruses as biological control agents of *Spodoptera exigua* [Lep.: Noctuidae]. *Entomophaga* 33, 299-308.
- Szewczyk, B., Hoyos-Carvajal, L., Paluszek, M., Skrzecz, I., De Souza, M.L., 2006. Baculoviruses re-emerging biopesticides. *Biotechnology advances* 24, 143-160.
- Tamez-Guerra, P., McGuire, M., Medrano-Roldan, H., Galan-Wong, L., Shasha, B., Vega, F., 1996. Sprayable granule formulations for *Bacillus thuringiensis*. *Journal of economic entomology* 8.
- Vickers, J., Cory, J., Entwistle, P., 1991. DNA characterization of eight geographic isolates of granulosis virus from the potato tuber moth (*Phthorimaea operculella*) (Lepidoptera, Gelechiidae). *Journal of Invertebrate Pathology* 57, 334-342.
- Washburn, J.O., Wong, J.F., Volkman, L.E., 2001. Comparative pathogenesis of *Helicoverpa zea* S nucleopolyhedrovirus in noctuid larvae. *Journal of General Virology* 82, 1777-1784.